



UNIVERSIDAD ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA - UESB
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS
Área de Concentração: Engenharia de Alimentos



**DADOS DE EQUILÍBRIO E MODELAGEM DE SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS
FORMADOS POR PEG E SAIS DE SULFATO EM pH 2 E SUA APLICAÇÃO PARA
PARTIÇÃO DE PROTEASES**

Autor: Vanessa Santos Sampaio

Orientadora: Dr.^a Renata Cristina Ferreira Bonomo

ITAPETINGA
BAHIA – BRASIL
JULHO DE 2019

VANESSA SANTOS SAMPAIO

**DADOS DE EQUILÍBRIO E MODELAGEM DE SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS
FORMADOS POR PEG E SAIS DE SULFATO EM PH 2 E SUA APLICAÇÃO PARA
PARTIÇÃO DE PROTEASES**

Tese apresentada como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Engenharia e Ciência de Alimentos, no Programa de Pós – Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

Orientadora: Prof. Dr.^a Renata Cristina F. Bonomo

Coorientadores: Prof. Dr. Rafael da C. I. Fontan

Prof.^a Dr.^a Sibelli Passini B. Ferrão

Prof.^a Dr.^a Lizzy Ayra A. Veríssimo

ITAPETINGA
BAHIA – BRASIL
JULHO DE 2019

635.32 Sampaio, Vanessa Santos.
S186d Dados de equilíbrio e modelagem de sistemas aquosos bifásicos formados por PEG e sais de sulfato em pH 2 e sua aplicação para partição de proteases. / Vanessa Santos Sampaio. – Itapetinga-BA: UESB, 2019.

88f.

Tese apresentada como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Engenharia e Ciência de Alimentos, no Programa de Pós – Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Sob a orientação da Prof^a. D. Sc. Renata Cristina F. Bonomo e coorientação do Prof. D. Sc. Rafael da C. I. Fontan, Prof^a. D. Sc. Sibelli Passini Barbosa Ferrão e Prof^a. D. Sc. Lizzy Ayra A. Veríssimo.

1. *Cynara Scolumys*. 2. Sistema Aquoso Bifásico – Partição de protease. 3. Alcachofra. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação de Doutorado em Engenharia e Ciências de Alimentos, *Campus* de Itapetinga. II. Bonomo, Renata Cristina F. III. Fontan, Rafael da C. I. IV. Ferrão, Sibelli Passini Barbosa. V. Veríssimo, Lizzy Ayra A. VI. Título.

CDD(21): 635.32

Catálogo na Fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB 535-5^a Região
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para desdobramentos por Assunto:

1. *Cynara Scolumys*
2. Sistema Aquoso Bifásico – Partição de protease
3. Alcachofra



Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
 Recredenciada pelo decreto estadual nº 16.825 de 04.07.2016
 Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos
PPG-ECAL / UESB



Áreas de Concentração: Engenharia de Alimentos
 Ciência de Alimentos

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: DADOS DE EQUILÍBRIO E MODELAGEM DE SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS FORMADOS POR PEG E SAIS DE SULFATO EM pH 2 E SUA APLICAÇÃO PARA PARTIÇÃO DE PROTEASES.

Autor (a): VANESSA SANTOS SAMPAIO


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

Coorientador (a): Prof. Dr. Rafael da Costa Ilhéu Fontan

Prof.^a Dr.^a Sibelli Pasiini Barbosa Ferrão


Prof.^a Dr.^a Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo


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


 Prof. Dr. Nívio Batista Santana
 UESB


 Prof.^a Dr.^a Cristiane Martins Veloso
 UESB


 Prof. Dr. Sérgio de Souza Castro
 UESB


 Prof. Dr. Janclei Pereira Coutinho
 Membro Externo - UESC


 Prof.^a Dr.^a Renata Cristina Ferreira Bonomo
 Orientadora - UESB
 Presidente da Banca

Itapetinga-BA, 31 de julho de 2019.

“Somente leve para o amanhã aquilo que te faz bem hoje. Não crie raízes nas coisas que não precisam ser eternas.”

Autor desconhecido

A toda minha família, em especial ao meu filho Henrique!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter me dado forças e não ter me desamparado nos momentos mais difíceis da minha vida; A toda minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida;

Ao meu marido Evaldo Júnior pelo carinho e por está presente em minha vida nos momentos de alegria e de incertezas, me dando forças para superar os desafios;

A Professora Renata Bonomo pela orientação, e principalmente pela amizade, paciência, pelos e incontáveis momentos de ajuda e pelas valiosas contribuições para a realização deste trabalho;

A Rubner, que mesmo distante sempre se fez presente em minha vida.

Aos professores e colegas Sibelli Passini, Cristiane Veloso, Rafael Fontan e Sérgio Castro pelos ensinamentos dedicados durante esse curso.

Aos meus amigos e colegas do LEP pelos agradáveis momentos proporcionados e compartilhamento de conhecimento, em especial a Mateus, Annie, Lucas e Olga.

UESB, pela oportunidade e condições de realizar meu trabalho; Enfim, a todas as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	X
I - REFERENCIAL TEÓRICO	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS	3
2.1.1 FATORES QUE INFLUENCIAM OS DIAGRAMAS DE FASES	6
2.1.2 TEMPERATURA.....	6
2.1.3 TIPO DE SAL.....	7
2.1.4 MASSA MOLAR DO POLÍMERO	8
2.1.5 EFEITO DO pH	9
2.2 MODELAGEM E TEORIA DA FORMAÇÃO DO SAB	9
2.3 MODELO UNIFAC (UNIVERSAL FUNCTIONAL ACTIVITY COEFFICIENT MODEL)	11
2.4 COEFICIENTE DE PARTIÇÃO	15
2.5 <i>Proteases</i>	17
2.5.1 <i>Cynara Cardunculus L.</i>	20
2.5.2 <i>Cardosinas</i>	21
2.5.3 <i>Cynara scolomys</i>	23
2.6 PURIFICAÇÃO DE PROTEASES	25
2.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
II - OBJETIVOS GERAIS	35
2.8 OBJETIVO GERAL	35
2.9 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
III - CAPÍTULO 1 - THERMODYNAMIC MODELING OF AQUEOUS TWO – PHASE SYSTEMS COMPOSED TO MACROMOLECULES AND SULFATE SALTS IN PH 2.0	36
ABSTRACT	37
1. INTRODUCTION	38
2. EXPERIMENTAL SECTION	39
2.1. MATERIALS	40
2.2. CONSTRUCTION OF SPINODAL CURVE.....	40
2.3. DETERMINATION OF TIE-LINES	42
2.4. DENSITY MEASUREMENTS	43
2.5. THERMODYNAMIC MODELING	43
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	45
3.1. SPINODAL CURVES.....	46
3.2. TIE-LINES DETERMINATION	51
3.3. THERMODYNAMIC MODELING	54

4. CONCLUSION	57
REFERENCES	58
IV - CAPÍTULO 2 - PARTIÇÃO DE PROTEASES ASPARTICAS DE <i>CYNARA SCOLYMUS</i> E <i>CYNARA CARDUNCULUS</i> USANDO SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS PEG+SULFATO DE AMÔNIO+ÁGUA EM PH 2,0	63
RESUMO.....	63
INTRODUÇÃO	63
MATERIAIS E MÉTODOS	64
MATERIAIS	64
EXTRAÇÃO DA ENZIMA	65
DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL.....	66
DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA.....	66
DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS.....	66
ATIVIDADE DE COAGULAÇÃO DO LEITE	66
PARTIÇÃO EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS.....	67
PARÂMETROS TERMODINÂMICOS DO PROCESSO DE PARTIÇÃO	68
ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM UREIA.....	69
RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
EXTRAÇÃO DAS ENZIMAS.....	69
PARTIÇÃO DAS ENZIMAS NOS SAB	70
PARÂMETROS CINÉTICOS	74
ATIVIDADE DE COAGULAÇÃO DO LEITE	75
CONCLUSÃO.....	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama de fase de um sistema aquoso bifásico.....	4
Figura 2: Aspeto morfológico da <i>Cynara Cardunculus</i> L..	21
Figura 3: Pistilos oriundos da flor do cardo (<i>Cynara cardunculos</i> L.).	22
Figura 4:Aspeto morfológico da <i>Cynara Scolymus</i> L..	24

RESUMO

SAMPAIO, VANESSA SANTOS. Dados De Equilíbrio e Modelagem de Sistemas Aquosos Bifásicos Formados por PEG e Sais de Sulfato em pH 2 e sua Aplicação para Partição de Proteases. Itapentiga, BA: UESB, 2019. 88 p. Tese. (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração em Engenharia de Alimentos)¹

A técnica de Sistemas aquosos bifásicos (SAB) tem sido aplicada há mais de 50 anos para a separação, fracionamento, e caracterização de biomoléculas. Os componentes utilizados são menos agressivos ao meio ambiente, quando comparado aos solventes tradicionais utilizados na extração líquido-líquido. Em geral, os sistemas mais utilizados são os formados por polímeros e sal e em pH próximo à neutralidade. No entanto, existem biomoléculas que apresentam maior atividade e estabilidade em valores de pH extremos. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi desenvolver novos SAB baseados em PEG 8000 e sais de sulfato, em pH 2,0, e sua aplicação na partição das proteases aspárticas provenientes da *Cynara Scolymus* e *Cynara Cardunculus*. Para isto, os diagramas de fase compostos de polietilenoglicol (PEG) 8000 g mol⁻¹ + sulfato de sódio + água, PEG 8000 g mol⁻¹ + sulfato de amônio + água e PEG 8000 g mol⁻¹ + sulfato de magnésio + água a T = (25, 35 e 45)°C em pH 2,0 foram determinados e o modelo UNIFAC foi correlacionado com os dados de equilíbrio experimentais. O efeito de salting-out foi estudado assim como a determinação do volume de exclusão (EEV). Obteve-se um bom ajuste, com desvios da ordem de 3.901% , para os sistemas modelados. O aumento da temperatura levou ao aumento do do efeito salting-out e EEV. Nos sistemas formados por PEG 8000 g mol⁻¹ + sulfato de amônio + água, na temperatura de 25°C, a partição das proteases foi avaliada, assim como a atividade destas após a partição. As proteases migraram preferencialmente para a fase rica em PEG. A recuperação das proteases da *Cynara Scolymus* foi maior que da *Cynara Cardunculus*. Os valores seletividade e o fator de purificação variaram de 1,9 a 9,7 e 2,2 a 23,1, respectivamente para *Cynara Scolymus* e 1,4 a 10,69 e 0,96 a 1,65 para *Cynara Cardunculus*.

¹ Dr.^a Renata Cristina Ferreira Bonomo, UESB; Co-orientadores: Dr. Rafael da C. I. Fontan, UESB; Dr.^a Sibelli Passini B. Ferrão, UESB; Dr.^a Lizzy Ayra A. Veríssimo, UFLA.

I - REFERENCIAL TEÓRICO

1. INTRODUÇÃO

Sistemas aquosos bifásicos (SAB) são formados sob condições termodinâmicas específicas, quando dois compostos quimicamente diferentes e hidrossolúveis (dois polímeros, polímero e sal, álcool e sal ou líquido iônico e sal) são misturados em água acima de uma concentração crítica. Essa técnica têm sido aplicada há mais de 50 anos para a separação, fracionamento, e caracterização de biomoléculas.

Desde então, as pesquisas nesta área tem-se aprofundado, tornando a utilização dos SAB uma ferramenta na partição e concentração de diversos tipos de solutos, além, das já consolidadas na partição de biomoléculas, tais como, organelas celulares (Moraes et al., 2013; Jacinto et al., 2015), proteínas e enzimas (Haghtalab et al., 2003; Chow et al., 2015; Duarte et al., 2015; Schwienheer et al., 2015; Shahbaz Mohammadi et al., 2015); expandindo-se para outros segmentos como no tratamento de efluentes industriais e na indústria de papel e celulose (Waziri et al., 2003; De Alvarenga et al., 2015); na partição de íons metálicos (Bulgariu e Bulgariu, 2008; Rodrigues et al., 2008; Silva et al., 2008; Chen et al., 2015; Jimenez et al., 2016); pigmentos naturais (Akama et al., 1999; Mageste et al., 2009; Wu et al., 2014; Jampani e Raghavarao, 2015); anticorpos (Silva et al., 2014; Chow et al., 2015).

Antes de encontrar as diversas aplicações analíticas de um ATPS, é necessário conhecer as melhores condições de formação de duas fases. Uma vez que ambas as fases são aquosas, ATPS são altamente sensíveis a pequenas alterações de concentração, temperatura e pH. Quanto maior for a estabilidade do ATPS em condições drásticas, maior será a possibilidade de sua aplicação. Para esse efeito o diagrama de fases é único para cada ATPS em condições preestabelecidas de tipo de sal, pH e temperatura (Chakraborty e Sen, 2016).

Uma forma de prever o comportamento desses diagramas é por meio de modelos termodinâmicos. O método de contribuição de grupo denominado modelo UNIFAC (*Universal Functional Activity Coefficient model*) é utilizado para prever dados de equilíbrio líquido-líquido. Nesse modelo as interações intersticiais são estudadas através da interação de grupos funcionais, ou seja, ele não admite que uma substância consista de moléculas. Com esse modelo é possível assimilar dados experimentais para obter parâmetros que caracterizam interações entre pares de grupos estruturais nos sistemas, sendo possível prever o comportamento do equilíbrio químico em outros sistemas que não foram estudados experimentalmente, mas que contêm os mesmos grupos de contribuição (Oishi e Prausnitz, 1978).

Muitos estudos sobre os dados de equilíbrio para os sistemas polietilenoglicol e sais de sulfato estão disponíveis na literatura, porém estudos sobre sistemas PEG- Sal a diferentes temperaturas e pH 2,0 não foram encontrados. Estudos nessas condições experimentais são atrativos para a separação de biomoléculas que apresentam estabilidade em baixo pH tais como, antocianinas (Aydoğan *et al.*, 2011; Pratiwi *et al.*, 2015; Barbosa *et al.*, 2016) e proteases ácidas (Agboola *et al.*, 2009; Feijoo-Siota, Luis R. Rama, *et al.*, 2018) . Os sistemas com pH 2 têm maior concentração de hidrogeniônica, o que pode melhorar a partição de algumas proteínas que não são desnaturadas nesse pH. Aumento de cargas na superfície da proteína aumentam sua solubilidade e podem melhorar sua transferência para uma fase preferencial.

As proteases constituem um dos grupos mais importantes de enzimas industriais, que têm como uma das principais aplicações à produção de queijo da indústria de laticínios, sendo a quimosina uma das mais utilizadas, tradicionalmente extraída do abomaso de bezerros (Merheb-Dini *et al.*, 2010). Contudo, desde 1961, a oferta desse coagulante de origem animal não mais atende à demanda comercial, frente ao aumento na produção de queijos, aliado ao alto custo desse produto e às considerações éticas e religiosas associadas ao seu uso. Esses fatos incentivam a busca por novas alternativas, despertando o interesse crescente por coagulantes vegetais e microbianos (Ahmed, Isam Ali Mohamed *et al.*, 2009; Jacob *et al.*, 2011).

As maiorias dos estudos sobre a purificação da enzima protease utilizam técnicas mais antigas como a precipitação, extração com solventes e filtração, que geralmente tem alto poder de concentração, porém baixa capacidade de purificação. Dentre os processos existentes atualmente um método eficaz e economicamente viável, que é uma ramificação da extração líquido-líquido chamada de extração por Sistemas Aquosos Bifásicos (SAB's), vem destacando-se para a separação e purificação de biomoléculas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Sistemas aquosos bifásicos

A formação dos Sistemas Aquosos Bifásicos é conhecida desde o final do século 19, quando em 1896, Beijerinck observou que soluções aquosas de gelatina e ágar ou amido, em determinadas concentrações e faixa de temperatura, formavam, em repouso, espontaneamente duas fases líquidas límpidas. A fase mais densa era enriquecida em Agar (ou amido) e a fase superior em gelatina. Porém, o emprego do SAB se concretizou em 1956 com as pesquisas do bioquímico Albertsson que percebeu o potencial de utilização dos sistemas aquosos bifásicos polímero/polímero e polímero/sal para separações de células, particulados celulares e de proteínas (Albertsson, 1958; Ålbertsson e Nyns, 1959).

Desde então, as pesquisas nesta área tem-se aprofundado, tornando a utilização dos SAB uma ferramenta na partição e concentração de diversos tipos de solutos, além, das já consolidadas na partição de biomoléculas como organelas celulares (Banik *et al.*, 2003; Santesson *et al.*, 2004), proteínas e enzimas (Sampaio *et al.*, 2017; Do Nascimento *et al.*, 2018; Pereira *et al.*, 2018); expandindo-se para outros segmentos como no tratamento de efluentes industriais e na indústria de papel e celulose (Waziri *et al.*, 2003; Álvarez *et al.*, 2014); na partição de íons metálicos (Bulgariu e Bulgariu, 2008; Rodrigues *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2015); corantes (Akama *et al.*, 1999; Mageste *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2014; De Alvarenga *et al.*, 2015).

A formação espontânea do SAB ocorre quando dois compostos quimicamente diferentes e hidrossolúveis (dois polímeros, polímero e sal, álcool e sal ou líquido iônico e sal) são misturados em água, desde que determinadas condições termodinâmicas sejam estabelecidas, isto é, em uma faixa específica de temperatura, pressão e composição dos constituintes (Silva e Loh, 2006). As fases formadas nestes sistemas possuem propriedades termodinâmicas intensivas distintas, como índice de refração, composição, densidade e viscosidade. Essas fases são separadas por uma interface que é a região onde as propriedades termodinâmicas intensivas de cada fase transitam para valores diferentes, sempre tendendo ao valor daquela propriedade no seio da outra fase em equilíbrio (Carvalho *et al.*, 2007). A técnica de separação em SAB é aconselhável para purificação de biomoléculas em larga escala, pois permite a separação seletiva, baixa tensão superficial, boa biocompatibilidade, a possibilidade de aplicação em grande escala e boa relação custo-benefício. Os SAB apresentam, ainda, outras vantagens em comparação as outras técnicas de separação e purificação de biocompostos como: operação rápida e contínua, altos rendimentos, reciclagem dos polímeros, minimização da desnaturação de proteínas, facilidade de separar materiais

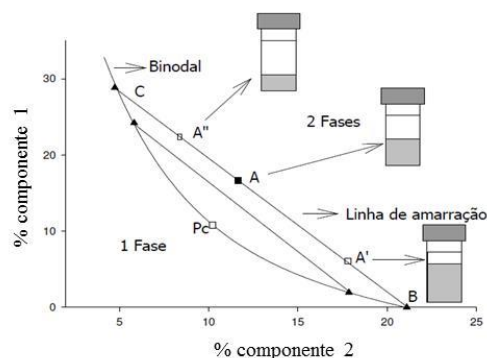
particulados e permite concentrar a biomolécula de interesse em uma das fases, controlando o volume das mesmas (Dos Santos *et al.*, 2018).

Fatores como constituição, tamanho e estrutura molecular dos constituintes, temperatura, natureza e tamanho da partícula alvo, pH e natureza do eletrólito do sistema bifásico influenciam na separação de fases do SAB e, conseqüentemente, o processo extrativo de um determinado composto (Banik *et al.*, 2003). A partição em SAB baseia-se na distribuição seletiva do composto entre as duas fases, cuja predição e interpretação da partição de componentes dependem das propriedades do sistema.

Para aplicação dos SAB' em estudo de partição da molécula de interesse é importante que se conheça previamente seus diagramas de fases ou de equilíbrio. Entende-se como diagrama de equilíbrio uma representação gráfica utilizada para expressar as concentrações de um sistema de fases. Os dados de equilíbrio são representados a temperatura e pressão fixas. Para utilização do SAB é necessário o conhecimento do comportamento das fases nos sistemas. Para isto são efetuados os diagramas de fases, nos quais as composições dos constituintes pra a separação de fases são determinadas. A representação gráfica dos dados de composição de fases do SAB é de grande importância para os estudos de separação de biomoléculas, já que são usados como ferramenta básica de ponto de partida para o desenvolvimento de um processo de extração (Snyder *et al.*, 1992; Graber *et al.*, 2004; Haghtalab e Mokhtarani, 2004).

A Figura 1 representa um diagrama de fases retangular típico de um sistema aquoso bifásico formado por polímero e sal. A concentração de um dos componentes é representada no eixo horizontal e a concentração do outro componente, no eixo vertical. A quantidade de água (ou do terceiro componente) é calculada por diferença.

Figura 1: Diagrama de fase de um sistema aquoso bifásico. Fonte: (Coimbra et al., 2009).



Por convenção, os componentes presentes em maior quantidade nas fases inferior e superior (exceto a água) são representados no eixo das abcissas e das ordenadas,

respectivamente. A quantidade de água é calculada por diferença. A curva que divide a região em duas fases é chamada de curva binodal ou curva de equilíbrio. A região acima da curva binodal é chamada de bifásica e abaixo, monofásica (Albertsson, 1958).

Para o estudo da separação de fases em SAB, faz-se o uso de uma medida numérica de referência para a composição das fases. O comprimento da linha de amarração, usualmente referido como CLL, é um valor empírico adequado para utilização de tal medida. O valor CLL pode ser calculado, a partir das concentrações dos componentes nas fases, pela equação (1) (Zaslavsky, 1994).

$$CLL = [(w_1^S - w_1^I) + (w_2^S - w_2^I)]^{0,5} \quad (1)$$

Onde, w_1^S , w_2^S , w_1^I , w_2^I são, respectivamente, as concentrações do polímero e do sal nas fases superior e inferior.

A inclinação da linha de amarração (ILA) é uma característica importante em um diagrama de equilíbrio: é uma medida de como a composição das fases pode variar com a alteração de uma propriedade físico-química, como temperatura e a massa molar, por exemplo. O valor da inclinação pode ser calculada por:

$$ILA = \left[\frac{(w_1^S) - (w_1^I)}{(w_2^S) - (w_2^I)} \right] \quad (2)$$

As linhas de amarração são representadas como as retas que ligam pontos no diagrama que representam a composição das duas fases em equilíbrio. Qualquer conjunto de pontos que pertençam a região bifásica e que estejam sobre a mesma linha de amarração fornecerá fases superiores que possuirão propriedades termodinâmicas intensivas iguais (densidade, volume molar, entalpia molar, etc.). Aplica-se o mesmo raciocínio para as fases inferiores formadas a partir de composições globais localizadas sobre a mesma linha de amarração (Silva e Loh, 2006).

O ponto crítico (P_c) é uma outra particularidade de um diagrama de fases. Este ponto é aquele no qual as propriedades físico-químicas (composição e volume, dentre outras) das duas fases são teoricamente iguais (Albertsson, 1958). Quanto mais a composição do sistema se aproxima do ponto crítico menor é a diferença entre as fases, ou seja, no ponto crítico as composições e os volumes entre as fases teoricamente são iguais. No entanto, nas proximidades do ponto crítico, pequenas alterações na composição dos sistemas provocam drásticas mudanças, levando o sistema de uma para duas fases e vice-versa (Albertsson, 1958).

Através de um diagrama de fases é possível obter todas essas informações mencionadas e assim poder aplicar o SAB em estudos de partição de distintos analitos. A obtenção de diagramas de fase de SAB com novos constituintes que ainda não existem na literatura é de grande importância para avaliar como a natureza dos constituintes do sistema influenciam no processo de formação de fases, e também são importantes para aplicação em estudos de partição, aumentando a quantidade de SAB com componentes que podem ter afinidade com o analito a ser extraído.

Após formação do SAB com os dados de equilíbrio líquido-líquido contidos no diagrama de fase, o analito é adicionado ao sistema, sendo extraído para a fase que possuir maior afinidade. Seu comportamento de extração é específico pra cada sistema em que o mesmo for testado, devido às diferentes e possíveis interações que podem ocorrer entre os componentes do sistema e o soluto. A extração do analito também é afetada em função de alguns parâmetros do SAB que influenciam diretamente o processo como pH, temperatura, natureza dos componentes, CLA (Mageste *et al.*, 2009; Rengifo *et al.*, 2015). Ao estudar a influência desses parâmetros na extração, é possível obter condições ótimas para a extração.

2.1.1 Fatores que influenciam os diagramas de fases

Normalmente os fatores, tipo e concentração dos constituintes das fases, PH, temperatura e tipo de sal são os mais conhecidos por influenciar a natureza da solução dos SAB e conseqüentemente os diagramas de equilíbrio (Peters, 1987).

2.1.2 Temperatura

A influência da temperatura é bastante complexa devido ao seu efeito na composição das fases em equilíbrio, assim como a alteração da estrutura da biomolécula (Sarubbo, 2000). A temperatura pode levar a mudanças na viscosidade das fases ou na estrutura dos polímeros, alterando a forma da curva binodal no diagrama de fases (Carvalho *et al.*, 2007). Os sistemas com constituição próxima da composição do ponto crítico são mais afetados por mudanças de temperatura, devido à instabilidade inerente a essa região. Um deslocamento do estado de equilíbrio do sistema pode levar, facilmente, para a região monofásica (Walter, 2012).

O efeito da temperatura varia de acordo com o tipo de sistema, polímero-polímero, sal-álcool, polímero-álcool ou polímero - sal. Para o sistema PEG e dextrana, foi constatado que, com o aumento da temperatura, era necessária uma concentração maior dos polímeros para a separação das fases. Neste caso, para que a separação das fases seja favorecida, deve-se trabalhar em temperaturas inferiores a ambiente. Já para PEG e sal, ocorre justamente o contrário, pois em temperaturas maiores ou próximas a ambiente, a separação das fases do

sistema é facilitada. 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 e, conseqüentemente, ocorre uma redução da concentração do polímero na fase inferior (Zaslavsky, 1994).

Graber et al. (2004), estudando o efeito das temperaturas de 5°C, 25°C e 45°C em sistemas PEG 4000/sulfato de lítio/água, concluíram que o aumento da temperatura provocou o deslocamento da curva binodal, aumentando a região bifásica, o que implica numa menor concentração do sal e do polímero necessários para a formação dos sistemas aquosos bifásicos. Zafarani-Moattar e Gasemi (2002) investigaram a influência da temperatura (25, 35 e 45) °C em sistemas aquosos PEG 6000/ (NH₄)₂HPO₄ e PEG 6000/NH₄H₂PO₄, verificando também uma expansão da área bifásica com o aumento da temperatura.

Zafarani-Moattar *et al.* (2003) estudaram a influência da temperatura no equilíbrio de fases de sistemas compostos por PEG 6000, citrato de sódio e água e concluíram que o aumento da temperatura provocou o aumento da região bifásica e da inclinação da linha de amarração.

De uma forma geral, os autores concluíram que o aumento da temperatura provoca diminuição da solubilidade mútua, ou seja, aumento da região bifásica. Igualmente, pode ser dito que o aumento da temperatura favorece a formação do SAB, pois a separação de fases pode ser um processo endotérmico.

2.1.3 Tipo de Sal

Albertsson observou que a separação de fases em misturas contendo polieletrólitos depende da força iônica e do tipo de íon presente no sistema. Mais especificamente, verificou que a concentração de PEG necessária à separação de fases no sistema PEG + dextrana + água, adicionado de sais, dependia do tipo de sal usado. E ainda, que se uma quantidade suficiente de sal fosse adicionada, não era necessário incorporar PEG ao sistema para que ocorresse a separação das fases. Desta forma, surgiram os primeiros sistemas aquosos bifásicos do tipo polímero + sal + água (Carvalho *et al.*, 2007).

A separação de fase pode ser causada pelo efeito de salting out, que refere-se à capacidade de sal em induzir a segregação da outra substância para a fase oposta, independentemente se ela é superior ou inferior. A capacidade do sal em induzir a segregação do outro componente (PEG, líquido iônico, Alcool, etc.) no SAB pode ser expressa quantitativamente pelo chamado coeficiente salting out (*k*) calculado pela equação de Setschenow (5), de acordo com HEY e colaboradores (2005).

$$\ln\left(\frac{w_1^t}{w_1^b}\right) = \beta + k(w_2^b - w_2^t) \quad (5)$$

Onde w é a fração mássica para s componentes que formam o SAB, “1” e “2” refere-se ao componente 1 e ao componente 2 respectivamente, “t” e “b” é fase do topo e fases da base, respectivamente. β é definido como uma constante relacionada ao coeficiente de atividade.

Sosa et al.(2017) ao estudar o efeito *sating out* no diagrama de equilíbrio para sistemas PEG/ sulfato de cobre ou sulfato de magnésio/água, concluíram que o aumento desse efeito causa o aumento da região bifásica. O mesmo comportamento foi encontrado por Pimentel et al. (2017) ao estudar sistemas 2-propanol/ sulfato de magnésio ou sulfato de sódio/água em diferentes temperaturas.

2.1.4 Massa molar do polímero

Como observado inicialmente por Albertsson (1960), quanto maior a massa molar do polímero formador do SAB menor será a concentração de sal (ou do outro componente constituinte do sistema) requerida para que ocorra a separação de fases. Este comportamento é observado tanto para sistemas polímero-polímero-água quanto para sistemas polímero-sal-água.

Sosa et al. (2017) analisaram o efeito da massa molar do PEG nas curvas binodais para sistemas PEG (2000,4000, 6000)/sulfato de cobre ou sulfato de magnésio/água em diferentes temperaturas, concluíram que a região bifásica aumentou com o aumento da massa molar do polímero. Resultados semelhantes também foram obtidos por Sampaio et al. (2016) para sistemas formados por PEG (400, 4000 e 6000)/sulfato de sódio/água em diferentes temperaturas. Murari et al. (2015) também obtiveram resultados semelhantes para sistemas PEG (400, 10000, 35000)/sulfato de amônio/água em diferentes temperaturas.

Este efeito ocorre devido à diminuição da solubilidade do PEG em água, à medida que aumenta a massa molar do PEG. Em outras palavras, o aumento da incompatibilidade entre os componentes do sistema é causado devido ao caráter mais hidrofóbico de PEG de maior massa molar.

2.1.5 Efeito do pH

O efeito do pH na separação das fases foi estudado por Huddleston et al. (1991) para sistemas PEG-fosfato de potássio. Observou-se que com o aumento do pH de 6,0 para 9,2 houve um deslocamento da curva binodal, no sentido de menores concentrações de polímero e sal.

Ferreira et al. (2007), estudando a influência do pH nos diagramas de fase constituído por PEG 6000 e cloreto de cálcio, verificaram que, com a redução do pH, houve a necessidade de aumentar a quantidade de sal adicionado para a formação de duas fases.

Padilha et al.(2011), estudando os diagramas de fase compostos por PEG 400/fosfato e PEG 4000/fosfato em dados de pHs que variaram de 6 a 11, notaram que não houve deslocamento significativo das binodais, corroborando com estudos de Diamond e Hsu (1992). Comportamento semelhante foi observado Sampaio et al. (2012) ao estudar sistemas formados por PEG/poliacrilato de sódio (8000 e 15000)/cloreto de potássio/ água nos pH 7,0 e 9,0.

2.2 Modelagem e teoria da formação do SAB

A formação das duas fases dos sistemas aquosos bifásicos dependerá das interações intermoleculares entre os constituintes formadores do sistema e das variações entrópicas resultantes do processo de mistura, expresso em termos de energia livre de mistura ($\Delta_{mix}G$). Termodinamicamente, quando $\Delta_{mix}G < 0$, um sistema homogêneo é formado, caso contrário, o sistema procurará alcançar um novo estado de interações e configuração que leve a menor energia livre de Gibbs para o sistema, formando duas fases (alcançar o equilíbrio termodinâmico)(Silva e Loh, 2006).

As relações de equilíbrio são decisivas no cálculo da força motriz para transferência de massa e na quantificação das composições das fases do sistema. De modo geral, o equilíbrio de fases é representado pela contribuição de isofugacidade, dada por (Rodrigues, 2016)

$$f_i^\alpha = f_i^\beta = \dots = f_i^\pi \quad (5)$$

Onde: f_i^α , f_i^β e f_i^π são as fugacidades do componente na fase α , β e π respectivamente.

No equilíbrio líquido-líquido, as fugacidades são representadas pelo coeficiente de atividade (γ). Desta forma, se considerarmos o equilíbrio líquido-líquido em que as fugacidades são representadas pelo coeficiente de atividade, a equação é:

$$x_i^\alpha \gamma_i^\alpha = x_i^\beta \gamma_i^\beta \quad (6)$$

Onde: x_i^α e x_i^β são as frações molares do componente i nas fases α e β , respectivamente; γ_i^α e γ_i^β é o coeficiente de atividade do componente i nas fases α e β , respectivamente.

O coeficiente de atividade está relacionado com a energia livre de Gibbs em excesso, através das seguintes relações (Smith *et al.*, 2000):

$$RT \ln \gamma_i = \left(\frac{\partial G^E}{\partial n_i} \right)_{T,P,n_{j \neq i}} \quad (7)$$

$$\ln \gamma_i = \frac{G^E}{RT} \quad (8)$$

Onde: R é a constante dos gases ideais ($\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$); T é a temperatura (K); G^E é a energia livre de Gibbs de excesso; γ_i é o coeficiente de atividade.

Alguns modelos para determinar a energia livre de Gibbs em excesso têm sido propostos para correlacionar os dados de equilíbrio de fase (Gebreyohannes *et al.*, 2014) e determinação de coeficientes de atividade (Danielski e Stragevitch, 2019). De maneira geral, os modelos da literatura podem ser classificados como modelos semi-empíricos (Margules, Ridlich-Kister e Van Laar), modelo baseados em teoria, que incluem o conceito de composição local (Wilson, NRTL e UNIQUAC) e os modelos de contribuição de grupos (UNIFAC e ASOG) (Gebreyohannes *et al.*, 2014).

O desenvolvimento de modelos teóricos do comportamento molecular de soluções líquidas são baseadas no conceito de composição local. Esse conceito fundamenta-se na ideia de que, no interior de uma solução líquida, composições locais, diferentes da composição global da mistura, são supostamente responsáveis pelas orientações moleculares de curto alcance e não aleatórias que resultam de diferenças no tamanho molecular e das forças intermoleculares dos componentes (Smith *et al.*, 2007). O primeiro modelo foi introduzido por G. M. Wilson em 1964, com a publicação de um modelo para o comportamento de soluções, conhecida como equação de Wilson (Wilson e Deal, 1962). A partir desta equação outros modelos surgiram, como a equação NRTL (Non-Random-Two-Liquid) de Renon e Prausnitz (Renon e Prausnitz, 1968) e a equação UNIQUAC (Universal Quasi-Chemical) de (Abrams e Prausnitz, 1975). Posteriormente, surgiu o modelo UNIFAC, baseado na equação UNIQUAC, no qual os coeficientes de atividade são calculados a partir da contribuição de vários grupos que formam as moléculas do sistema (Fredenslund *et al.*, 1975).

Segundo Perumalsamy e Murugesan (2009a), o método de contribuição de grupos é mais efetivo na predição dos coeficientes de atividade dos componentes em comparação com outros métodos. Estimativas são obtidas através da estrutura molecular das substâncias

presentes, tem como base o pressuposto de que a energia de interação de qualquer sistema pode ser aproximada pela soma das energias dos grupos funcionais que compõe o sistema, ou seja, a mistura é considerada um conjunto de diversos grupos de contribuição e não de moléculas. Desta forma, o número de grupos de interações possíveis pode ser reduzido e um número moderado de parâmetros pode ser utilizado para prever as propriedades de uma variedade de sistemas. Estes modelos são os mais confiáveis na predição de coeficientes de atividade e outras propriedades termodinâmicas (Klamt e Eckert, 2000).

Entretanto, a eficiência deste método depende da divisão das moléculas em números de grupos que interagem entre si. No método de contribuição de grupos a suposição fundamental é que o logaritmo do coeficiente de atividade é assumido como tendo duas contribuições, uma parte combinatorial, devido a diferenças de tamanho e forma das moléculas (entrópica) e uma parte residual, essencialmente devido a interações de energia (entálpica) (Fredenslund *et al.*, 1975; Perumalsamy e Murugesan, 2009a; Robles *et al.*, 2016). Dentre os modelos de contribuição de grupo o modelo UNIFAC e suas versões modificadas, dentre elas, UNIFAC - modificado com a abordagem e Kikic, tem ganhado destaque e é mais detalhado na seção seguinte, pois foi o utilizado neste trabalho para calcular o coeficiente de atividade.

2.3 Modelo UNIFAC (Universal Functional Activity Coefficient model)

O método UNIFAC (Functional-group activity coefficient), idealizado a partir dos trabalhos de Fredenslund *et al.* (1975) tem como ideia básica fazer a combinação do conceito da solução por grupos para a parte residual com o modelo UNIQUAC (Universal Quasi-Chemical) (Abrams e Prausnitz, 1975) para a parte combinatorial. A vantagem do método é que ele permite representar uma quantidade muito grande de misturas partindo de uma pequena quantidade de grupos.

Portanto, as hipóteses para o desenvolvimento dos métodos de contribuição de grupo para o cálculo de coeficientes de atividade foram estabelecidas por Wilson e Deal (1962) com base nas seguintes suposições: • "Uma solução líquida é considerada como uma mistura dos grupos que constituem os componentes da solução" • "A energia livre de Gibbs excedente é a soma de duas contribuições: uma combinatorial, devido essencialmente às diferenças de tamanho e forma das moléculas, e outra residual, que considera as interações energéticas entre as moléculas", que pode ser expressa em termos do coeficiente de atividade de uma molécula em uma solução líquida como:

$$\ln \gamma_i = \ln \gamma_i^{com} + \ln \gamma_i^{res} \quad (5)$$

A parte combinatória do método UNIFAC é dada pela equação 6 (Reid *et al.*, 1987)

$$\ln \gamma_i^{com} = \left(\ln \frac{\varphi_i}{x_i} + 1 - \frac{\varphi_i}{x_i} \right) - \frac{Z}{2} q \left(\ln \frac{\varphi_i}{\theta_i} + 1 - \frac{\varphi_i}{\theta_i} \right) \quad (6)$$

Onde:

$$\varphi_i^* = \frac{r_i x_i}{\sum_j r_j x_j} \quad (6.1)$$

$$\theta_i = \frac{q_i x_i}{\sum_j q_j x_j} \quad (6.2)$$

$$r_1 = \sum_k V_k^{(i)} R_k \quad (6.3)$$

$$q_1 = \sum_k V_k^{(i)} Q_k \quad (6.4)$$

Onde 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 e $V_k^{(i)}$ é o número de grupos do tipo k na molécula i .

Os valores dos parâmetros de Grupos, R_k e Q_k são encontrados 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 + Sulfato de sódio + água, teremos os seguintes grupos de contribuição, CH₂, CH₂O, OH, Na, SO₄ e H₂O. A parte residual será referente à contribuição individual que cada grupo funcional faz com o sistema, menos a soma que cada grupo funcional deste faz com seu componente puro. 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).

$$\ln \gamma_i^r = \sum_K^{grupos} v_K^i (\ln \Gamma_K - \ln \Gamma_K^{(i)}) \quad (7)$$

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

$$\ln \Gamma_K = Q_K \left[1 - \ln \left(\sum_m \theta_m \Psi_{mK} \right) - \sum_m \frac{\theta_m \Psi_{mK}}{\sum_n \theta_n \Psi_{nm}} \right] \quad (8)$$

$$\theta_m = \frac{Q_m X_m}{\sum_n Q_n X_n} \quad (8.1)$$

$$X_m = \frac{\sum_i^M V_m^{(i)} X_i}{\sum_i^M \sum_j^N V_j^{(i)} X_i} \quad (8.2)$$

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 8.3.

$$\Psi_{mn} = \exp \left[-\frac{U_{mn} - U_{nm}}{RT} \right] = \exp \left(-\frac{u_{mn}}{T} \right) \quad (8.3)$$

No qual U_{mn} é a medida da energia de interação entre os grupos m e n . Parâmetros de interação de grupos. U_{mn} , podem ser avaliados a partir de dados experimentais de equilíbrio de fases. 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. (1986), Macedo et al. (1983), Tiegs et al. (1987) Hansen et al. (1991). A aplicação de UNIFAC a sistemas aquosos bifásicos contendo sais tem sido realizada por alguns autores que utilizam as abordagens propostas por Kikic et al. (1991) e Dahl e Macedo (1991). A diferença entre as duas abordagens é que Kikic e colaboradores consideram um sal como composto de dois grupos, cátion e ânion, enquanto Dahl e Macedo (1991) consideram um sal como sendo um grupo funcional diferenciado. Entretanto neste trabalho, com o intuito de detalhar mais o experimento e ter noção de qual componente do sal tem maior interação com os outros componentes da amostra, foi utilizado a abordagem de Kikic e colaboradores, pois a mesma considera o sal como um grupo de cátion e ânion e não como um único grupo diferenciado.

Kikic et al. (1992) adicionou ao modelo original do UNIFAC o termo de Debye – Huckel. Desta forma, o coeficiente de atividade é calculado de acordo a equação 9.

$$\ln \gamma_i = \ln \gamma_i^{D-H} + \ln \gamma_i^{com} + \ln \gamma_i^{res} \quad (9)$$

O termo Debye – Huckel é calculado pela equação 10 como descrito por Macedo et al. (1983).

$$\ln \gamma_n^{D-H} = \frac{2AM_n d_s}{b^3 d_n} \left[1 + b\sqrt{l} - \frac{1}{1+b\sqrt{l}} - 2\ln(1 + b\sqrt{l}) \right] \quad (10)$$

Onde M_n é a massa molar do solvente n , l é a força iônica, d_n é a densidade do solvente puro n , enquanto a densidade do solvente na mistura d_s é calculada pela equação 10.1

$$d_s = \frac{M_s}{\sum_n x'_n M_n / d_n} \quad (10.1)$$

Onde x'_n é a fração molar livre do sal no solvente n e $M_s = \sum_n x'_n M_n$ é a massa molar da mistura líquida.

Os parâmetros A e b são dados pelas equações 11 e 12 (Kikic *et al.*, 1991).

$$A = 1.327757 \cdot 10^5 d_s^{\frac{1}{2}} / (\epsilon T)^{3/2} \quad (11)$$

$$b = 6.35969 d_s^{1/2} / (\epsilon T)^{1/2} \quad (12)$$

Dados da composição de sistemas aquosos bifásicos é necessário para o projeto de equipamentos de extração e para o desenvolvimento de modelos termodinâmicos e de transferência de massa do processo (Sé e Aznar, 2002). O desenvolvimento de um modelo termodinâmico adequado para o processo permite a predição de resultados do sistema evitando-se um excessivo número de práticas experimentais que demandam tempo e recursos financeiros. Segundo Santiago *et al.* (2010) a modelagem termodinâmica é essencial para o projeto, otimização e operação de processos. Diante disto, estudos da modelagem de SAB têm sido realizados, dentre eles:

Zafarani-Moattar *et al.* (2004) utilizaram o modelo UNIQUAC com e sem o termo de Debye-Hückel, que considera as interações de longo alcance, para correlacionar e prever o comportamento de sistemas aquosos bifásicos compostos por polietilenoglicol e citrato de sódio. Eles verificaram que a utilização do modelo UNIQUAC sem o termo de Debye-Hückel gerou um desvio padrão de 6% e com a utilização do termo de Debye-Hückel o desvio padrão baixou para 2%, mostrando a importância da adição deste termo.

Perumalsamy and Murugesan (2009a) utilizaram os métodos ASOG e UNIFAC para prever dados de equilíbrio de sistemas formados por PEG 2000- citrato de sódio e água. Eles verificaram que o modelo UNIFAC apresentou melhor consistência com os dados experimentais.

Andrade *et al.* (2011) determinaram dados de equilíbrio de sistemas aquosos bifásicos compostos por copolímero L64 – sal (tartarato de sódio, succinato de sódio, citrato de sódio ou citrato de amônio) – água e correlacionaram os dados pelos modelos UNIFAC e NRTL, onde verificaram que os dois modelos apresentaram bons ajustes, porém o modelo UNIFAC apresentou menor desvio (0,87%).

Hamta et al., (2017) apresentaram dados de equilíbrio de sistemas formados por PEG 6000 e carbonato de sódio em diferentes temperaturas (293,15, 303,15 e 313,15) K. Os autores correlacionaram os dados com o modelo UNIQUAC, UNIQUAC estendido (E-UNIQUAC) e e-NRTL a fim de obterem os parâmetros de interação binária entre os componentes. Eles observaram que todos os modelos estudados e-NRTL, E-UNIQUAC e UNIQUAC apresentaram baixos desvios 1,26%, 1,37% e 3,46%, respectivamente. Posteriormente os autores utilizaram os parâmetros de interação obtidos (nos sistemas contendo o PEG 6000 e carbonato de sódio) a fim de obter dados de equilíbrio em sistemas contendo PEG (1000, 3350, 4000 e 8000) e carbonato de sódio, utilizando o modelo E-UNIQUAC. Eles verificaram que os dados de equilíbrio líquido-líquido podem ser preditos satisfatoriamente utilizando os parâmetros ajustados no trabalho.

Pimentel et al. (2017) avaliaram dados de equilíbrio compostos por 2-propanol- sal (sulfato de sódio ou sulfato de magnésio) - água em diferentes temperaturas (293,15-323,15) K, correlacionaram os dados experimentais utilizando o modelo UNIFAC e obtiveram desvios de 0,68%.

Nascimento et al. (2018) estudaram dados de equilíbrio de sistemas contendo polietilenoglicol 1500 g.mol⁻¹ e citrato de sódio em diferentes valores de pH (4, 5, 6 e 7) e nas temperaturas de 30°C e 40°C. Os dados de equilíbrio foram determinados e correlacionados pelo método UNIFAC para obtenção dos parâmetros de interação, onde observaram baixos desvios.

2.4 Coeficiente De Partição

No momento em que os solutos a serem particionados são adicionados em um sistema aquoso bifásico, eles se distribuem entre a fase superior e a fase inferior. A relação entre as concentrações de certa partícula nessas fases define o coeficiente de partição (K) em sistemas aquosos (Peters, 1987). Dessa forma, é utilizada essa mesma relação na partição de moléculas alvo de interesse nos mais novos sistemas aquosos bifásicos formados e estudados, conforme Equação 10.

$$K = \frac{C_{fs}}{C_{fi}} \quad (11)$$

onde C_{fs} e C_{fi} são concentrações de equilíbrio do soluto na fase superior e inferior, respectivamente.

Segundo Diamond e Hsu (1989), o coeficiente de partição pode ser expressado da seguinte forma:

$$K = K_{amb} + K_{est} \quad (12)$$

em que K_{amb} e K_{est} representam as contribuições dos fatores ambiental e de ordem estrutural respectivamente. Dentre os fatores ambientais estão consideradas propriedades do SAB, como tipo e concentração de sais, tipo, concentração e massa do polímero, pH, temperatura e ligantes específicos. Albertsson (1986), propôs o seguinte modelo para cálculo de K , desmembrando – o em :

$$\ln K = \ln K_{el.} + \ln K_{hidrof.} + \ln K_{hifil.} + \ln K_{conf.} + \ln K_{lig.} \quad (13)$$

em que os índices *el.*, *hidrof.*, *hifil.*, *conf.* e *lig.* Referem-se às contribuições eletrostáticas, hidrofóbicas, hidrofílicas, de conformação e de interação com os ligantes, respectivamente.

Quando a molécula de interesse é uma enzima o coeficiente de partição pode ser calculado em relação a concentração de proteína total e em relação a atividade enzimática. Por meio da determinação desses dois parâmetros é possível calcular o valor da seletividade (S) da enzima no sistema, através da equação 12:

$$S = \frac{K_e}{K_p} \quad (12)$$

Onde K_e é o coeficiente de partição da enzima e K_p é o coeficiente de partição da proteína total na fase preferencial.

Outro parâmetro é o fator de purificação (FP), é a variável que indica quantas vezes é possível purificar o extrato enzimático na fase preferencial utilizando o sistema em questão. É calculado como a razão entre a atividade específica na fase preferencial e a atividade específica do extrato enzimático bruto.

$$FP = \frac{A_{esp.purificada}}{A_{esp.bruta}} \quad (13)$$

Onde $A_{esp. purificada}$ é a atividade específica (U/mg de proteína) da enzima na fase superior e $A_{esp. bruta}$ é a atividade específica (U/mg de proteína) da enzima no extrato bruto

Já o valor do rendimento da fase (Y_s) é uma maneira de avaliar a eficiência de partição da enzima-alvo a partir da quantidade da enzima presente na fase preferencial, ou seja, quanto de enzima particionou para a fase preferencial do sistema considerado ideal para extração. Foi calculado pela equação 14.

$$Y_s = \frac{A_{fase}}{A_{extrato}} \times 100 \quad (14)$$

Onde, A_{fase} é a atividade total na fase preferencial e A_{extrato} é a atividade total no extrato enzimático inicial. Sendo o valor calculado apresentado em porcentagem.

Diversos estudos sobre a partição de biomoléculas em SAB foram realizados, como por exemplo, Pereira et al.(2018) particionaram α -amilase proveniente da fermentação em estado sólido de resíduo de mandioca em sistemas PEG (4000 e 6000 g.mol⁻¹) e fosfato de potássio.Liu et al. (2019), otimizaram a purificação de celulase a partir de *Bacillus velezensis* A4 em sistemas PEG (1500, 4000 e 6000 g.mol⁻¹) e fostato de potássio. Ghaffari et al. (2019) cefazolina em sistemas PEG (6000 e 8000 g.mol⁻¹) e sais de sulfato (citrato de sódio, tartarato de sódio e sulfato de sódio). Gómez et al. (2019) recuperaram flavonoides em sistemas formados por líquido iônico e fosfato de potássio. Baskaran et al. (2018) estudaram a partição de proteína bruta a parti de águas rsiduárias em sistemas PEG 600 g.mol⁻¹ e sal (fosfato de potássio, sulfato de sódio e sulfato de amônio). Osloob e Roosta (2019) estudaram a partição de Penicilina G em sistemas formados por cloreto de colina e fosfato de potássio. Sabo et al. (2018) estudaram a partição de bacteriocina a partir do caldo da fermentação clarificado de *Lactobacillus plantarum* ST16Pa em sistemas formados por PEG (2000, 6000 e 10000 g.mol⁻¹) e NAPA 8000 g.mol⁻¹ (poliacrilato de sódio), usando sal ou colina como aditivo. Nascimento et al. (2018)estudaram a partição de α -amilase em sistemas PEG 1500 g.mol⁻¹ e citrato de sódio em diferentes temperaturas e pH. Sampaio et al. (2017) particionaram lisosima e α -lactoalbumina em sistema composto por líquido iônico e fosfato de potássio.

2.5 Proteases

Enzimas são de grande importância no desenvolvimento de bioprocessos industriais. Suas aplicações ocorrem nos mais diferentes segmentos industriais, incluindo o de couro, têxtil, farmacêutico, biocombustíveis, detergentes, alimentos e bebidas, entre outros (Adrio e Demain, 2014). Proteases são umas das enzimas mais importantes e abundantes produzidas pela indústria de biotecnologia, consistindo de mais de 25% das biomoléculas produzidas para aplicação industrial e 60% de todo o mercado enzimático (Ramakrishna *et al.*, 2010). As proteases apresentam sua maior aplicação nas indústrias de detergentes e alimentos. Na indústria de detergentes, as proteases são aplicadas como ingrediente na produção de detergentes com a finalidade de remoção de resíduos de alimentos, sangue e secreções corporais. Na indústria de alimentos são reconhecidamente o grupo de enzimas com maior aplicação, possuindo papel fundamental na fabricação de cervejas, na maturação de queijos, no amaciamento de carnes, na produção de hidrolisados funcionais protéicos com a finalidade de melhorar o sabor e a qualidade do produto, na panificação, na fabricação de adoçantes

artificiais, como o aspartame e na recuperação e aproveitamento de resíduos e subprodutos (Novelli *et al.*, 2016).

Na indústria de laticínios, as proteases são empregadas na coagulação do leite para produção de queijos, promovendo a hidrólise da ligação peptídica entre os resíduos fenilalanina (Phe 105) e metionina (Met 106) da κ -caseína presente no leite (Bruno *et al.*, 2010)

As proteases podem ser obtidas por fontes vegetal, animal e microbiana, uma vez que se encontram em todos os organismos, conduzindo funções metabólicas e essenciais. As proteases animais ocorrem em tecidos específicos dos animais e apresentam grande importância industrial. As mais importantes são as gástricas, pepsina e renina, e as pancreáticas, tripsina e quimiotripsina (Ahmed, Isam Ali Mohamed *et al.*, 2009; Jacob *et al.*, 2011).

As proteases de origem microbiana são preferidas devido ao seu rápido crescimento, ao pequeno espaço requerido para o cultivo e à grande variedade catalítica que dispõem. As proteases microbianas, em geral, são mais estáveis que as homólogas de plantas e animais, além do seu processo de produção ser mais fácil e seguro. Os micro-organismos representam uma fonte atrativa de protease pela possibilidade de cultivo em grandes quantidades, em um tempo relativamente curto, por métodos estabelecidos de fermentação. Além disso, as proteases microbianas têm uma vida mais longa e podem ser armazenadas sob condições ideais sem perda significativa da atividade (Nongonierma e Fitzgerald, 2011).

As proteases vegetais são muito utilizadas na indústria de alimentos e estão presentes em maior concentração em frutos verdes. Algumas dessas proteases também são usadas na indústria de alimentos em cervejarias e bebidas prevenindo a formação de turbidez (Nollet *et al.*, 2012), na preparação de hidrolisados protéicos altamente solúveis e aromatizados (Kim *et al.*, 2013) no amaciamento de carne, onde promove degradação das proteínas miofibrilares e do colágeno (Arshad *et al.*, 2016), em ovos desidratados (Sharif *et al.*, 2018) e com maior destaque na fabricação de queijos (Jacob *et al.*, 2011).

As proteases (EC 3.4.11-24) constituem um grande grupo de enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas de outras proteínas e podem ser classificadas como proteases aspárticas, cisteínicas, glutâmicas, serínicas e treoninas, dependendo dos aminoácidos presentes no sítio ativo, ou como metalo proteases se um íon metálico é necessário para sua atividade catalítica (Rawlings *et al.*, 2013). As proteases (PA) podem

ser classificadas de acordo com diferentes parâmetros diferentes como evidenciado na Tabela 1:

Tabela 1:Características de algumas proteases animais, microbianas e vegetais¹.

Enzima	Especificidade	Tipo	pH	Principal fonte
Animal				
Pepsina	Phe-, Leu	Aspártica	1-4	Mucosa gastrica bovina de suína
Quimosina	Phe-Met	Aspártica	3-6	Estômago de cabra, ovelha e cordeiro
Tripisina	Arg-, Lys-	Serínica	6-9	Pâncreas bovino e suíno
Quimotripisina	Tyr-, Trp-, Phe-, Lys-	Serínica	6-9	Pâncreas bovino e suíno
Elastase	Leu-, Ala-, Val-,Ile-	Serínica	6-8	Pâncreas bovino e suíno
Microbiana				
Bacteriana neutra	-Phe, -Leu, -Val	Metalo	6-8	Bacillus subtilis, Bacillus amyloliquefaciens
Bacteriana neutra	Ampla	Serínica	6-9	Bacillus subtilis
Bacteriana neutra	Ampla	Serínica	7-10	Bacillus licheniformis
Bacterina Alcalina	Ile-Phe, Leu-Val	Metalo	7-9	Bacillus thermoproteolyticus
Bacteriana alcalina	Ampla	Serínica	7-11	Bacillus spp.
Fúngica ácida	Semelhante a pepsina	Aspártica	2-5	Aspergillus niger
Fúngica ácida	His-Leu, Phe-Phe	Aspártica	2-5	Aspergillus niger
Fúngica ácida	Semelhante a pepsina	Aspártica	4-6	Rhizopus spp.
Fúngica ácida	Semelhante a quimosina	Aspártica	3-7	Cryphonectria parasitica
Fúngica ácida	Semelhante a quimosina	Aspártica	3-7	Rhizomucor miehei
Fúngica alcalina	Ampla	Aspártica	6-9	Aspergillus oryzae
Fúngica alcalina	Phe-Tyr	Aspártica	6-9	Aspergillus oryzae
Fúngica alcalina	Leu-Tyr	Metalo	6-9	Aspergillus oryzae
Planta				
Ficcina	Ampla, Lys-, Ala-, Tyr-, Gly-	Cisteínica	5-8	Figo
Papaína	Ampla, Arg-, Lys-, Phe-	Cisteínica	5-9	Mamão
Bromelina	Lys-, Tyr-, Gly-	Cisteínica	5-8	Abacaxi

¹Fonte: (Godfrey e West, 1996)

As proteinases aspárticas compreendem um grupo relativamente pequeno dentro desta classificação. Isso tem sido associado à presença de ácidos aspárticos no centro ativo dessas proteases, essa característica limita suas funções a um ambiente ácido, um caso muito raro em organismos vivos (Tang, 2010). No entanto, eles são uma classe única de enzimas devido à sua importância fisiológica e comercial, tendo papéis muito importantes, incluindo processamento, maturação e degradação de proteínas. As proteinases aspárticas são as primeiras enzimas descobertas (Szecsi, 1992) e a produção industrial de proteinases aspárticas

remonta a 1874, quando o cientista dinamarquês Christian Hansen extraiu a quimosina do estômago de bezerros para aplicação na fabricação de queijos (Yegin e Dekker, 2013).

Desde 1961, a oferta desse coagulante de origem animal não mais atende à demanda comercial, frente ao aumento na produção de queijos, aliado ao alto custo desse produto e às considerações éticas e religiosas associadas ao seu uso. Atualmente a maior parte da renina comercial é produzida a partir de fungos geneticamente modificados (Ahmed, Isam Ali Mohamed *et al.*, 2009; Jacob *et al.*, 2011). PAs coagulantes do leite de várias fontes vegetais tem sido estudadas, tais como: flores de *Pichia pastoris* (Feijoo-Siota, Rama, *et al.*, 2018), folhas de *Drosera capensis* (Butts *et al.*, 2016), tecidos de uva (raízes, caule, folhas e flores) (Guo *et al.*, 2013), flores de *Moringa oleífera* (Pontual *et al.*, 2012), flores de *Onopordum acanthium* L. (Brutti *et al.*, 2012), flores de *Cirsium vulgare* (Lufrano *et al.*, 2012), frutos de *Bromelia hieronymi* (Bruno *et al.*, 2010), suspensão de células de *Centaurea calcitrapa* (Raposo e Domingos, 2008), sementes de *Albizia lebbbeck* e *Helianthus annuus* (Egito *et al.*, 2007). Infelizmente, estes coalhos vegetais são inadequados para a produção de queijo devido a uma atividade proteolítica excessiva que reduz a produção de queijo e produz sabores amargos no produto final. Entre as enzimas vegetais relatadas por produzir produtos finais com sabor e texturas satisfatórios podemos citar as cardosinas de *Cynara cardunculus* (Llorente *et al.*, 2014). Uma variedade de queijos fabricados a partir de diferentes fontes de leite usando estas proteases vegetais estão disponíveis globalmente, com Espanha e Portugal contribuindo largamente para essas diferentes variedades (Rajagopalan e Sukumaran, 2018).

2.5.1 *Cynara Cardunculus* L.

Cynara Cardunculus L., vulgarmente conhecido por cardo, pertence à família Asteraceace, onde se incluem as variantes de cardo silvestre, a alcachofra e o cardo cultivado. É uma variedade espinhosa do cardo, que se assemelha à alcachofra e que, durante o Verão, produz grandes cabeças e uma flor roxa (Figura 2). Esta variedade de cardo cresce abundantemente em solos secos, pedregosos e não cultivados, na região sul e Nordeste de Portugal, que também tem sido identificada em diversas regiões da bacia Mediterrânica, Ilhas Canárias, Ilha da Madeira e no Nordeste Africano (Sousa e Malcata, 2002; O'mahony *et al.*, 2003; Correia, 2016)

Figura 2: Aspeto morfológico da *Cynara Cardunculus* L.. Fonte: Flora-on



A sua dispersão está relacionada com a sua adaptabilidade a uma grande variedade de condições edafo-climáticas. Portanto é uma planta que é capaz de crescer de forma espontânea em condições de *habitat* extremas, isto é, em temperaturas elevadas e estresse hídrico, que pode ser em zonas marginais de campos de cultura, em solos secos, rochosos e não cultivados (Sousa e Malcata, 2002).

A expansão de *Cynara cardunculus* L. remete para as zonas onde o extrato desta planta tem sido utilizado com sucesso no fabrico de queijos tradicionais de ovelha, ou seja, majoritariamente em países do Mediterrâneo, mais precisamente no Oeste Africano e no sul Europeu, sendo que Portugal e Espanha albergam a maior e mais variada produção (Roseiro *et al.*, 2003). Em Portugal podemos referir: o Queijo Serra da Estrela, o Queijo de Serpa, o Queijo de Nisa, o Queijo de Azeitão e o Queijo de Évora, quanto a Espanha temos os queijos Los Pedroches, La Serena, Torta del Casar, Manchego, Casar de Cáceres, por exemplo (Sousa *et al.*, 2001; Roseiro *et al.*, 2003; Galán *et al.*, 2008; Ramos, 2015)

A atividade de coagulação dessa planta (*C. cardunculus*) está relacionada com a presença de diferentes proteases aspárticas, que quebram a ligação Phe105-Met106 da κ -caseína. Estas proteases aspárticas são denominadas cardosina A e cardosina B, que se assemelham a quimosina e pepsina, respectivamente, em termos de atividade e especificidade (Silva *et al.*, 2003).

2.5.2 Cardosinas

As cardosinas são endopeptidases aspárticas (E.C.3.4.23) representam uma sub-classe de proteases, que hidrolisam ligações peptídicas. Estão presentes nos pistilos

maduros (Figura 3) da flor da *Cynara cardunculus* L. (família das Asteraceae), e a sua denominação deve-se ao nome português desta planta - cardo. Em 1995, Faro e colaboradores., demonstraram que a atividade coagulante do extrato aquoso dos pistilos de *Cynara cardunculus* L. devia à presença de uma proteinase aspártica, mas estudos posteriores revelaram a existência de duas enzimas que foram denominadas cardosina A, a mais abundante, e cardosina B, a menos abundante (Veríssimo *et al.*, 1996). Estas duas enzimas constituem cerca de 60% do conteúdo proteico nos pistilos maduros e são o primeiro exemplo de abundância de proteases nas plantas superiores.

Figura 3: Pistilos oriundos da flor do cardo (*Cynara cardunculos* L.).



Veríssimo *et al.*, (1996) distinguiram a cardosina A da cardosina B através da mobilidade relativa em géis de SDS-PAGE. Enquanto a cardosina A migra como duas cadeias de massa molecular aparente de 15 e 31 kDa, a cardosina B aparece com massas moleculares aparentes de 14 e 34 kDa. Verificaram diferenças na sequência dos resíduos de aminoácidos, concluindo serem produtos de genes distintos. Ambas são heterodiméricas e glicosiladas, ativas em pH entre 2 e 7, apresentando um pH ótimo a 4,7.

Apesar das diferenças de massa molecular aparente, de especificidade e de cinética enzimática, a nível de estrutura primária as cardosinas A e B, são bastante similares apresentando uma percentagem de homologia na ordem dos 70% (Vieira *et al.*, 2001). As cardosinas estão acumuladas dentro das flores (flóculos), nos vacúolos da papila estigmática e no interior das células epidérmicas do estilete (Faro *et al.*, 1995; Sousa e Malcata, 1996; Veríssimo *et al.*, 1996; Ramalho-Santos *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2003; Barbagallo *et al.*,

2006; Chazarra *et al.*, 2007; Galán *et al.*, 2008; Tejada *et al.*, 2008; Agboola *et al.*, 2009; Llorente *et al.*, 2014; Shah *et al.*, 2014).

Estas, como na maioria das outras proteases aspárticas, clivam preferencialmente peptídeos em bandas entre resíduos hidrofóbicos, a cardosina A hidrolisa o péptido na banda Leu15-Tyr16, Leu17-Val18 e Phe25-Tyr26, a clivagem pela cardosina B foi encontrada em Glu13-Ala14, Ala14- Leu15, Leu15-Tyr16, Leu17- Val18, Phe24-Phe25 e Phe25(Pereira *et al.*, 2008). A cardosina A, é responsável por coagular o leite e a cardosina B por fragmentar a caseína em pedaços cada vez menores durante a maturação do queijo, o que contribui para um queijo amanteigado (R.M.C *et al.*, 2000). A cardosina B, apesar de menos abundante na flor do cardo, apresenta uma maior atividade proteolítica e menor especificidade em relação à cardosina A (Narváez Andrade, 2006; Abreu, 2009). Em termos de especificidade e parâmetros cinéticos (pH 4,7, 37°C) a cardosina A é similar à quimosina, enquanto a cardosina B é similar à pepsina (Veríssimo *et al.*, 1996).

Os extratos das flores de duas outras espécies de *Cynara*, *C. humilis* e *C. scolymus*, também foram avaliados como coalhos eficazes (Llorente *et al.*, 2005; Sidrach *et al.*, 2005; Chazarra *et al.*, 2007; Llorente *et al.*, 2014; García *et al.*, 2015; Esposito *et al.*, 2016).

2.5.3 *Cynara scolymus*

As alcachofras (*Cynara scolymus* L.) são plantas perenes, sensíveis ao gelo, semelhantes ao cardo, com botões florais comestíveis, que brotam da porção terminal da haste principal e nas hastes laterais. Cada flor em botão se assemelha a uma pinha verde-escura, de 7 a 10 cm de diâmetro, redonda, mas levemente alongada. Várias brácteas verdes pontudas semelhantes a couro dobram-se em torno de uma flor azul-púrpura (Figura 4). A base de cada bráctea é a porção carnuda comestível, junto com o centro carnoso da alcachofra sobre a qual a flor e as brácteas são carregadas (Sidrach *et al.*, 2005). *Cynara scolymus* L. é amplamente distribuída nas regiões mediterrâneas, além de abundantemente cultivada nos Estados Unidos, Argentina e Nova Zelândia. Além da parte comestível (cabeça) uma variedade de órgãos tem sido amplamente utilizada na medicina popular contra distúrbios dispépticos e hepáticos (Llorente *et al.*, 2005).

Figura 4: Aspeto morfológico da *Cynara scolymus* L.. Fonte: Flora-on



No Brasil, a alcachofra foi introduzida pelos imigrantes europeus, principalmente italianos, há cerca de 100 anos, no início do século XX. É cultivada no sul e sudeste, sendo São Paulo o maior produtor, responsável por 80% da área cultivada do país. A variedade mais utilizada nessa região é a “Roxa de São Roque”, que produz capítulos roxos e é destinado principalmente a consumo *in natura* (Costa, 2011).

As cardosinas, enzimas com capacidade de hidrolisar a k – caseína, também são encontradas em flores de alcachofra (*C. scolymus* L.) (Sidrach *et al.*, 2005). Pesquisas indicam que extratos vegetais derivados de flores de alcachofra apresentam grande potencial para uso como coagulantes e podem ser utilizados na fabricação de queijos industriais, como foi demonstrado por Llorente *et al.* (2014), que concluíram que o extrato de flor de *C. scolymus* L., além de ser capaz de coagular o leite, era adequado para a fabricação de queijos do tipo Gouda (Llorente *et al.*, 2005; García *et al.*, 2015).

Na produção do queijo o extrato bruto é adicionado ao leite sem nenhum tratamento preliminar, o que pode prejudicar a uniformidade dos produtos. Isso pode ser consequência da não uniformidade do fornecimento de enzimas para catalisar a reação, tanto pela variabilidade das características da flor usada no processo (que depende de época do ano, condições de cultivo, variedade), quanto pelas técnicas de obtenção e aplicação do extrato bruto. Tentando minimizar esses inconvenientes, a etapa de purificação torna-se necessária. Dentre os diferentes processos de purificação, um que tem chamado atenção pela sua

simplicidade e potencialidade de aplicação é o Sistemas Aquosos Bifásicos (SAB), uma ramificação da extração líquido-líquido.

2.6 Purificação de proteases

A purificação enzimática é um processo complexo que elimina constituintes indesejáveis do meio, por exemplo, a elevada proporção de água, moléculas orgânicas e inorgânicas, outros constituintes que não a proteína de interesse (PESSOA JR.; KILIKIAN, 2005). Assim, a enzima de interesse é isolada do meio e suas características específicas podem ser determinadas. Na Tabela 2 estão listados alguns estudos de purificação de proteases.

Tabela 2: Tipos de proteases e seus respectivos métodos de purificação.

Protease	Fonte	Método de purificação	Referências
Cisteínica	Ficus johannis	Cromatografia de troca catiônica	(Afsharnezhad <i>et al.</i> , 2019)
Cisteínica	Tamarillo	Precipitação com sulfato de amônio seguido de cromatografia de troca iônica (DEAE – Sepharose)	(Li <i>et al.</i> , 2018)
Serínica	Manga	Sistema aquoso bifásico	(Amid <i>et al.</i> , 2012)
Serínica	Morango	Cromatografia por afinidade	(Alici e Arabaci, 2018)
Serínica	Wrightia Tinctoria	Precipitação com sulfato de amônio, filtração em gel e cromatografia em coluna de troca iônica	(Rajagopalan e Sukumaran, 2018)
Cisteínica	Cissus quadrangularis L.	Precipitação com sulfato de amônio, cromatografia em coluna de filtração em gel e cromatografia de troca iônica	(Muthu <i>et al.</i> , 2017)
Aspártica	Withania coagulans	Precipitação com sulfato de amônio seguido de cromatografia de troca catiônica	(Salehi <i>et al.</i> , 2017)
Cisteínica	Pyrus pyrifolia	Precipitação com etanol, sistema aquoso bifásico ou cromatografia de troca iônica	(Nam <i>et al.</i> , 2016)
Serínica	Solanum aculeatissimum Jacq	Precipitação com sulfato de amônio e cromatografia por afinidade	(Krishnan e Murugan, 2015)

Cisteínica	Moringa Oleifera	Cromatografia de troca iônica e filtração em gel (Sephadex G75)	(Pontual <i>et al.</i> , 2012)
Serínica	Ficus carica var. Brown Turkey	Cromatografia em gel e covalente	(Raskovic <i>et al.</i> , 2014)
Serínica	Solanum dubium Fresen	Precipitação com sulfato de amônio cromatografia de troca iônica e filtração em gel	(Ahmed, Isam a Mohamed <i>et al.</i> , 2009)
Serínica	Kachri fruit	Cromatografia de troca iônica	(Asif-Ullah <i>et al.</i> , 2006)
Aspartica	Ficus racemosa (L.)	Precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de exclusão molecular e cromatografia de troca iônica	(Devaraj <i>et al.</i> , 2008)

Cynara sp. extrato tem sido amplamente utilizado há séculos para fazer queijos tradicionais de leite de ovelha portugueses e espanhóis, estudos de purificação foram realizadas para elucidar as características estruturais das proteinases aspárticas de *Cynara sp.*

Pina et al. (2003) purificaram protease coagulantes do leite a partir de flores de *Cynara cardunculus* L. através de cromatografia de troca iônica (Q-Sepharose). A enzima apresentou alta estabilidade e atividade proteolítica em pH 5,0.

Silva e Malcata (2003) purificaram proteases coagulantes do leite a partir *Cynara cardunculus* através filtração em gel seguida de cromatografia de troca iônica. OS autores otimizaram o tempo de coagulação enzimática.

Silva et al. (2003) avaliaram as propriedades geleificantes de proteases coagulantes do leite a partir de *Cynara cardunculus* através de cromatografia de troca iônica.

Sidrach et al. (2005) purificaram proteases coagulantes do leite a partir de flores secas de *Cynara scolymus* através de ultrafiltração, cromatografia de troca iônica (Q-Sepharose Fast Flow), diálise overnight e novamente cromatografia de troca iônica (Q-Sepharose Fast Flow). A enzima apresentou maior atividade proteolítica a 70°C e em pH 5.

LLorente et al.(2005) purificaram proteases aspárticas coagulantes do leite a partir de *Cynara scolymus* através de cromatografia de troca iônica (DEAE-Sepharose Fast Flow). A enzima apresentou maior atividade proteolítica em pH 5 e efeito inibidor da pepstatina.

Esposito et al. (2016) purificaram proteases coagulantes do leite presentes em folhas de *Cynara scolymus* e em flores de *Carduus defloratus* através de precipitação com sulfato de amônio e posteriormente imobilizada covalentemente usando suporte poliacrílico contendo grupos polares epoxy. Ambas as enzimas apresentaram ótimo pH em torno de 5.

2.7 Referências Bibliográficas

- Abrams, D. S. and J. M. Prausnitz (1975). "Statistical thermodynamics of liquid mixtures: a new expression for the excess Gibbs energy of partly or completely miscible systems." *AIChE Journal* **21**(1): 116-128.
- Abreu, S. R. D. Obtenção e caracterização de linhas celulares de BY-2 a expressar cardosinas. 2009.
- Adetunji, V. and O. Salawu (2008). "West African soft cheese 'wara' processed with *Calotropis procera* and *Carica papaya*: A comparative assessment of nutritional values." *African journal of Biotechnology* **7**(18).
- Agboola, S. O. et al. Can the use of Australian cardoon (*Cynara Cardunculus* L.) coagulant overcome the quality problems associated with cheese made from ultrafiltered milk? **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 8, p. 1352-1359, 2009/10/01/ 2009. ISSN 0023-6438.
- Ahmed, I. A. M., I. Morishima, et al. (2009). "Characterisation of partially purified milk-clotting enzyme from *Solanum dubium* Fresen seeds." *Food Chemistry* **116**(2): 395-400.
- Albertsson, P.-Å. (1958). "Partition of proteins in liquid polymer-polymer two-phase systems." *Nature* **182**(4637): 709.
- Ananthapadmanabhan, K. P. and E. D. Goddard (1987). "Aqueous biphasic formation in polyethylene oxide-inorganic salt systems." *Langmuir* **3**(1): 25-31.
- Anusha, R., M. K. Singh, et al. (2014). "Characterisation of potential milk coagulants from *Calotropis gigantea* plant parts and their hydrolytic pattern of bovine casein." *European Food Research and Technology* **238**(6): 997-1006.
- Arshad, M. S., J.-H. Kwon, et al. (2016). "Plant and bacterial proteases: A key towards improving meat tenderization, a mini review." *Cogent Food & Agriculture* **2**(1).
- Aznar, M. (1996). Equilíbrio líquido-vapor de sistemas com eletrólitos via contribuição de grupo, PEQ/COPPE/UFRJ. PEQ. Rio de Janeiro, UFRJ. **Tese de Doutorado**.
- BARBOSA, A. A. et al. 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, n. 1, p. 3-11, 2016/01/14 2016. ISSN 0021-9568.
- BANIK, R. et al. Technological aspects of extractive fermentation using aqueous two-phase systems. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 4, p. 337-348, 2003. ISSN 0959-3993.
- Bruno, M. A., C. M. Lazza, et al. (2010). "Milk clotting and proteolytic activity of an enzyme preparation from *Bromelia hieronymi* fruits." *LWT - Food Science and Technology* **43**(4): 695-701.

- Brutti, C. B., M. F. Pardo, et al. (2012). "Onopordum acanthium L. (Asteraceae) flowers as coagulating agent for cheesemaking." LWT - Food Science and Technology **45**(2): 172-179.
- Butts, C. T., J. C. Bierma, et al. (2016). "Novel proteases from the genome of the carnivorous plant *Drosera capensis*: Structural prediction and comparative analysis." Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics **84**(10): 1517-1533.
- Carvalho, C. P., J. S. R. Coimbra, et al. (2007). "Equilibrium Data for PEG 4000 + Salt + Water Systems from (278.15 to 318.15) K." Journal of Chemical & Engineering Data **52**(2): 351-356.
- Chakraborty, A.; Sen, K. Impact of pH and temperature on phase diagrams of different aqueous biphasic systems. **Journal of Chromatography A**, v. 1433, p. 41-55, 2016/02/12/2016. ISSN 0021-9673.
- Chazarra, S., L. Sidrach, et al. (2007). "Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara Scolymus*, L.) flowers." International Dairy Journal **17**(12): 1393-1400.
- Chow, Y. H. et al. Characterization of bovine serum albumin partitioning behaviors in polymer-salt aqueous two-phase systems. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 120, n. 1, p. 85-90, 2015. ISSN 1389-1723.
- Coimbra, J. S. R and Teixeira, J. A (2009). Bioseparation Processes. Engineering Aspects of Milk and Dairy Products, CRC Press: 27-31.
- Costa, A. R. d. (2011). Caracterização morfofisiológica e micropropagação de alcachofra, Universidade de Passo Fundo.
- DAHL, S.; FREDENSLUND, A.; RASMUSSEN, P. The MHV2 model: a UNIFAC-based equation of state model for prediction of gas solubility and vapor-liquid equilibria at low and high pressures. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 30, n. 8, p. 1936-1945, 1991/08/01 1991. ISSN 0888-5885. DUARTE, A. W. F. et al. Liquid-liquid extraction of lipase produced by psychrotrophic yeast *Leucosporidium scottii* L117 using aqueous two-phase systems. **Separation and Purification Technology**, v. 156, Part 2, p. 215-225, 2015. ISSN 1383-5866.
- Desai, R. K., M. Streefland, et al. (2016). Extraction of proteins with ABS. Ionic-Liquid-Based Aqueous Biphasic Systems, Springer: 123-134.
- Domsalla, A. and M. F. Melzig (2008). "Occurrence and Properties of Proteases in Plant Latices." Planta Med **74**(07): 699-711.
- DOS SANTOS, N. V. et al. Liquid-liquid extraction of biopharmaceuticals from fermented broth: trends and future prospects. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 93, n. 7, p. 1845-1863, 2018. ISSN 0268-2575.
- Egito, A. S., Girardet, J. M., Laguna, L. L. E., Poirson, C., Molle, D. Miclo, L., Humbert, G., Gaillard, J. L. (2007). "Milk-clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine κ -casein." International Dairy Journal **17**(7): 816-825.
- Esposito, M., Di Pierro, P., Dejonghe, W., Mariniello, L., Portal, R. (2016). "Enzymatic milk clotting activity in artichoke (*Cynara Scolymus*) leaves and alpine thistle (*Carduus defloratus*) flowers. Immobilization of alpine thistle aspartic protease." Food chemistry **204**: 115-121.
- Faro, C., Veríssimo, P., Yingzhang, L., Tang, J., Pires, E. (1995). Cardosin A and B, Aspartic Proteases from the Flowers of Cardoon. Aspartic Proteinases: Structure, Function, Biology, and Biomedical Implications. K. Takahashi. Boston, MA, Springer US: 373-377.

- Feijoo-Siota, L., Rama, J. L. R., Sanches, P. A., Villa, T. G. (2018). "Expression, activation and processing of a novel plant milk-clotting aspartic protease in *Pichia pastoris*." Journal of biotechnology **268**: 28-39.
- Fernández-Salguero, J., Tejada L. "Use of powdered vegetable coagulant in the manufacture of ewe's milk cheeses." Journal of the Science of Food and Agriculture **82**(4): 464-468.
- Franco, T., Andrews, B. A., Cascone, O., Hodgson, C., Andrews, A. T., Asenjo, J. A. (1990). Affinity Separation of Proteins in Aqueous Two-Phase Systems. Separations for Biotechnology 2. D. L. Pyle. Dordrecht, Springer Netherlands: 335-344.
- Fredenslund, A., Jones, R. L., Prausnitz, J. M. (1975). "Group-contribution estimation of activity coefficients in nonideal liquid mixtures." AIChE Journal **21**(6): 1086-1099.
- García, V., Rovira, S., Boutoial, K., Álvarez, D., López, M. B. (2015). "A comparison of the use of thistle (*Cynara Cardunculus* L.) and artichoke (*Cynara Scolymus* L.) aqueous extracts for milk coagulation." Dairy science & technology **95**(2): 197-208.
- Gmehling, J. (1986). "Group contribution methods for the estimation of activity coefficients." Fluid Phase Equilibria **30**: 119-134.
- González-Rábade, N., Badillo-Corona, J. A., Aranda - Barradas, J. S., Oliver - Salvador, M. C. (2011). "Production of plant proteases in vivo and in vitro — A review." Biotechnology Advances **29**(6): 983-996.
- Graber, T. A., Gálvez, M. E. , Galleguillos, H. R., Benedi, J. A. (2004). "Liquid–Liquid Equilibrium of the Aqueous Two-Phase System Water + PEG 4000 + Lithium Sulfate at Different Temperatures. Experimental Determination and Correlation." Journal of Chemical & Engineering Data **49**(6): 1661-1664.
- Guggenheim, E. and C. P. Mixtures "Oxford (1952)." Chap 4: 29-87.
- Guo, R., Xu, X. , Carole, B., Li, X, Gao, M., Zheng, Y., Wang, X. (2013). "Genome-wide identification, evolutionary and expression analysis of the aspartic protease gene superfamily in grape." BMC genomics **14**(1): 554.
- Gutowski, K. E., Broker, G. A., Willauer, H. D., Huddleson, J. G., Swalloski, R., Holbrey, J. D., Rogers, R. D. (2003). "Controlling the aqueous miscibility of ionic liquids: aqueous biphasic systems of water-miscible ionic liquids and water-structuring salts for recycle, metathesis, and separations." Journal of the American Chemical Society **125**(22): 6632-6633.
- Haghtalab, A. and B. Mokhtarani (2004). "The new experimental data and a new thermodynamic model based on group contribution for correlation liquid–liquid equilibria in aqueous two-phase systems of PEG and (K₂HPO₄ or Na₂SO₄)." Fluid Phase Equilibria **215**(2): 151-161.
- Hansen, H. K., Rasmussen, P., Fredenslund, A., Schieller, M., Gmehling, J. (1991). "Vapor-liquid equilibria by UNIFAC group contribution. 5. Revision and extension." Industrial & Engineering Chemistry Research **30**(10): 2352-2355.
- Herskowitz, M. and M. Gottlieb (1981). "UNIFAC group contribution method for silicone compounds." Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development **20**(2): 407-409.
- JACINTO, M. J. et al. Optimization and miniaturization of aqueous two phase systems for the purification of recombinant human immunodeficiency virus-like particles from a CHO cell supernatant. **Separation and Purification Technology**, v. 154, p. 27-35, 2015. ISSN 1383-5866.

- JACOB, M., JAROS, D., ROHM, H. (2011). "Recent advances in milk clotting enzymes." International Journal of Dairy Technology **64**(1): 14-33.
- JAMPANI, C.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Differential partitioning for purification of anthocyanins from Brassica oleracea L. **Separation and Purification Technology**, v. 151, p. 57-65, 2015. ISSN 1383-5866.
- Jozala, A. F., Geraldés, D. C., Tundisi, L. L., Feitosa, V. A., Breyer, C. A., Cardoso, S. L., Mazzola, P. G., Nascimento, L. O., Rangel-Yagui, C. O., Magalhães, P. O., Oliveira, M. A., Pessoa Jr., A. P. (2016). "Biopharmaceuticals from microorganisms: from production to purification." brazilian journal of microbiology **47**: 51-63.
- Kikic, I., Fermeglia, M., Rasmussen, P. (1991) Unifac prediction of vapor—liquid equilibria in mixed solvent—salt systems. *Chemical Engineering Science*, v. 46, n. 11, p. 2775-2780.
- Kim, E.-K., Kim, Y.-S., Hwang, J. W., Kang, S. H., Choi, D. K., Lee, J. S., Moon, S. H., Jeon, B. T., Park, P. J. (2013). "Purification of a novel nitric oxide inhibitory peptide derived from enzymatic hydrolysates of *Mytilus coruscus*." Fish & Shellfish Immunology **34**(6): 1416-1420.
- Kiron, V., Phromkunthong, W., Huntley, M., Archibald, I., Scheemaker, G. (2012). "Marine microalgae from biorefinery as a potential feed protein source for Atlantic salmon, common carp and whiteleg shrimp." Aquaculture Nutrition **18**(5): 521-531.
- Labrou, N. E. (2014). Protein Downstream Processing, Springer.
- LLORENTE, B.; BRUTTI, C.; CAFFINI, N. (2005). Purification and Characterization of a Milk-Clotting Aspartic Proteinase from Globe Artichoke (*Cynara scolymus* L.). 8182-9.
- Llorente, B. E., W. D. Obregón, et al. (2014). "Use of artichoke (*Cynara Scolymus*) flower extract as a substitute for bovine rennet in the manufacture of Gouda-type cheese: Characterization of aspartic proteases." Food Chemistry **159**: 55-63.
- Lo Piero, A. R., I. Puglisi, et al. (2002). "Characterization of "Lettucine", a Serine-like Protease from *Lactuca sativa* Leaves, as a Novel Enzyme for Milk Clotting." Journal of Agricultural and Food Chemistry **50**(8): 2439-2443.
- Lufrano, D., R. Faro, et al. (2012). "Molecular cloning and characterization of procirsin, an active aspartic protease precursor from *Cirsium vulgare* (Asteraceae)." Phytochemistry **81**: 7-18.
- Macedo, E. A., U. Weidlich, et al. (1983). "Vapor-liquid equilibria by UNIFAC group contribution. Revision and extension. 3." Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development **22**(4): 676-678.
- MAGESTE, A. B. et al. Aqueous two-phase systems: An efficient, environmentally safe and economically viable method for purification of natural dye carmine. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 45, p. 7623-7629, 2009. ISSN 0021-9673.
- Magnussen, T., P. Rasmussen, et al. (1981). "UNIFAC parameter table for prediction of liquid-liquid equilibria." Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development **20**(2): 331-339.
- Markets, M. a. (2018). "Food Enzymes Market by Type (Carbohydrase, Protease, Lipase), Application (Beverages, Bakery Products, Dairy Products, Confectionery Products, Processed Foods), Formulation (Lyophilized Powder and Liquid), Source, and Region - Global Forecast to 2023."

- Mazzola, P. G., A. M. Lopes, et al. (2008). "Liquid-liquid extraction of biomolecules: an overview and update of the main techniques." Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology **83**(2): 143-157.
- Merheb-Dini, C., E. Gomes, et al. (2010). "Production and characterization of a milk-clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31: (Milk-clotting protease from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31)." Food Chemistry **120**(1): 87-93.
- Molino, J. V. D., D. d. A. Viana Marques, et al. (2013). "Different types of aqueous two-phase systems for biomolecule and bioparticle extraction and purification." Biotechnology progress **29**(6): 1343-1353.
- Moraes, C., A. B. Simon, et al. (2013). "Aqueous two-phase printing of cell-containing contractile collagen microgels." Biomaterials **34**(37): 9623-9631.
- Nollet, L. M., F. Toldrá, et al. (2012). Food biochemistry and food processing, John Wiley & Sons.
- Novelli, P. K., M. M. Barros, et al. (2016). "Novel inexpensive fungi proteases: Production by solid state fermentation and characterization." Food Chemistry **198**: 119-124.
- OISHI, T.; PRAUSNITZ, J. M. Estimation of Solvent Activities in Polymer Solutions Using a Group-Contribution Method. **Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development**, v. 17, n. 3, p. 333-339, 1978/07/01 1978. ISSN 0196-4305.
- O'MAHONY, J.; SOUSA-GALLAGHER, M. J.; MCSWEENEY. **O'Mahony, J. A., Sousa, M. J., McSweeney, P. L. H. Proteolysis in miniature Cheddar-type cheeses made using Blends of chymosin and *Cynara Cardunculus* proteinases as coagulant. *Int. J. Dairy Technol.*, **56** (1), 52-58 (2003). 2003. 52-58.**
- Paula, C., V. André, et al. (2016). "Effect of different thistle flower ecotypes as milk-clotting in Serra da Estrela cheese." Nutrition & Food Science **46**(4): 458-475.
- PEREIRA, C. S. et al. Cardosins in postembryonic development of cardoon: towards an elucidation of the biological function of plant aspartic proteinases. **Protoplasma**, v. 232, n. 3-4, p. 203-213, 2008. ISSN 0033-183X.
- Peters, T. J. (1987). "Partition of cell particles and macromolecules: Separation and purification of biomolecules, cell organelles, membranes and cells in aqueous polymer two phase systems and their use in biochemical analysis and biotechnology. P-A. Albertsson. Third Edition, 1986, John Wiley and Sons, Chichester, £61.35 pages 346." Cell Biochemistry and Function **5**(3): 233-234.
- Pontual, E. V., B. E. A. Carvalho, et al. (2012). "Caseinolytic and milk-clotting activities from *Moringa oleifera* flowers." Food Chemistry **135**(3): 1848-1854.
- PRATIWI, A. I. et al. Extraction of succinic acid by aqueous two-phase system using alcohols/salts and ionic liquids/salts. **Separation and Purification Technology**, v. 155, p. 127-132, 2015.
- Raja, S., V. R. Murty, et al. (2011). "Aqueous two phase systems for the recovery of biomolecules—a review." Sci Technol **1**(1): 7-16.
- Rajagopalan, A. and B. O. Sukumaran (2018). "Three phase partitioning to concentrate milk clotting proteases from *Wrightia tinctoria* R. Br and its characterization." International Journal of Biological Macromolecules **118**: 279-288.

- Ramakrishna, V., S. Rajasekhar, et al. (2010). "Identification and purification of metalloprotease from dry grass pea (*Lathyrus sativus* L.) seeds." Applied biochemistry and biotechnology **160**(1): 63.
- Raposo, S. and A. Domingos (2008). "Purification and characterization milk-clotting aspartic proteinases from *Centaurea calcitrapa* cell suspension cultures." Process Biochemistry **43**(2): 139-144.
- RAMOS, P. A. B. **Chemical Characterization and Evaluation of Biological Activity of *Cynara Cardunculus* Extractable Compounds**. 2015. Universidade de Aveiro (Portugal)
- Rawlings, N. D., M. Waller, et al. (2013). "MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors." Nucleic acids research **42**(D1): D503-D509.
- Reid, R. C., J. M. Prausnitz, et al. (1987). "The properties of gases and liquids."
- RENON, H.; PRAUSNITZ, J. M. Local compositions in thermodynamic excess functions for liquid mixtures. AIChE Journal, v. 14, n. 1, p. 135-144, 1968. ISSN 0001-1541.
- R.M.C, R. et al. **Queijo Serra da Estrela-Processos tradicionais e inovações tecnológicas**. 2000. ISBN 168413/01.
- Rosa, P., A. Azevedo, et al. (2011). "Aqueous two-phase extraction as a platform in the biomanufacturing industry: economical and environmental sustainability." Biotechnology advances **29**(6): 559-567.
- Rosa, P., I. Ferreira, et al. (2010). "Aqueous two-phase systems: a viable platform in the manufacturing of biopharmaceuticals." Journal of Chromatography A **1217**(16): 2296-2305.
- ROSEIRO, L. et al. **Cheesemaking with vegetable coagulants - The use of *Cynara L.* for the production of ovine milk cheeses**. 2003. 76-85.
- SANTESSON, S. et al. Affinity Two-Phase Partitioning in Acoustically Levitated Drops. Analytical Chemistry, v. 76, n. 2, p. 303-308, 2004/01/01 2004. ISSN 0003-2700. Disponível em: < <https://doi.org/10.1021/ac034951h> >.
- SARUBBO, L. A. (2000). Caracterização de um novo sistema bifásico aquoso e aplicação em extração de proteínas com coluna de discos perfurados rotativos. Departamento de Engenharia Química. Campinas, Universidade Estadual de Campinas. **Tese de Doutorado**: 174.
- Schwenzfeier, A., P. A. Wierenga, et al. (2011). "Isolation and characterization of soluble protein from the green microalgae *Tetraselmis* sp." Bioresource technology **102**(19): 9121-9127.
- SHAHBAZ MOHAMMADI, H. et al. Response surface methodology to optimize partition and purification of two recombinant oxidoreductase enzymes, glucose dehydrogenase and d-galactose dehydrogenase in aqueous two-phase systems. **Protein Expression and Purification**, v. 108, p. 41-47, 2015. ISSN 1046-5928.
- Sharif, M. K., M. Saleem, et al. (2018). Chapter 15 - Food Materials Science in Egg Powder Industry. Role of Materials Science in Food Bioengineering. A. M. Grumezescu and A. M. Holban, Academic Press: 505-537.
- Sidrach, L., G. Canovas, et al. (2005). Purification of cynarases from artichoke (*Cynara Scolymus* L.): Enzymatic properties of cynarase A.
- Silva, L. H. M. d. and W. Loh (2006). "Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas." Química Nova **29**: 1345-1351.
- Singh, R., A. Mittal, et al. (2016). "Microbial protease in commercial applications." J Pharm Chem Biol Sci **4**(3): 365-374.

- SILVA, M. F. F. et al. Integrated purification of monoclonal antibodies directly from cell culture medium with aqueous two-phase systems. **Separation and Purification Technology**, v. 132, p. 330-335, 2014. ISSN 1383-5866.
- SILVA, L. H. M. D. et al. PEO-[M(CN)₅NO]_x- (M=Fe, Mn or Cr) Interaction as driving force in the partitioning of the pentacyanonitrosylmetallate anion in ATPS: The strong effect of the central atom. **Journal Physical Chemical. B**, v. 112, p. 11669-11678, 2008.
- Snyder, S. M., K. D. Cole, et al. (1992). "Phase compositions, viscosities, and densities for aqueous two-phase systems composed of polyethylene glycol and various salts at 25 .degree.C." Journal of Chemical & Engineering Data **37**(2): 268-274.
- SOUSA, M. J.; MALCATA, F. X. Advances in the role of a plant coagulant (*Cynara Cardunculus*) in vitro and during ripening of cheeses from several milk species. **Lait**, v. 82, n. 2, p. 151-170, 2002.
- SOUSA, M.; ARDÖ, Y.; MCSWEENEY, P. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 4-7, p. 327-345, 2001. ISSN 0958-6946.
- Tiegs, D., P. Rasmussen, et al. (1987). "Vapor-liquid equilibria by UNIFAC group contribution. 4. Revision and extension." Industrial & Engineering Chemistry Research **26**(1): 159-161.
- Verdoes, M. and S. H. Verhelst (2016). "Detection of protease activity in cells and animals." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics **1864**(1): 130-142.
- Walter, H. (2012). Partitioning In Aqueous Two – Phase System: Theory, Methods, Uses, And Applications To Biotechnology, Elsevier Science.
- WAZIRI, S. M.; ABU-SHARKH, B. F.; ALI, S. A. The effect of pH and salt concentration on the coexistence curves of aqueous two-phase systems containing a pH responsive copolymer and polyethylene glycol. **Fluid Phase Equilibria**, v. 205, n. 2, p. 275-290, 2003/04/01/ 2003. ISSN 0378-3812.
- Wilson, G. and C. Deal (1962). "Activity coefficients and molecular structure. Activity coefficients in changing environments-solutions of groups." Industrial & Engineering Chemistry Fundamentals **1**(1): 20-23.
- WU, Y. et al. Extraction and preliminary purification of anthocyanins from grape juice in aqueous two-phase system. **Separation and Purification Technology**, v. 124, p. 170-178, 2014. ISSN 1383-5866.
- Zafarani-Moattar, M. T. and J. Gasemi (2002). "Liquid–liquid equilibria of aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol and ammonium dihydrogen phosphate or diammonium hydrogen phosphate. Experiment and correlation." Fluid Phase Equilibria **198**(2): 281-291.
- Zafarani-Moattar, M. T. and A. Hamidi (2003). "Liquid– liquid equilibria of aqueous two-phase poly (ethylene glycol)– potassium citrate system." Journal of Chemical & Engineering Data **48**(2): 262-265.
- Zafarani-Moattar, M. T. and A. A. Hamidi (2003). "Liquid–Liquid Equilibria of Aqueous Two-Phase Poly(ethylene glycol)–Potassium Citrate System." Journal of Chemical & Engineering Data **48**(2): 262-265.
- Zafarani-Moattar, M. T. and R. Sadeghi (2001). "Liquid–liquid equilibria of aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol and sodium dihydrogen phosphate or disodium hydrogen phosphate: Experiment and correlation." Fluid Phase Equilibria **181**(1): 95-112.

Zafarani-Moattar, M. T. and R. Sadeghi (2004). "Phase Behavior of Aqueous Two-Phase PEG + NaOH System at Different Temperatures." Journal of Chemical & Engineering Data **49**(2): 297-300.

Zarkarian, J. A., F. E. Anderson, et al. (1979). "UNIFAC Parameters from Gas-Liquid Chromatographic Data." Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development **18**(4): 657-661.

Zaslavsky, B. Y. (1994). Aqueous Two-Phase Partitioning: Physical Chemistry and Bioanalytical Applications, Taylor & Francis.

II - OBJETIVOS GERAIS

2.8 Objetivo geral

Obtenção de diagramas de equilíbrio para novos sistemas formados por PEG 8000g/mol e diferentes sais (sulfato de sódio, sulfato de amônio e sulfato de magnésio) e determinar o coeficiente de partição de proteases.

2.9 Objetivos específicos

- Obter dados de equilíbrio de SAB formados por PEG + sais de sulfato + água em pH 2;
- Avaliar a influência da temperatura nos dados de equilíbrio;
- Avaliar a influência dos cátions nos dados de equilíbrio;
- Aplicar modelagem termodinâmica dos dados de equilíbrio utilizando o modelo UNIFAC
- Avaliar o efeito da partição de proteases presente em extrato dos pistilos da alcachofra e da flor de cardo em SAB;

III - CAPÍTULO 1 - Thermodynamic Modeling of Aqueous Two – Phase Systems composed to macromolecules and sulfate salts in pH 2.0²

Vanessa Santos Sampaio¹, Annie Nolasco Alves¹, Evaldo Cardozo de Souza Júnior¹, Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo², Sérgio de Souza Castro³, Rafael da Costa Ilhéu Fontan¹, Cristiane Martins Veloso¹, Sibelli Passini Barbosa Ferrão⁴, Renata Cristina Ferreira Bonomo*

¹ *Processes Engineering Laboratory. State University of Bahia Southwest, Itapetinga, Bahia, Zip Code 45700-000, Brazil.*

² *Department of Food Science, Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Zip Code 37200-000, Brazil.*

³ *Department of Exact and Natural Sciences, State University of Bahia Southwest, Itapetinga, Bahia, Zip Code 45700-000, Brazil.*

⁴ *Department of Animal and Rural Technology, State University of Bahia Southwest, Itapetinga, Bahia, Zip Code 45700-000, Brazil.*

* Corresponding author: Renata Cristina Ferreira Bonomo, Department of Animal and Rural Technology, State University of Bahia Southwest, Itapetinga, Bahia, Zip Code 45700-000, Brazil.

E-mail addresses: bonomorcf@yahoo.com.br

Tel.: +55-77-3261-8659

² Artigo enviado para o Journal of Chemical Engineering Data

ABSTRACT

Liquid - liquid equilibrium data of aqueous two phase systems (ATPS) composed of polyethylene glycol (PEG) 8000 + sodium sulfate + water, PEG 8000 + ammonium sulfate + water and PEG 8000 + magnesium sulfate + water at $T = (298.15, 308.15 \text{ and } 318.15) \text{ K}$ and pH 2.0 were determined. The Universal Function Activity Coefficient (UNIFAC) model was correlated to the experimental tie - line data, and the root - mean - square - deviations (RMSD) between experimental and calculated data were considered in the calculation. The effect of temperature and cation type on the spinodal curves were evaluated. The salting-out effect was studied by the determination of the effective excluded volume (EEV) Rising temperature resulted in an increase in the biphasic region and tie-lines. Regarding to the cation type, the phase-separation abilities followed the order $\text{Mg}^{2+} > \text{Na}^{+} > (\text{NH}_4)^{+}$. Increases in the overall composition of the systems resulted in increased tie-line lengths. The tie-line slope absolute values also tended to rise with increasing temperature. Increasing the ATPS constituent concentrations resulted in an increase in the phase densities. The increased in temperature resulted in an increase in the salting - out effect. The exclusion volume values increased in the following order $(\text{NH}_4)^{+} < \text{Na}^{+} < \text{Mg}^{2+}$. The overall mean deviation between the experimental and correlated LLE compositions for the PEG 8000 + ammonium sulfate + water, PEG 8000 + magnesium sulfate + water and PEG 8000 g mol^{-1} + sodium sulfate + water was 3.901%. The results of the UNIFAC model agree with the experimental tie-line values. This allows the use of this model to obtain reliable data for this system, and thus, reducing the number of experiments to be performed for a processing design.

1. INTRODUCTION

The liquid-liquid extraction (LLE) using aqueous two-phase system (ATPS) has become a consolidated tool used in separation and purification technology. For an effective application of the ATPS as a separation strategy, it is essential to determine liquid-liquid equilibrium data, since this information provides more knowledge about the phases behavior in the systems, which facilitates the understanding of the mechanisms involved in the biomolecules partition¹. For this, the experimental determination of liquid-liquid equilibrium data becomes essential.²

Several works have been found that determine the liquid-liquid experimental data for polymer-salt systems.²⁻⁸. These include work performed by Castro and Aznar⁹ who determined liquid-liquid equilibrium data for ATPS polyethylene glycol (PEG) 8000 and magnesium sulfate or PEG 8000 and sodium sulfate at 308.15 K and by Cunha and Aznar¹⁰, who determined the experimental data for the systems containing PEG 8000 + sodium sulfate and PEG 8000 + magnesium sulfate at temperatures of 298.15 K and 323.15 K. In both works, the researchers correlated the experimental data of LLE with a mass-fraction-based NRTL activity coefficient model with the estimation new interaction parameters by the Simplex method.

There are many published papers about equilibrium data for ATPS PEG-salt. However, the number of studies of determination of liquid-liquid equilibrium data, molar exclusion volume using the model of the effective excluded volume (EEV) and thermodynamic modeling of systems PEG 8000 and sulfate salts at temperatures of 298.15 K, 308.15 K and 318.15 K associated with low pH values of pH 2.0 are scarce. This is especially true for ammonium sulfate salt, which is not yet reported in the literature. Studies in these experimental conditions are attractive for the separation of biomolecules that present stability at low pH such as the anthocyanins¹¹⁻¹³ and acid proteases^{14, 15} that are more stable under acidic conditions and have been added to food products due to their antioxidant and anti-

inflammatory qualities¹³⁻¹⁵. ATPS at pH 2 have higher hydrogen concentration which can improve the partition of some proteins that are not denatured at this pH. Increasing charges on the protein surface increase its solubility and may improve its transfer to a preferred phase^{16, 17}.

The Universal Functional Activity Coefficient (UNIFAC) model was originally developed for liquid-vapor equilibrium prediction; however, due to its flexibility and reliability, it was applied to a wide variety of cases.¹⁸⁻²¹ Other thermodynamic models such as UNIQUAC, ASOG, NRTL also allow estimation of the contribution of the groups and can be used for aqueous two-phase systems.^{10, 22-24} A greater emphasis is given to the UNIFAC model since its basic idea is to combine the concept of group solution in two parts: residual and combinatorial. The residual part can be identified as an enthalpy contribution, by considering the energy interactions formed by functional groups when they separate and interact with the system to come to equilibrium, while the combinatorial part can be identified as an entropy contribution since it takes into account the differences in shape and size between the molecules in the mixture.^{20, 21, 25-27}

The UNIFAC model with modifications proposed by Kikic et al.²¹ was applied in this work, which takes into account the modified Debye-Hückel term to ensure a more correct representation of PEG + salt + water systems.^{21, 28}

In the present study, liquid - liquid equilibrium data for ternary system PEG 8000 + salt (sodium sulfate, ammonium sulfate, magnesium sulfate) + water at temperatures 298.15 K, 303.15 K and 308.15 K and pH 2.0 were determined experimentally. The UNIFAC model was applied to correlate the experimental tie-lines data, and the salting-out effect as a function of temperature and was evaluated using the model of the effective excluded volume (EEV).

2. EXPERIMENTAL SECTION

2.1. Materials

The names, CAS numbers, purities, in mass fraction, of the chemicals used and analysis methods are listed in Table 1. Double distilled water was used to prepare the solutions. All the chemicals were used without further purification.

Table 1.

Samples provenance and purities.^a

Chemical name	Source	CAS number	Purity ^b
Sodium Sulfate	Vetec	7757-82-6	0.990
Magnesium Sulfate	Vetec	7487-88-9	0.980
Ammonium Sulfate	Vetec	7783-20-2	0.990
Sulfuric Acid	Vetec	7664-93-9	0.980
Polyethylene glycol with molar mass of 8000 g mol ⁻¹	Sigma	25322-68-3	0.990

^a Distilled water was used in every experiment.

^b stated mass fraction purity.

2.2. Construction of Spinodal Curve

The experimental determination of the spinodal curves was done by the cloud point method at atmospheric pressure.^{29, 30} Stock solutions of PEG 8000 (50% w/w), sodium sulfate (18% w/w), ammonium sulfate (40% w/w), magnesium sulfate (25% w/w), at pH 2.0, adjusted with sulfuric acid and checked in a pH meter were used.

The procedure consists of weighing 1.5 g of the stock PEG solution in glass tubes, using an analytical balance (model M254A, Bel Engineering, Piracicaba, Brazil) with an uncertainty of ± 0.0001 g. The tube containing the PEG solution was left in a thermostatic bath at pre-defined temperature (298.15, 303.15 or 308.15 K) with an uncertainty of ± 0.1 K, for 10 minutes to reach the thermal equilibrium. Aliquots of 10 μ L of the salt stock solution

were added dropwise to the PEG solution, followed by stirring in vortex mixer (AP-56 model, Phoenix Lufenco, Brazil). Subsequently the solution was kept in the thermostatic bath during 15 min to confirm the turbidity formation.. Then, a known quantity of distilled water was then added to the tube until a clear and limpid solution was obtained. Additional titration with the salt stock solution resulted in a new turbid system and this new composition was determined. This procedure was repeated several times to obtain the spinodal curve.

Several equations can be used to fit spinodal curves ^{29, 31, 32}. An empirical non-linear equation (Eq. (1)) proposed by Hu et al. ³² was used to correlate the experimental spinodal data of the PEG + salt + water systems, ^{29, 33, 34} using the software SigmaPlot v.11.0.

$$[w_1] = \exp(a + b[w_2]^{0.5} + c[w_2] + d[w_2]^2) \quad (1)$$

where $[w_1]$ and $[w_2]$ represent the total compositions (in mass fraction) of polyethylene glycol and salt, respectively and a , b , c and d are constants obtained by regression of the experimental data.

Exclusion volume was determined according Eq. (2), by using the experimental mass and phase concentrations obtained during the construction of the spinodal curves ³⁵.

$$\ln\left(V_{213}^* \frac{w_2}{m_2}\right) + \left(V_{213}^* \frac{w_1}{m_1}\right) = 0 \quad (2)$$

where V_{213}^* points to the salt exclusion in the polymeric phase, M and w are the molecular mass and mass fraction, and indexes “1” and “2” are the amount of PEG and salt in the phases, respectively.

Salting-out (k) coefficients were calculated using Eq. (3).³⁵

$$\ln\left(\frac{w_1^t}{w_1^b}\right) = \beta + k(w_2^b - w_2^t) \quad (3)$$

where w is the mass fraction for the components that form the ATPS, “1” and “2” refers to the PEG and salt, respectively, “t” and “b” characterize the top and bottom phases. β is defined as a constant related to the activity coefficient.

2.3. Determination of Tie-Lines

The tie-lines (TL) were obtained from the global points selected above the spinodal curves represented on the rectangular diagram. Three global points were chosen for each spinodal curve.

The biphasic systems were prepared in 50 mL graduated centrifuge tubes with volume previously calibrated with water at each evaluated temperature (298.15, 303.15 or 308.15 K). The ATPS were obtained by weighing, into the tubes, an adequate quantity of PEG stock solution, salt, and water for a final mass of 40 g. The tubes were thoroughly mixed with a vortex mixer (Phoenix, model AP-56) for 1 min and centrifuged at $3500 \times g$ for 15 min (SP Labor, model Sp-701, Brazil), to accelerate the formation of phases. Subsequently, the tubes were left in a BOD incubator (Longen Scientific, model LG340 FT220, Brazil) for 24h at pre-determined temperatures to reach the complete phase separation and equilibrium.²⁹ Volumes of the top and bottom phases were measured. From the determination of the phase density it was possible to determine the mass of each phase as described in the section 2.4. The top and bottom phase were collected using pipette and long needle syringes and characterized in terms of PEG 8000, sulfate salt and water concentrations. All systems were prepared in duplicate. The concentrations of each component in the collected phases were estimated by the lever rule, through the solution of a system with four equations (Eqs.(4) - (7)) and four unknowns ($[w_1]_t$, $[w_1]_b$, $[w_2]_t$, $[w_2]_b$).³⁶

$$[w_1]_t = \exp(a + b[w_2]_t^{0.5} + c[w_2]_t + d[w_2]_t^2) \quad (4)$$

$$[w_1]_b = \exp(a + b[w_2]_b^{0.5} + c[w_2]_b + d[w_2]_b^2) \quad (5)$$

$$\frac{[w_1]_t - [w_1]}{[w_1] - [w_1]_b} = \frac{m_b}{m_t} \quad (6)$$

$$\frac{[w_1] - [w_1]_t}{[w_1]_b - [w_1]} = \frac{m_b}{m_t} \quad (7)$$

where w_1 and w_2 are fractions in mass of polyethylene glycol and salt in the “ t ” top and bottom “ b ” phases, m_t and m_b are the weights of the top and bottom phases.

The tie-line lengths (TLL) of the ATPS were determined according to Eq. (8):

$$TLL = \left[(w_1^t - w_1^b)^2 + (w_2^t - w_2^b)^2 \right]^{0.5} \quad (8)$$

where w_1 and w_2 are fractions in mass of polyethylene glycol and salt in the “ t ” top and bottom “ b ” phases.

The tie-line slope (STL) was calculated by Eq. (9):

$$STL = \frac{w_1^t - w_1^b}{w_2^t - w_2^b} \quad (9)$$

2.4. Density Measurements

The density of each phase was determined at 298.15 K, 308.15 K and 318.15 K using the Anton Paar DMA-5000 Digital Benchtop Density Meter (Anton-Paar, Graz, Austria), with an accuracy of ($5 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$ and $\pm 0.01^\circ\text{C}$) repeatability of ($1 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3} \pm 0.01^\circ\text{C}$), in the 0 and 3 g cm^{-3} operating range. The density was determined in order to calculate the mass of phase. The density of each phase was determined in duplicate.

2.5. Thermodynamic modeling

The liquid - liquid equilibrium data of the ATPS were used to estimate the interaction parameters of the contributing groups using the UNIFAC model with modifications made by Kikic et al.²¹. This model considers that the Gibbs free energy excess is the sum of the contributions combinatorial (γ_i^{com}), essentially due to the differences in size and shape of the molecules; residual (γ_i^{res}), that considers energetic interaction between molecules, and Debye - Huckel (γ_i^{D-H}) contribution that considers the salt as a cation and anion group and not as a

different group and can be expressed in activity coefficient terms (γ_i) of molecule in a liquid solution, as shown in Eq. 10:

$$\ln\gamma_i = \ln\gamma_i^{D-H} + \ln\gamma_i^{com} + \ln\gamma_i^{res} \quad (10)$$

The Debye - Huckel term was calculated by Eq. (11) as described by Macedo et al.³⁷

$$\ln\gamma_n^{D-H} = \frac{2AM_n d_s}{b^3 d_n} \left[1 + b\sqrt{l} - \frac{1}{1 + b\sqrt{l}} - 2\ln(1 + b\sqrt{l}) \right] \quad (11)$$

where M_n is molar mass of the solvent n , l is ionic strength, d_n is the density of pure solvent n .

The combinatorial part of UNIFAC model was calculated by Eq. (12).³⁸

$$\ln\gamma_i^{com} = \left(\ln \frac{\varphi_i}{x_i} + 1 - \frac{\varphi_i}{x_i} \right) - \frac{z}{2} q \left(\ln \frac{\varphi_i}{\theta_i} + 1 - \frac{\varphi_i}{\theta_i} \right) \quad (12)$$

where:

$$\varphi_i^* = \frac{r_i x_i}{\sum_j r_j x_j} \quad (12.1)$$

$$\theta_i = \frac{q_i x_i}{\sum_j q_j x_j} \quad (12.2)$$

$$r_1 = \sum_k V_k^{(i)} R_k \quad (12.3)$$

$$q_1 = \sum_k V_k^{(i)} Q_k \quad (12.4)$$

where r_i is the volume parameter for component i ; z is coordination number; q_i is surface area parameter for component i ; φ_i^* is volumetric fraction of component in term of r_i ; θ_i is the surface area fraction and $V_k^{(i)}$ is the number of type k groups in the molecule i .

The residual term is called “solution for groups”, in which individual contributions of each group are a function of concentration and temperature³⁹ and was calculated by Eq. 13:

$$\ln\gamma_i^{res} = \sum_K^{groups} v_K^i (\ln\Gamma_K - \ln\Gamma_K^{(i)}) \quad (13)$$

The residual activity coefficient of groups was calculated by Eq. 14.

$$\ln\Gamma_K = Q_K \left[1 - \ln(\sum_m \theta_m \Psi_{mK}) - \sum_m \frac{\theta_m \Psi_{K m}}{\sum_n \theta_n \Psi_{n m}} \right] \quad (14)$$

$$\theta_m = \frac{Q_m X_m}{\sum_n Q_n X_n} \quad (14.1)$$

$$X_m = \frac{\sum_i^M V_m^{(i)} X_i}{\sum_i^M \sum_j^N V_j^{(i)} X_i} \quad (14.2)$$

The terms θ_m and X_m indicate fraction of the group area m and fraction of the group molar m , respectively. The residual activity coefficient is defined as function of the fraction of the group X_m .

To the best of our knowledge, there are no data available in the literature for interaction energy between the groups present in ATPS PEG 8000 + sulfate salts at pH 2.0. Thus, interaction energy parameters between the contribution group were estimated from the experimental tie-lines data using the UNIFAC model approach by a Fortran code TML-LLE 2.0⁴⁰. This code is based on the simplex method and consists of the minimization of an objective function S based on concentration, defined by Eq. (17):

$$S = \sum_k^D \sum_j^M \sum_i^{N-1} \left\{ (x_{ijk}^{I,exp} - x_{ijk}^{I,calc})^2 + (x_{ijk}^{II,exp} - x_{ijk}^{II,calc})^2 \right\} \quad (17)$$

where D is the number of data and N and M are the numbers of components and of tie-lines in each number of data, respectively. Subscripts I and II refer to the two liquid phases in equilibrium, while the subscribers ‘*exp*’ and ‘*calc*’ refer to the experimental and calculated values of the concentration in the liquid phase.

The criteria that indicated an adequate adjustment of the interaction energy parameters were the minimization and convergence of the objective function S (Eq. 17).

With the interaction parameters estimated by the above method, comparison of the experimental and correlated data of each component in each of the two phases was performed through the root mean square of the deviation (δx), given by:

$$\delta x = 100 \sqrt{\frac{\sum_j^M \sum_i^{N-1} \left\{ (x_{ijk}^{I,exp} - x_{ijk}^{I,calc})^2 + (x_{ijk}^{II,exp} - x_{ijk}^{II,calc})^2 \right\}}{2MN}} \quad (18)$$

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Spinodal Curves

The values obtained for the parameters a , b , c and d , as well as the R^2 and sd of the adjusted equation (1), are presented in Table 2.

Table 2. Values of parameters of Eq. (1) for the ATPS PEG 8000 (w_1) + Salt (w_2) + H₂O (w_3) at $T = (298.15, 308.15, 318.15$ and $323.15)$ K at pH 2.0 and pressure $p = 0.1$ MPa.^f

298.15 K						
Salt	A	b	C	d	R^2	sd^e
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.589	-21.225	80.899	-492.479	0.999	0.011
MgSO ₄	-2.552	25.219	-115.399	203.088	0.999	0.015
Na ₂ SO ₄	0.232	-13.508	37.540	-385.218	0.999	0.013
308.15 K						
Salt	A	b	C	d	R^2	Sd
(NH ₄) ₂ SO ₄	-1.558	11.237	-42.101	-141.509	0.998	0.012
MgSO ₄	-1.130	6.539	-54.418	-93.035	0.998	0.024
Na ₂ SO ₄	1.180	-26.361	84.006	-600.300	0.998	0.027
318.15 K						
Salt	A	b	C	d	R^2	Sd
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.939	-63.417	226.475	-1109.982	0.998	0.014
MgSO ₄	-1.819	21.978	-145.351	349.205	0.997	0.023
Na ₂ SO ₄	0.490	-19.459	60.538	-643.691	0.997	0.036

^e $sd = (\sum_{i=1}^n (w_1^{cal} - w_1^{exp})^2 / n)^{0.5}$, where w_1 represent the mass fraction of PEG 8000 and n and the number of spinodal data, respectively. w_1^{exp} is the experimental mass fraction of PEG 8000 listed in Table 2, w_1^{cal} is the corresponding data

calculated using Eqs. (4) and (5).^f Standard uncertainties u are $u(T) = 0.05$ K, and $u(p) = 5$ kPa. Composition range covered for each fitting: ammonium sulfate 0.45 – 0.0006; magnesium sulfate 0.40 – 0.0043; sodium sulfate 0.44 – 0.00098.

Based on the sd and R^2 values, it can be concluded that the equation was satisfactorily fitted to the experimental data. The a , b , c and d values were used in Eq. (4) and (5) to estimate the composition of the phase components by the lever rule. This equation has been successfully used for the correlation of the spinodal data of some polymer- salt aqueous two-phase systems^{7, 41, 42}.

The phase diagrams for systems PEG 8000 + sulfate salt + water are shown in Figure 1 according to the temperature.

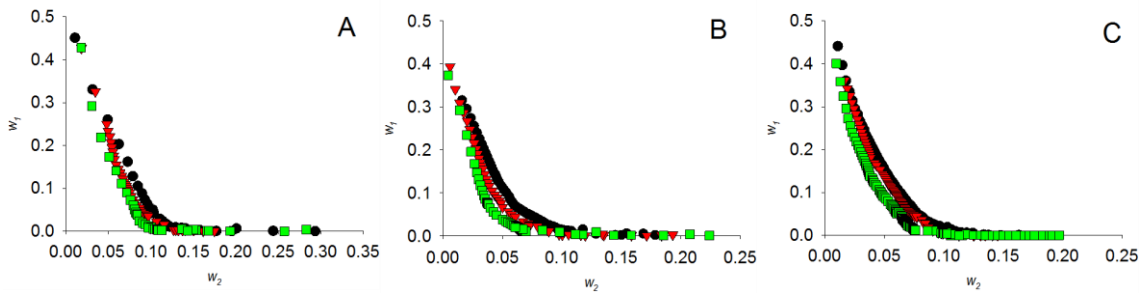


Figure 1. Spinodal curves in unit of mass fraction for ATPS PEG 8000 (w_1) + salt (w_2) (ammonium sulfate (A), magnesium sulfate (B) or sodium sulfate (C)) at pH 2.0 and temperatures $T = 298.15$ K (\bullet), 308.15 K (\blacktriangledown) and 318.15 K (\blacksquare).

Table 3 presents the results for exclusion volume (V_{213}^*), calculated based on the experimental data of the spinodal curves, and the salting-out coefficient, calculated based on the tie-lines data.

Table 3. Calculated values of the exclusion volume and values of the adjusted parameters of the Eq. (3) for ATPS PEG 8000 (w_1) + salt (w_2) + H₂O (w_3) at temperatures $T = (298.15, 308.15, 318.15)$ K and pH 2.0 and $p = 0.1$ MPa.^c

Salt	T (K)	V_{213}^* (g mol ⁻¹)	R^2	sd^a	k	B	R^2	sd^b
(NH ₄) ₂ SO ₄	298.15	4707.101	0.877	0.007	41.076	1.076	0.906	0.851
(NH ₄) ₂ SO ₄	308.15	5152.367	0.976	0.006	46.529	0.399	0.980	0.323
(NH ₄) ₂ SO ₄	318.15	5891.216	0.836	0.008	128.79	-14.459	0.993	0.673
MgSO ₄	298.15	5610.681	0.866	0.008	25.649	0.845	0.982	0.190
MgSO ₄	308.15	6654.529	0.938	0.006	26.712	2.448	0.969	1.651
MgSO ₄	318.15	7652.124	0.804	0.009	58.593	-0.413	0.999	1.548
Na ₂ SO ₄	298.15	5155.439	0.968	0.007	57.820	-1.081	0.993	0.134
Na ₂ SO ₄	308.15	6404.984	0.950	0.007	97.709	-3.647	0.986	0.669
Na ₂ SO ₄	318.15	7505.918	0.951	0.009	130.020	-5.807	0.989	0.757

^a $sd = \left(\sum_{i=1}^n (w_1^{calc} - w_1^{exp})^2 / n \right)^{0.5}$ where w_1 represents the mass fraction of PEG 8000 and n the number of spinodal data, respectively. w_1^{exp} is the experimental mass fraction of PEG 8000, w_1^{calc} is the corresponding data calculated using Eq. 2. ^b

$sd = \left(\sum_{i=1}^n (w_1^{t,cal} - w_1^{t,exp})^2 + (w_1^{b,cal} - w_1^{b,exp})^2 / n \right)^{0.5}$, where n represents the number of tie-lines. ^c Standard uncertainties u are $u(T) = 0.05$ K, and $u(p) = 5$ kPa.

All the systems studied underwent a small variation of the biphasic region with increasing temperature. Increases in temperature caused a shift of the spinodal curve towards lower phase constituent concentrations, that is, towards a reduction in the amount of salt and polymer needed to form the phases, causing the biphasic region of the equilibrium diagram to increase with increasing temperature. Similar behavior was observed by Gonzalez - Amado et al.⁴³ for ATPS PEG 8000 and sodium sulfate at temperatures of 293.15 K and 308.15 K and without pH adjustment. For ATPS PEG 8000 and ammonium sulfate at temperatures of

278.15 K, 293.15 K and 308.15 K and without pH adjustment, the authors did not find difference with increasing temperature.⁴³

A similar effect was observed by Muruchi et al.⁴⁴ for ATPS PEG 4000 and ferrous sulfate at temperatures of 288.15 K, 298.15 K and 308.15 K. Sosa et al.⁴⁵ also observed this behavior when determining LLE data for ATPS PEG 4000 and sulfate salts (magnesium or copper) at different temperatures (298.15 K, 308.15 K and 338.15 K). This behavior can be attributed to the reduction in the configurational entropy of PEG, because the increase of the temperature causes the decrease of polymer solubility, causing it to interact less with the water and the salt. As a result, the free energy of the system is increased, and its presence in the homogeneous system becomes thermodynamically unfavorable, causing its separation into two-phases.

Thus, the amount of salt required for energy saturation of the PEG chain and formation of the biphasic region decreases, causing the displacement of the spinodal curve to regions closer to the axes of the equilibrium diagram. Such behavior is in agreement with the values found for the exclusion volume (Table 3), which increased with the elevation of the temperature of the systems.

In all systems the exclusion volume of PEG increased with increasing temperature. This tendency may be due to the increase in the solubility of the salt with increasing temperature,⁴⁶ which causes the migration to the lower phase of the system, leaving spaces available for the water molecules to interact with the PEG. For all studied salts, the increase in the exclusion volume is reflected directly in the phase diagram (Figure 1), causing the spinodal curve to move to the left, thus causing an increase in the biphasic region.

An increase in the salting-out (k) effect was also observed with the elevation of temperature for all studied salts (Table 3). The salting-out effect is based on the exclusion of water-soluble substances from the aqueous phase (in this case the polymer) by the presence of salt, possibly due to the interaction between salts ions and water being stronger than the water

interactions with the other compounds. Therefore, raising the temperature promotes an increase in the solubility of salts⁴⁶ and this may result in a greater salting-out effect, which may lead to greater ease of biphasic aqueous systems formation. A similar effect was reported by Rodrigues et al.⁴⁷ for PEG 1500, sodium sulfate and water systems and Nascimento et al.⁴⁸ for PEG, sodium citrate and water. Sosa et al.⁴⁵ also verified this behavior when studying equilibrium phase systems consisting of PEG 2000, PEG 4000 and PEG 6000 and sulphate salts (manganese and copper), at temperatures of 298.15, 318.15 and 338.15 K.

Figure 2 shows the equilibrium diagrams for the PEG 8000, water and sulfate salts formed by different cations, at the study temperatures. For all evaluated temperatures, variations of the biphasic region occurred in the following ascending order: $(\text{NH}_4)^+ < \text{Na}^+ < \text{Mg}^{2+}$. This fact is related to a decrease in salt solubility. The lower the solubility of the salt the lower the quantity required for saturation of the mixture, which will lead to the formation of two-phase systems in low concentrations of this salt. The exclusion volume values increased in the following order $(\text{NH}_4)^+ < \text{Na}^+ < \text{Mg}^{2+}$ (Table 3) which is in agreement with the behavior described above. Kunsz⁴⁹, on evaluating the effect of specificity of some ions in biological and colloidal systems, reported that the ease of cations studied in open cavities in aqueous mixtures containing macromolecules follows the increasing order $(\text{NH}_4)^+ < \text{Na}^+ < \text{Mg}^{2+}$, which corroborates the behavior observed for the exclusion volume.

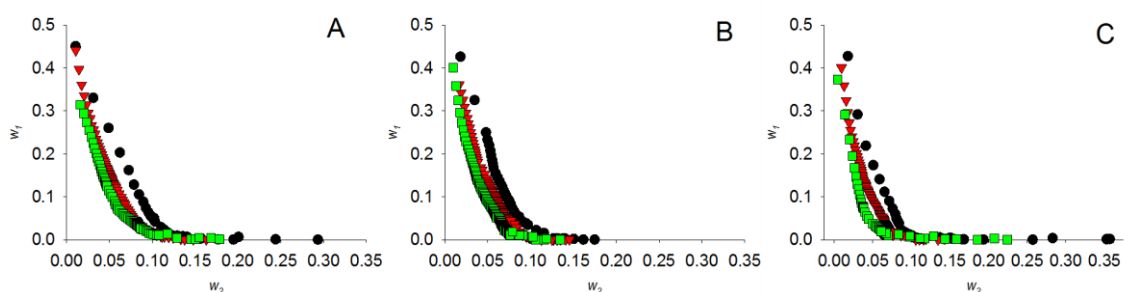


Figure 2. Spinodal curves in unit of mass fraction for ATPS PEG 8000 (w_1) + salt (w_2) (ammonium sulfate (●), magnesium sulfate (■) or sodium sulfate (▼)) at pH 2.0 and temperatures $T = 298.15$ K (A), 308.15 K (B) and 318.15 K (C).

Some works also have reported that the salting-out ability of the salts is related to the Gibbs energy of hydration ($\Delta_{\text{hyd}}G$) and molar entropy of hydration ($\Delta_{\text{hyd}}S$)⁴⁹⁻⁵². The ions Mg^{+2} , Na^+ and $(\text{NH}_4)^+$ have values of $\Delta_{\text{hyd}}G$, $\Delta_{\text{hyd}}H$ and $\Delta_{\text{hyd}}S$ of $-1830 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $-365 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ and $-285 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$; $-1949 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$, $-416 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$, $-329 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ and $-350 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$, $-130 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ and $-131 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ respectively⁵³. In this study, the salting – out abilities of the salts cannot be directly related to the $\Delta_{\text{hyd}}G$ or $\Delta_{\text{hyd}}S$, but can be ascribed in terms of solubility of salts. The salt out coefficient follows the order $\text{Na}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Mg}$, while the solubility of the sulfates salts follows the inverse order: $\text{Na}^+ < \text{NH}_4^+ < \text{Mg}$.⁴⁵

3.2. Tie-lines determination

The equilibrium composition, phase densities, TLL and STL for ATPS PEG 8000 + salt (ammonium sulfate, sodium sulfate or magnesium sulfate) + water, at different temperatures (298.15, 308.15 and 318.15 K) and at pH 2.0 are presented in Table 4, in which the data for the phase components are expressed in terms of mass fraction. Three tie-lines were determined for each ATPS studied.

Table 4. Tie-Lines data in unit of mass fraction and phases densities for the ATPS PEG 8000 (w_1) + salt (w_2) + water (w_3) in function in the TLL, STL at temperature $T = (298.15, 308.15 \text{ and } 318.15) \text{ K}$ at pH 2.0 and $p = 0.1 \text{ MPa}$ ^a.

TL	Global composition		Top phase			Bottom phase			TLL	STL
	w_1	w_2	w_1	w_2	$\rho / \text{kg m}^{-3}$	w_1	w_2	$\rho / \text{kg m}^{-3}$		
Ammonium Sulfate										
298.15 K										
1	0.090	0.110	0.247	0.053	1070.180	0.003	0.141	1080.580	0.259	-2.768
2	0.100	0.130	0.347	0.026	1075.870	0.000	0.172	1095.190	0.376	-2.365

3	0.110	0.150	0.369	0.020	1081.380	0.000	0.205	1111.790	0.412	-1.996
308.15 K										
1	0.090	0.110	0.271	0.043	1065.670	0.002	0.142	1075.820	0.287	-2.710
2	0.100	0.130	0.352	0.032	1069.680	0.000	0.169	1091.150	0.377	-2.576
3	0.110	0.150	0.379	0.028	1075.810	0.000	0.200	1106.400	0.416	-2.207
318.15 K										
1	0.090	0.110	0.324	0.025	1059.070	0.000	0.143	1073.770	0.345	-2.764
2	0.100	0.130	0.390	0.020	1066.190	0.000	0.168	1088.610	0.417	-2.636
3	0.110	0.150	0.445	0.017	1071.530	0.000	0.194	1101.780	0.479	-2.522
Sodium Sulfate										
298.15 K										
1	0.125	0.065	0.224	0.037	1066.980	0.017	0.099	1090.740	0.217	-3.313
2	0.145	0.085	0.274	0.029	1073.150	0.007	0.112	1125.010	0.280	-3.195
3	0.165	0.105	0.300	0.025	1079.750	0.002	0.129	1158.460	0.316	-2.850
308.15 K										
1	0.125	0.065	0.234	0.032	1060.880	0.008	0.101	1090.580	0.236	-3.266
2	0.145	0.085	0.330	0.020	1066.760	0.000	0.136	1120.960	0.350	-2.851
3	0.165	0.105	0.395	0.015	1069.880	0.000	0.170	1157.650	0.424	-2.558
318.15 K										
1	0.125	0.065	0.227	0.025	1054.570	0.001	0.114	1071.260	0.243	-2.564
2	0.145	0.085	0.327	0.015	1060.820	0.000	0.141	1098.240	0.350	-2.588
3	0.165	0.105	0.387	0.011	1067.300	0.000	0.176	1131.370	0.421	-2.342
Magnesium Sulfate										
298.15 K										
1	0.095	0.070	0.178	0.038	1065.690	0.017	0.100	1104.440	0.173	-2.597

2	0.105	0.090	0.279	0.023	1066.890	0.007	0.130	1135.910	0.292	-2.551
3	0.115	0.110	0.315	0.011	1069.840	0.003	0.157	1158.460	0.344	-2.126
308.15 K										
1	0.095	0.070	0.200	0.027	1057.820	0.003	0.107	1101.340	0.213	-2.467
2	0.105	0.090	0.300	0.016	1059.600	0.001	0.130	1130.460	0.320	-2.641
3	0.115	0.110	0.376	0.008	1064.650	0.000	0.155	1157.590	0.404	-2.549
318.15 K										
1	0.095	0.070	0.247	0.018	1049.010	0.003	0.101	1094.660	0.258	-2.952
2	0.105	0.090	0.322	0.013	1055.530	0.001	0.127	1128.680	0.341	-2.810
3	0.115	0.110	0.377	0.006	1059.160	0.001	0.154	1159.880	0.404	-2.536

^a For densities the standard uncertainties are $u(T) = 0.001$ K, $u(\rho) = 0.005$ kg cm⁻³ and for TLL the standard uncertainties u are $u(w_1) = 0.0047$, $u(w_2) = 0.0021$, $u(T) = 0.05$ K, and $u(p) = 5$ kPa.

As presented in Table 4, for all systems, regardless of temperature, the PEG was excluded from the bottom phase while the opposite behavior was observed in the top phase, where the polymer is at high concentration. This exclusion is common in all polymer-salt ATPS. Similar PEG and sulfate salts at different temperatures^{4,54-56}.

The increases in the overall composition of the systems resulted in increased TLL. As the value of the TLL increases, the composition difference between the upper and lower phases becomes larger, which will result in higher selectivity of the system for the partition of biomolecules⁵⁷.

For all the systems studied, the inclination of the tie - line was greater than $|1|$. STL absolute values also tend to increase with increasing temperature. The STL variation is caused by a hydrophobicity difference between the phases. This is intensified by the temperature increase, resulting in the migration of the solvating water molecules of the polymer from the

upper to the lower phase⁵⁸. The reduction of the water molecules in the upper phase leads to an increase of the polymer concentration in that phase and dilution of the lower phase. Consequently there is an increase in the slope of the tie-line⁵⁸. The segregation of PEG from the lower phase can also be a result of the predominance of the salting-out effect on the effect of the volume of exclusion.

3.3. Thermodynamic Modeling

The liquid-liquid equilibrium experimental data (Table 4) were used to predict the interaction parameters of the contributing groups using the UNIFAC model.

The values of parameters of volume (R_k) and surface area (Q_k) of each contributing group used the input parameters for molecular simulation using the UNIFAC model and were obtained from the literature^{29, 32, 63,57,58}. They are shown in Table 5.

Table 5. Parameters of volume (R_k) and surface area (Q_k) used in this work.

Contribution group	R_k	Q_k	Reference
CH ₂	0.674 ^a	0.540 ^a	Magnussen et al. ²⁵
CH ₂ CH ₂ O	1.592 ^b	1.320 ^b	Ninni et al. ⁵⁷
OH ⁻	1.000 ^c	1.200 ^c	Hansen et al. ²⁰
SO ⁻	2.856 ^d	2.015 ^d	Weast ⁶⁰
NH ⁺	1.330 ^c	1.310 ^c	Hansen et al. ²⁰
Na ⁺	3.000 ^e	3.000 ^e	Bond ⁵⁸
H ₂ O	0.920 ^c	1.400 ^c	Hansen et al. ²⁰

^a Parameters obtained from Magnussen et al.²⁹; ^b Parameters obtained from Ninni et al.⁵⁹; ^c Parameters obtained from Hansen et al.³²; ^d Parameters obtained from Weast et al.⁶⁰; ^e Parameters obtained from Bondi⁵⁸.

Table 6 presents the parameters, a_{ij} and a_{ji} , of interaction between the molecular groups obtained through molecular simulation.

Table 6. Interaction parameters estimated by the UNIFAC model

Component i	Component j	a_{ij}	a_{ji}
CH ₂	CH ₂ CH ₂ O	-248.540	1633.900
CH ₂	SO ₄	-0.9174	-4.5906
CH ₂	Na	6.7213	-231.870
CH ₂ CH ₂ O	OH	455.400	191.630
CH ₂ CH ₂ O	SO ₄	-1013.700	-490.550
CH ₂ CH ₂ O	Mg	618.970	2115.200
CH ₂ CH ₂ O	NH ₄	1.6355	2994.700
CH ₂ CH ₂ O	Na	-48.830	47.660
CH ₂ CH ₂ O	H ₂ O	885.44	-31.692
Mg	H ₂ O	2129.800	358.120

The mean deviations of each system, as well as the global, are presented in Table 7.

Table 7. Deviations (Δdev , %) in ATPS compositions correlated by UNIFAC model.

ATPS	Δdev (%)
PEG 8000 + ammonium sulfate + water, pH 2, $T = 298.15$ K	3.533
PEG 8000 + ammonium sulfate + water, pH 2, $T = 308.15$ K	2.202
PEG 8000 + ammonium sulfate + water, pH 2, $T = 318.15$ K	3.777
PEG 8000 + magnesium sulfate + water, pH 2, $T = 298.15$ K	5.745
PEG 8000 + magnesium sulfate + water, pH 2, $T = 308.15$ K	4.479

PEG 8000 + magnesium sulfate + water, pH 2, $T = 318.15$ K	3.741
PEG 8000 + sodium sulfate + water, pH 2, $T = 298.15$ K	1.293
PEG 8000 + sodium sulfate + water, pH 2, $T = 308.15$ K	4.094
PEG 8000 + sodium sulfate + water, pH 2, $T = 318.15$ K	4.509
Overall mean deviation	3.908

The UNIFAC model, through the new interaction energies estimated in this work, can be satisfactorily used to correlate the phase compositions of PEG 8000 + ammonium sulfate + water, PEG 8000 + magnesium sulfate + water and PEG 8000 + sodium sulfate + water systems, since the maximum deviation obtained was 5.745%. Figure 3 shows the tie-lines obtained experimentally and those calculated by the UNIFAC model.

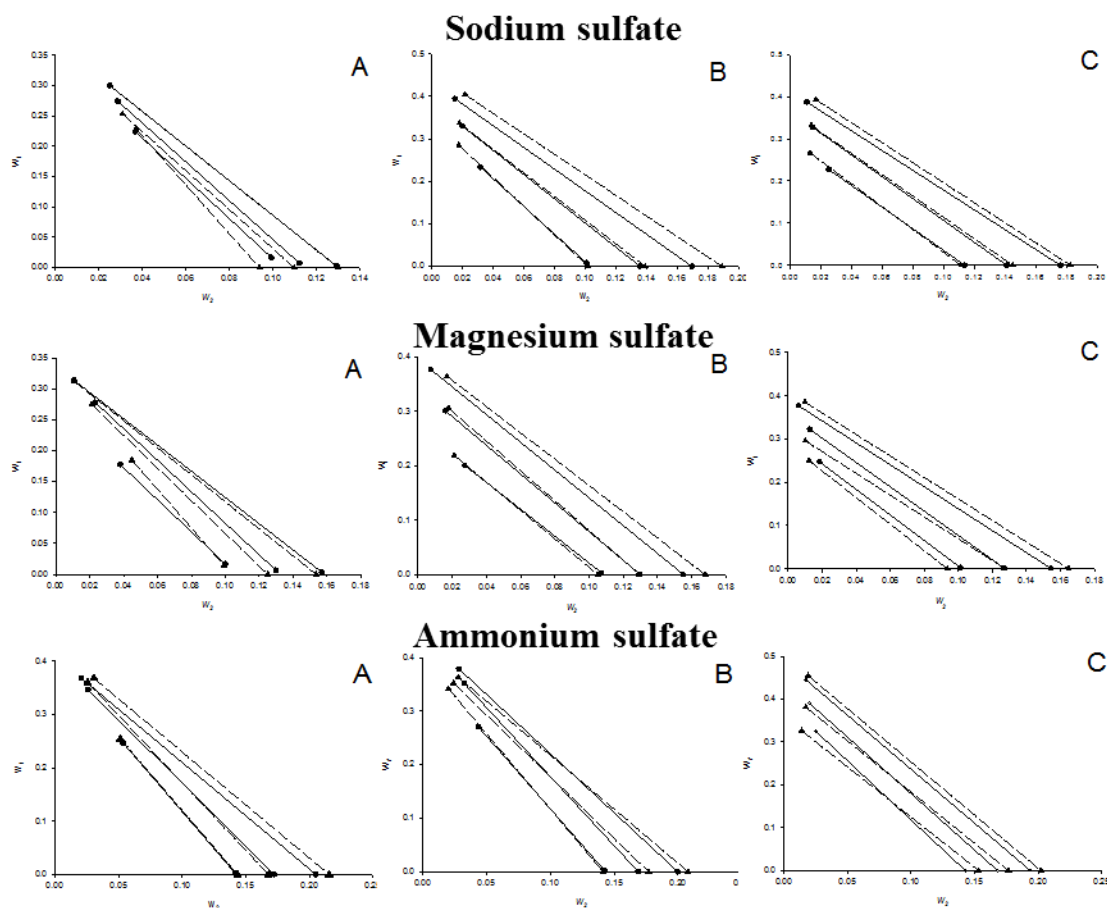


Figure 3. Tie-lines in unit of mass fraction for ATPS PEG 8000 (w_1) + salt (w_2) (sodium sulfate, magnesium sulfate or ammonium sulfate) at pH 2.0 and temperatures $T = 298.15$ K (A), 308.15 K (B) and 318.15 K (C). Tie-line experimental data (\bullet — \bullet); tie-line data correlated by the UNIFAC model (\blacktriangle ----- \blacktriangle).

4. CONCLUSION

System equilibrium data were obtained from PEG 8000 + sulfate salts (sodium, magnesium or ammonium) + water at 298.15 K, 308.15 K and 318.15 K and pH 2.0. Increases in temperature resulted in an increase in the biphasic region. The salt cation type influenced the formation of the biphasic region in the following ascending order $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 < \text{Na}_2\text{SO}_4 < \text{MgSO}_4$.

Regarding the tie - lines, increases in the overall composition of the systems resulted in the increase of the phases composition differences and consequently the TLL values, while the STL was affected by the temperature increase.

For all ATPS, the exclusion volume of PEG increased with increasing temperature, that is, upon raising the temperature of the systems from 298.15K to 318.15K a smaller amount of salt was needed to form a two-phase system. The elevation of temperature promoted the increase of the salting-out effect.

The UNIFAC model was adequate to predict the behavior of the systems, with deviations varying from 1.293% to 5.745% between experimental and correlated compositions. A low deviations value confirmed that the UNIFAC model can be used satisfactorily to correlate LLEs data of ATPS PEG 8000 + sulfate salts + water.

REFERENCES

1. Albertsson, P.-Å., Partition of Cell Particles and Macromolecules in Polymer Two-Phase Systems. In *Advances in Protein Chemistry*, Anfinsen, C. B.; Edsall, J. T.; Richards, F. M., Eds. Academic Press: 1970; Vol. 24, pp 309-341.
2. Nascimento, R. G.; Fontan, R. d. C. I.; Ferreira Bonomo, R. C.; Veloso, C. M.; Castro, S. d. S.; Santos, L. S., Liquid-Liquid Equilibrium of Two-Phase Aqueous Systems Composed of PEG 400, Na₂SO₄, and Water at Different Temperatures and pH Values: Correlation and Thermodynamic Modeling. *Journal of Chemical & Engineering Data* **2018**, 63, (5), 1352-1362.
3. Martins, J. P.; Coimbra, J. S. R.; Oliveira, F. C.; Sanaiotti, G.; da Silva, C. A. S.; Silva, L. H. M.; Silva, M. C., Liquid-liquid equilibrium of aqueous two-phase system composed of poly(ethylene glycol) 400 and sulfate salts. *J. Chem. Eng. Data* **2010**, 55, 1247.
4. Martins, J. P.; de Oliveira, F. C.; dos Reis Coimbra, J. S.; da Silva, L. H. M.; da Silva, M. d. C. H.; do Nascimento, I. S. B., Equilibrium Phase Behavior for Ternary Mixtures of Poly(ethylene) Glycol 6000 + Water + Sulfate Salts at Different Temperatures. *Journal of Chemical & Engineering Data* **2008**, 53, (10), 2441-2443.
5. Silvério, S. C.; Rodríguez, O.; Teixeira, J. A.; Macedo, E. A., The Effect of Salts on the Liquid-Liquid Phase Equilibria of PEG600 + Salt Aqueous Two-Phase Systems. *Journal of Chemical & Engineering Data* **2013**, 58, (12), 3528-3535.
6. Silvério, S. C.; Wegrzyn, A.; Lladosa, E.; Rodríguez, O.; Macedo, E. A., Effect of aqueous two-phase systems constituents in different poly(ethylene glycol)- salt phase diagrams. *J. Chem. Eng. Data* **2012**, 57, 1203.

7. Baskaran, D.; Chinnappan, K.; Manivasagan, R.; Selvaraj, R., Liquid–Liquid Equilibrium of Polymer–Inorganic Salt Aqueous Two-Phase Systems: Experimental Determination and Correlation. *Journal of Chemical & Engineering Data* **2017**, 62, (2), 738-743.
8. Carvalho, C. P.; Coimbra, J. S. R.; Costa, I. A. F.; Minim, L. A.; Silva, L. H. M.; Maffia, M. C., Equilibrium Data for PEG 4000 + Salt + Water Systems from (278.15 to 318.15) K. *Journal of Chemical & Engineering Data* **2007**, 52, (2), 351-356.
9. Castro, B. D.; Aznar, M., Liquid-liquid equilibrium of water + PEG 8000 + magnesium sulfate or sodium sulfate aqueous two-phase systems at 35°C: experimental determination and thermodynamic modeling. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* **2005**, 22, 463-470.
10. Cunha, E. V. C.; Aznar, M., Liquid–Liquid Equilibrium in Aqueous Two-Phase (Water + PEG 8000 + Salt): Experimental Determination and Thermodynamic Modeling. *Journal of Chemical & Engineering Data* **2009**, 54, (12), 3242-3246.
11. Feijoo-Siota, L.; Luis R. Rama, J.; Sanchez-Perez, A.; Villa, T., *Expression, activation and processing of a novel plant milk-clotting aspartic protease in Pichia pastoris*. 2018; Vol. 268.
12. Agboola, S. O.; Chan, H. H.; Zhao, J.; Rehman, A., Can the use of Australian cardoon (*Cynara cardunculus* L.) coagulant overcome the quality problems associated with cheese made from ultrafiltered milk? *LWT - Food Science and Technology* **2009**, 42, (8), 1352-1359.
13. 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* **2016**, 61, (1), 3-11.
14. Pratiwi, A. I.; Yokouchi, T.; Matsumoto, M.; Kondo, K., Extraction of succinic acid by aqueous two-phase system using alcohols/salts and ionic liquids/salts. *Separation and Purification Technology* **2015**, 155, 127-132.
15. Aydoğan, Ö.; Bayraktar, E.; Mehmetoğlu, Ü., Aqueous Two-Phase Extraction of Lactic Acid: Optimization by Response Surface Methodology. *Separation Science and Technology* **2011**, 46, (7), 1164-1171.
16. Chakraborty, A.; Sen, K., Impact of pH and temperature on phase diagrams of different aqueous biphasic systems. *Journal of Chromatography A* **2016**, 1433, 41-55.
17. Damodaran, S.; Parkin, K. L., *Química de alimentos de Fennema*. Artmed Editora: 2018.
18. Perumalsamy, M.; Murugesan, T., Prediction of liquid–liquid equilibria for polyethylene glycol based aqueous two-phase system by ASOG and UNIFAC method. *Braz. J. Chem. Eng. Data* **2009**, 26, 171.
19. Domańska, U.; Zawadzki, M.; Królikowski, M.; González, J. A., Phase equilibria and excess molar enthalpies study of the binary systems (pyrrole + hydrocarbon, or an alcohol) and modeling. *Fluid Phase Equilibria* **2014**, 361, 116-129.
20. Hansen, H. K.; Rasmussen, P.; Fredenslund, A.; Schiller, M.; Gmehling, J., Vapor-liquid equilibria by UNIFAC group contribution. 5. Revision and extension. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **1991**, 30, (10), 2352-2355.
21. Kikic, I.; Fermeglia, M.; Rasmussen, P., Unifac prediction of vapor–liquid equilibria in mixed solvent–salt systems. *Chemical Engineering Science* **1991**, 46, (11), 2775-2780.

22. Perumalsamy, M.; Thanabalan, M., Prediction of liquid-liquid equilibria for polyethylene glycol based aqueous two-phase system by ASOG and UNIFAC method. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* **2009**, 26, (1), 171 - 180.
23. Roosta, A.; Jafari, F.; Javanmardi, J., Liquid–Liquid Equilibrium in an Aqueous Two-Phase System of Polyethylene Glycol 6000, Sodium Sulfate, Water, Glucose, and Penicillin-G: Experimental and Thermodynamic Modeling. *Journal of Chemical & Engineering Data* **2016**, 61, (1), 565-570.
24. Shahrokhi, B.; Pirdashti, M.; Mobalegholeslam, P.; Rostami, A. A., Liquid–Liquid Equilibrium and Physical Properties of Aqueous Mixtures of Poly(ethylene glycol) with Zinc Sulfate at Different pH Values: Experiment, Correlation, and Thermodynamic Modeling. *Journal of Chemical & Engineering Data* **2017**, 62, (3), 1106-1118.
25. Magnussen, T.; Rasmussen, P.; Fredenslund, A., UNIFAC parameter table for prediction of liquid-liquid equilibria. *Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development* **1981**, 20, (2), 331-339.
26. Oishi, T.; Prausnitz, J. M., Estimation of Solvent Activities in Polymer Solutions Using a Group-Contribution Method. *Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development* **1978**, 17, (3), 333-339.
27. Abrams, D. S.; Prausnitz, J. M., Statistical thermodynamics of liquid mixtures: A new expression for the excess Gibbs energy of partly or completely miscible systems. *AIChE Journal* **1975**, 21, (1), 116-128.
28. Macedo, E. A.; Skovborg, P.; Rasmussen, P., Calculation of phase equilibria for solutions of strong electrolytes in solvent–water mixtures. *Chemical Engineering Science* **1990**, 45, (4), 875-882.
29. 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* **1998**, 711, (1), 285-293.
30. Albertsson, P. Å., *Partition of cell particles and macromolecules : separation and purification of biomolecules, cell organelles, membranes, and cells in aqueous polymer two-phase systems and their use in biochemical analysis and biotechnology*. Third edition. New York : Wiley, 1986.: 1986.
31. Mistry, S. L.; Kaul, A.; Merchuk, J.; Asenjo, J., Mathematical modelling and computer simulation of aqueous two-phase continuous protein extraction. *Journal of Chromatography A* **1996**, 741, (2), 151-163.
32. Hu, M.; Zhai, Q.; Jiang, Y.; Jin, L.; Liu, Z., Liquid–Liquid and Liquid–Liquid–Solid Equilibrium in PEG + Cs₂SO₄ + H₂O. *Journal of Chemical & Engineering Data* **2004**, 49, (5), 1440-1443.
33. Guo, W.; Ma, J.; Wang, Y.; Han, J.; Li, Y.; Song, S., Liquid–liquid equilibrium of aqueous two-phase systems composed of hydrophilic alcohols (ethanol/2-propanol/1-propanol) and MgSO₄/ZnSO₄ at (303.15 and 313.15) K and correlation. *Thermochimica Acta* **2012**, 546, 8-15.
34. Feng, Z.; Li, J. Q.; Sun, X.; Sun, L.; Chen, J., Liquid–liquid equilibria of aqueous systems containing alcohol and ammonium sulfate. *Fluid Phase Equilibria* **2012**, 317, 1-8.
35. Guan, Y.; Lilley, T. H.; Treffry, T. E., A new excluded volume theory and its application to the coexistence curves of aqueous polymer two-phase systems. *Macromolecules* **1993**, 26, (15), 3971-3979.

36. Merchuk, J. C.; Andrews, B. A.; Asenjo, J. A., Aqueous two-phase systems for protein separation. Studies on phase inversion. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **1998**, 711, (1-2), 285-293.
37. Macedo, E. A.; Weidlich, U.; Gmehling, J.; Rasmussen, P., Vapor-liquid equilibria by UNIFAC group contribution. Revision and extension. 3. *Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development* **1983**, 22, (4), 676-678.
38. Reid, R. C.; Prausnitz, J. M.; Poling, B. E., The properties of gases and liquids. **1987**.
39. Wilson, G.; Deal, C., Activity coefficients and molecular structure. Activity coefficients in changing environments-solutions of groups. *Industrial & Engineering Chemistry Fundamentals* **1962**, 1, (1), 20-23.
40. Carvalho, R. d. A.; Penido, J. A.; Lobo, F. A.; Machado, P. A. L.; Teixeira, N. H. L.; Virtuoso, L. S.; de Lemos, L. R.; Rodrigues, G. D.; Barbosa Mageste, A., Thermodynamic Investigation of the Aqueous Two-Phase Systems Formed by PEG 400 + Water + Either Sodium Carbonate or Potassium Carbonate at Different Temperatures: Experimental and Correlational Approaches. *Journal of Chemical & Engineering Data* **2019**, 64, (2), 448-458.
41. Glyk, A.; Scheper, T.; Beutel, S., Influence of Different Phase-Forming Parameters on the Phase Diagram of Several PEG–Salt Aqueous Two-Phase Systems. *Journal of Chemical & Engineering Data* **2014**, 59, (3), 850-859.
42. González-Amado, M.; Rodil, E.; Arce, A.; Soto, A.; Rodríguez, O., The effect of temperature on polyethylene glycol (4000 or 8000)–(sodium or ammonium) sulfate Aqueous Two Phase Systems. *Fluid Phase Equilibria* **2016**, 428, 95-101.
43. Muruchi, L.; Galleguillos, H. R.; Jimenez, Y. P., Aqueous two-phase system of poly(ethylene glycol) 4000 and ferrous sulfate at different temperatures. *Fluid Phase Equilibria* **2016**, 412, 29-38.
44. Sosa, F. H. B.; de Araujo Sampaio, D.; Farias, F. O.; Bonassoli, A. B. G.; Igarashi-Mafra, L.; Mafra, M. R., Measurement and correlation of phase equilibria in aqueous two-phase systems containing polyethyleneglycol (2 000, 4 000, and 6 000) and sulfate salts (manganese sulfate and copper sulfate) at different temperatures (298.15, 318.15, and 338.15 K). *Fluid Phase Equilibria* **2017**, 449, 68-75.
45. Lange, N. A.; Dean, J. A., *Lange's handbook of chemistry*. McGraw-Hill: [New York], 1967.
46. Rodrigues Barreto, C. L.; de Sousa Castro, S.; Cardozo de Souza Júnior, E.; Veloso, C. M.; Alcântara Veríssimo, L. A.; Sampaio, V. S.; Ramos Gandolfi, O. R.; da Costa Ilhéu Fontan, R.; Oliveira Neves, I. C.; Ferreira Bonomo, R. C., Liquid–Liquid Equilibrium Data and Thermodynamic Modeling for Aqueous Two-Phase System Peg 1500 + Sodium Sulfate + Water at Different Temperatures. *Journal of Chemical & Engineering Data* **2019**, 64, (2), 810-816.
47. do Nascimento, M. B.; de Sousa Castro, S.; Veloso, C. M.; Fontan, R. d. C. I.; do Nascimento, D. J. S.; Gandolfi, O. R. R.; Sampaio, V. S.; Veríssimo, L. A. A.; Bonomo, R. C. F., Equilibrium data and thermodynamic studies of α -amylase partition in aqueous two-phase systems. *Fluid Phase Equilibria* **2018**, 463, 69-79.
48. Kunz, W., Specific ion effects in colloidal and biological systems. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2010**, 15, (1), 34-39.
49. Guo, W.; Ma, J.; Wang, Y.; Han, J.; Li, Y.; Song, S., Liquid–liquid equilibrium of aqueous two-phase systems composed of hydrophilic alcohols (ethanol/2-propanol/1-

propanol) and MgSO₄/ZnSO₄ at (303.15 and 313.15)K and correlation. *Thermochimica Acta* **2012**, 546, 8-15.

50. Nemati-Kande, E.; Shekaari, H., Thermodynamic investigation of the ATPSs composed of some (aliphatic alcohol+sodium carbonate+water) ternary systems. *The Journal of Chemical Thermodynamics* **2013**, 57, 541-549.

51. Ooi, C. W.; Tey, B. T.; Hii, S. L.; Kamal, S. M. M.; Lan, J. C. W.; Ariff, A.; Ling, T. C., Purification of lipase derived from *Burkholderia pseudomallei* with alcohol/salt-based aqueous two-phase systems. *Process Biochemistry* **2009**, 44, (10), 1083-1087.

52. Shahriari, S.; Neves, C. M. S. S.; Freire, M. G.; Coutinho, J. A. P., Role of the Hofmeister Series in the Formation of Ionic-Liquid-Based Aqueous Biphasic Systems. *The Journal of Physical Chemistry B* **2012**, 116, (24), 7252-7258.

53. Marcus, Y., A simple empirical model describing the thermodynamics of hydration of ions of widely varying charges, sizes, and shapes. *Biophysical Chemistry* **1994**, 51, (2), 111-127.

54. Martins, J. P.; Carvalho, C. d. P.; Silva, L. H. M. d.; Coimbra, J. S. d. R.; Silva, M. d. C. H. d.; Rodrigues, G. D.; Minim, L. A., Liquid-Liquid Equilibria of an Aqueous Two-Phase System Containing Poly(ethylene) Glycol 1500 and Sulfate Salts at Different Temperatures. *Journal of Chemical & Engineering Data* **2008**, 53, (1), 238-241.

55. Martins, J. P.; Coimbra, J. S. d. R.; de Oliveira, F. C.; Sanaiotti, G.; da Silva, C. A. S.; da Silva, L. H. M.; da Silva, M. d. C. H., Liquid-Liquid Equilibrium of Aqueous Two-Phase System Composed of Poly(ethylene glycol) 400 and Sulfate Salts. *Journal of Chemical & Engineering Data* **2010**, 55, (3), 1247-1251.

56. de Oliveira, R. M.; Coimbra, J. S. d. R.; Francisco, K. R.; Minim, L. A.; da Silva, L. H. M.; Pereira, J. A. M., Liquid-Liquid Equilibrium of Aqueous Two-Phase Systems Containing Poly(ethylene) Glycol 4000 and Zinc Sulfate at Different Temperatures. *Journal of Chemical & Engineering Data* **2008**, 53, (4), 919-922.

57. Ninni, L.; Camargo, M. S.; Meirelles, A. J. A., Water activity in poly(ethylene glycol) aqueous solutions. *Thermochimica Acta* **1999**, 328, (1), 169-176.

58. Bondi, A. A., *Physical properties of molecular crystals, liquids, and glasses*. John Wiley & Sons, Inc.: New York, 1968; Vol. 7, p 502

59. Ninni, L.; Camargo, M. S.; Meirelles, A. J. A., Water activity in poly(ethylene glycol) aqueous solutions. *Thermochimica Acta* **1999**, 328, (1), 169-176.

60. Weast, R. C., *Handbook of Chemistry and Physics*. 53rd ed.; Chemical Rubber Co.: 1972.

IV - CAPÍTULO 2 - PARTIÇÃO DE PROTEASES ASPÁRTICAS DE *CYNARA SCOLYMUS* E *CYNARA CARDUNCULUS* USANDO SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS PEG+SULFATO DE AMÔNIO+ÁGUA EM pH 2,0

RESUMO

Neste trabalho foi investigada a partição das proteases aspárticas de *Cynara scolymus* e *Cynara Cardunculus* em sistemas aquosos bifásicos compostos por PEG 8000 g.mol⁻¹ + sulfato de amônio + água na temperatura de 25°C em pH 2. Ensaio de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) foram realizados com o intuito de compreender profundamente as interações intermoleculares envolvidas na partição das proteases e as forças motrizes que governam este processo. Foi medido a energia livre de Gibbs de transferência ($\Delta_{tr}G$), variação de entalpia de transferência ($\Delta_{tr}H$) e entropia de transferência ($\Delta_{tr}S$) durante a partição da enzima em função do comprimento da linha de amarração. As proteases de ambos os extratos apresentaram tendência a migrar para a fase rica em PEG. Foram obtidos os coeficientes de partição da proteína total e da enzima. Os resultados mostraram que o aumento do comprimento da linha de amarração teve efeito positivo sobre o coeficiente de partição da enzima, sendo maior para as enzimas provenientes da *Cynara scolymus*. Os valores do coeficiente de partição da enzima variaram de 9,05 a 95,181 para *Cynara scolymus* e 6,5 a 11,101 para *Cynara cardunculus*. A recuperação das proteases da *Cynara scolymus* foi maior que da *Cynara cardunculus*. Os valores de seletividade e o fator de purificação variaram de 1,9 a 9,7 e 2,2 a 23,1, para *Cynara scolymus* e 1,4 a 10,69 e 0,96 a 1,65 para *Cynara cardunculus*, respectivamente. O rendimento de extração para ambos os extratos foi maior que 85% indicando a aplicabilidade do SAB para a purificação das proteases.

INTRODUÇÃO

As proteases aspárticas (EC 3.4.23), também conhecidas como proteases ácidas, são uma subfamília das endopeptidases que podem ser isoladas de diversas fontes, incluindo vírus, bactérias, fungos, plantas e animais (Hsiao et al, 2014; Chen et al, 2009). As proteases aspárticas possuem atividade em pH ácido (pH 2-5) e são especificamente inibidas pela Pepstatina A (Chen, et al. 2014; Vishwanatha et al, 2009; Kumar et al, 2005). Devido à sua alta atividade e estabilidade em ambientes ácidos, as proteases aspárticas são utilizadas na indústria de processamento de alimentos, por exemplo, como coagulantes do leite para a fabricação de queijos e como aditivos para melhorar o sabor e a textura dos alimentos (Yegin, et al 2011).

Proteases derivadas de plantas são amplamente utilizadas na indústria alimentícia devido à sua ampla variedade, boa solubilidade, especificidade do substrato, atividade em uma ampla faixa de pH e temperatura e alta estabilidade sob condições extremas. As proteases derivadas de plantas são usadas para atividade de coagulação do leite na fabricação de queijos. Interesse na utilização do coalho vegetal se desenvolveu em resposta à crescente demanda por queijos vegetarianos (Amid et al, 2012).

Proteases vegetais com atividade coagulante foram identificadas em frutas (kiwi, melão e mamão), raízes (rizoma de gengibre), látex (mamão e maçã) e flores (*Cynara cardunculus*, *Centaurea calcitrapa*) (Fernández-Salguero et al., 2002; Adetunji e Salawu, 2008; Domsalla e Melzig, 2008). Com exceção das enzimas encontradas no extrato das flores de *Cynara Cardunculus*, que são proteases aspárticas que possuem maior atividade em meio ácido, todas as demais tem sido inadequadas para serem utilizadas como coalho, uma vez que elas originam queijos extremamente amargos como consequência da sua alta atividade proteolítica (Lo Piero et al., 2002; Ahmed, Isam Ali Mohamed et al., 2009). A *Cynara Cardunculus* L. é uma planta perene típica da região do mediterrâneo, originada do cruzamento de espécies pertencentes à família Asteraceae. Roseiro et al. (2003) verificaram que esses tipos de proteases também são encontrado em flores de alcachofra (*Cynara Scolymus* L.), um cardo perene nativo do sul da Europa e norte da África. Pesquisas realizadas com variedades de alcachofra produzidas na Europa indicam que seu extrato apresenta grande potencial para uso como coagulantes e podem ser utilizados na fabricação de queijos industriais (Llorente et al., 2014).

As maiorias dos estudos citados anteriormente utilizaram métodos de purificação como cromatografia de exclusão molecular (Souza et al., 2017), precipitação (Devaraj et al., 2008), cromatografia de roca iônica (Li et al., 2018), filtração em gel (Llorente et al., 2014), cromatografia de troca catiônica (Afsharnezhad et al., 2019). Dentre as técnicas de separação/purificação de biomoléculas, os sistemas aquosos bifásicos é uma técnica atraente para obter enzimas industriais em comparação com os métodos convencionais de purificação, porque o ambiente operacional é suave, a expansão é fácil, o processo é rápido, o custo é baixo e a desnaturação das proteínas é minimizada, com isso vem sendo alvo de estudos e demonstrando ser uma ferramenta valiosa (Amid et al., 2012; Alcântara, Do Nascimento, et al., 2013; De Araujo Sampaio et al., 2016; Do Nascimento et al., 2018).

Portanto, no presente trabalho investigou-se a viabilidade do emprego do sistema aquoso bifásico formado por PEG 8000 g.mol⁻¹ e sulfato de amônio em pH 2 a 25°C para purificar protease presente nos extratos de *Cynara cardunculus* e *Cynara scolymus*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Pistilos de *Cynara cardunculus* foram obtidos a partir de plantas cultivadas na região do Alentejo, Portugal, coordenadas 38° 34' 15" N, 7° 54' 34" O. Os pistilos de *Cynara*

scolymus foram obtidos de plantas cultivadas na cidade de São Roque – SP, coordenadas 23° 31' 45" S, 47° 08' 07" O. Todos os reagentes químicos utilizados estão listados na Tabela 1.

Tabela 1. Lista de reagents utilizados nos experimentos.^a

Nome	Marca	Número CAS	Pureza
Sulfato de amônio	Vetec	7783-20-2	0.99
Ácido Sulfúrico	Vetec	7664-93-9	0.98
Poli(etilenoglicol) 8000	Sigma	25322-68-3	0.99
Citrato de sódio	Vetec	6132-04-3	0.99
Fosfato de potássio	Vetec	7758-11-4	0.98
Caseína	Sigma	9000-71-9	0.99
Ácido tricloracético	Vetec	76-03-9	0.99
Tirosina	Sigma	60-18-4	0.98

^a Água destilada foi utilizada em todo experimento.

Extração da enzima

Para obtenção do extrato enzimático bruto (EB) foram testadas duas soluções extratoras (citrato de sódio 100 mM em pH 3,0 e sulfato de amônio 100mM em pH 2,0), com ou sem auxílio de ultrassom (por 30 min) em 4 tempos de contato (3h, 6h, 9h e 12h). Extrato bruto das flores de alcachofra (EBA) e cardo (EBC) foram obtidos pela homogeneização dos pistilos na solução extratora (1:10 m/v) com auxílio do banho ultrassônico (frequência 40 KHz) por 30min (ou não) e posteriormente mantidos em agitador orbital na velocidade de 30 rpm nos tempos de estudo. Após o término do tempo os tubos foram centrifugados a 4000g por 20 minutos e o sobrenadante foi filtrado em filtro a vácuo. Os parâmetros, tipo de solução extratora, uso do ultrassom e tempo, foram avaliados por meio de um esquema fatorial 2x2x4. Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) a 5% de variância, sendo a variável tempo analisada de maneira descritiva. O desempenho da etapa de extração foi avaliado em função da atividade proteolítica. O experimento foi realizado com duas repetições.

Determinação de proteína total

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976) utilizando BSA como padrão de referência para a curva de calibração.

Determinação da atividade proteolítica

A atividade proteolítica foi determinada de acordo com Llorente et al. (2005). Misturou-se 200 µL do extrato bruto ou das fases dos sistemas em 1 ml de caseína 1% (m/v) em tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 6,0. A reação foi conduzida a 37 °C por 10 min, depois interrompida pela adição de 1ml de ácido tricloacético 10% (m/v) e mantido por 20 min em banho de gelo. Posteriormente, foi centrifugado a 4000g por 20 min e o sobrenadante foi coletado e sua absorbância foi lida a 280 nm em espectrofotômetro utilizando cubeta de quartzo. Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima equivalente a 1mg de tirosina a partir do substrato por minuto sob as condições de ensaio.

$$AP \left(\frac{U}{ml} \right) = \text{Tirosina} \left(\frac{mg}{ml} \right) \times \left(\frac{\text{Fator de diluição}}{\text{Volume da enzima}} \right) \times \left(\frac{\text{Volume total}}{\text{Tempo de incubação}} \right) \quad (1)$$

Determinação de parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos foram determinados para a fase superior do sistema que apresentou melhores parâmetros de partição tanto para o extrato de alcachofra quanto para o extrato de flor do cardo. Para determinar os parâmetros cinéticos, a atividade enzimática foi medida variando a concentração de caseína. Foi plotado um gráfico taxas iniciais de reação *versus* diferentes concentrações de caseína (em uma taxa de 0,1- 2,4 mg/mL) e as constantes cinéticas K_m e V_{max} foram determinadas a partir do ajuste do modelo de Michaelis – Menten.

$$V = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad (2)$$

Onde, V_{max} é a velocidade máxima de reação (µmol/min), K_m é a constante de Michaelis (definida como a concentração de substrato onde metade da taxa máxima de reação é atingida) que pode descrever a afinidade de ligação entre enzima e substrato.

Atividade de coagulação do leite

A atividade de coagulação do leite (ACL) foi determinada pelo método descrito por Arima et al.(1968) com modificações. Foram utilizados como substrato leite de vaca, leite de búfala, leite de cabra e leite de ovelha. O substrato foi encubado a 37°C por 5 min em banho termostático, em seguida foram adicionados 200 µL de extrato bruto. A mistura foi mantida a 37°C até a formação de uma coalhada sólida visível.

$$ACL \left(\frac{U}{ml} \right) = \frac{2400}{\text{tempo de coagulação}(s)} * \text{fator de diluição} \quad (3)$$

Partição em sistemas aquosos bifásicos

Para o experimento de partição foram utilizadas três linhas de amarração dos sistemas formados por PEG 8000 g/mol, sulfato de amônio e água em pH 2,0 na temperatura de 25°C. Para obtenção dos sistemas foram adicionadas quantidades suficientes de PEG (50%), sulfato de amônio (40%) e extrato bruto (100 mM) para uma massa final de 10g para alcançar as concentrações descritas na Tabela 2. A mistura foi agitada e então centrifugada a 2000g por 10 minutos para acelerar a formação de fases. Posteriormente, o sistema foi mantido em repouso na temperatura de estudo por 12h em estufa BOD. Após esse tempo as fases foram coletadas para posterior determinação da atividade enzimática e determinação do teor de proteína.

Tabela 2. Composição global dos sistemas formados por PEG 8000 g/mol (w_1), sulfato de amônio (w_2) e água (w_3) em pH 2,0 na temperatura de 25°C utilizados no experimento de partição.

Linha de amarração	w_1	w_2	w_3
1	0,09	0,11	0,80
2	0,1	0,13	0,77
3	0,11	0,15	0,74

O coeficiente de partição da proteína (K_p), foi determinado como descrito na Equação 4 como a razão de entre a concentração de equilíbrio da proteína total (mg/mL) na fase superior (C_S) e na fase inferior (C_I):

$$K_p = \frac{C_S}{C_I} \quad (4)$$

O coeficiente de partição da atividade enzimática (K_e) é definido como a razão da atividade da enzima (U/mL) na fase superior (A_S) e fase inferior (A_I) de acordo com a Equação 5:

$$K_e = \frac{A_S}{A_I} \quad (5)$$

A seletividade (S) da enzima no sistema, foi determinada utilizando da equação 6

$$S = \frac{K_e}{K_p} \quad (6)$$

Onde K_e é o coeficiente de partição da enzima e K_p é o coeficiente de partição da proteína total na fase preferencial.

O fator de purificação (FP) foi calculado como a razão entre a atividade específica na fase preferencial e a atividade específica do extrato enzimático bruto, conforme Equação 7:

$$FP = \frac{A_{esp.purificada}}{A_{esp.bruta}} \quad (7)$$

Onde $A_{esp. purificada}$ é a atividade específica (U/mg de proteína) da enzima na fase superior e $A_{esp. bruta}$ é a atividade específica (U/mg de proteína) da enzima no extrato bruto

O rendimento de extração (Y_s) foi calculado de acordo com a equação 8.

$$Y_s = \frac{A_{fase}}{A_{extrato}} \times 100 \quad (8)$$

Onde, A_{fase} é a atividade total na fase preferencial da enzima e $A_{extrato}$ é a atividade total no extrato enzimático inicial. Sendo o valor calculado apresentado em porcentagem.

Parâmetros termodinâmicos do processo de partição

As medidas foram feitas pela metodologia de microcalorimetria de titulação isotérmica (ITC). Todos os experimentos foram realizados em microcalorímetro TAM III (TA instruments) controlado pelo programa TAM Assistant. O equipamento possui duas células calorimétricas (amostra e referência) com volume de 2 mL. O experimento consiste de 5 injeções consecutivas de alíquotas (50 μ L) de extrato bruto dentro da célula da amostra que inicialmente continha 0,9 mL de ambas as fases. O titulante foi adicionado com auxílio de uma seringa Hamilton com capacidade máxima de 250 μ L. O intervalo foi de 60 minutos entre as injeções. A mistura titulada foi agitada a 60 rpm usando um agitador de hélice. As medidas foram estabelecidas à temperatura constante de $25,00 \pm 0,001$ °C.

Os valores para variação de entalpia foram calculados pela integração da área abaixo dos pico em função do tempo e da mudança de potência conforme a Equação 9:

$$\Delta H = \int_{t_1}^{t_2} P(t). dt \quad (9)$$

O valor do número de mols da enzima transferida da fase inferior para a fase superior após cada adição (n_{TFS}) foi obtida pela Equação 10:

$$n_{TFS} = \frac{K_c}{K_c + 1} \cdot i \cdot n_{add} \quad (10)$$

Na qual o K_c é o coeficiente de partição, i o número de injeção e n_{add} é o número de mols adicionados em cada injeção.

A variação de entalpia de transferência foi determinada pela variação da entalpia dividido pelo n_{TFS} de acordo com a Equação 11:

$$\Delta_{tr}H = \frac{\Delta H}{n_{TFS}} \quad (11)$$

A variação da energia livre de Gibbs foi calculada de acordo com a equação 12.

$$\Delta_{tr}G = -RT \ln K_p \quad (12)$$

Onde: T é a temperatura absoluta em que o ensaio foi realizado; R é a constante dos gases ideais; e K_p é o coeficiente de partição da proteína.

A variação da entropia ($\Delta_{tr}S$) será determinada pela equação:

$$\Delta_{tr}G = \Delta_{tr}H - T\Delta_{tr}S \quad (13)$$

Eletroforese em gel de poliacrilamida com ureia

Para a realização da eletroforese UREA-PAGE (denaturing urea polyacrylamide gel electrophoresis) foram preparados géis de 8 x 10 cm e 1 mm de espessura. O gel de resolução (10% acrilamida) consistiu numa mistura de 5mL de acrilamida/bis-acrilamida 30% (m/v), 7,3mL de tampão do gel de resolução (Tris 0,76M; ureia 9M, pH 8,9), 2,5mL de água destilada, 150 μ L de APS (persulfato de amónio) 0,1g/mL e 50 μ L de TEMED (Tetrametil-etilenodiamina). Esta mistura foi então colocada nas placas de vidro, sem criar bolhas, e adicionou-se água destilada sobre o gel de modo a evitar o contato da mistura com o ar. A mistura ficou a polimerizar durante cerca de 20 minutos. Passado o tempo de polimerização, foi aplicado o gel de concentração (4% acrilamida), consistindo em 800 μ L de acrilamida/bis-acrilamida 30%, 4,7mL de Tampão do gel de concentração (Tris 0,06M; ureia 4,5M, pH 7,6), 450 μ L de água destilada, 40 μ L de APS e 10 μ L de TEMED. As amostras foram misturadas com o tampão de amostra (Tris 0,125M; Ureia 8,2 M; EDTA 2,5 mM; β -mercaptoetanol 0,2 M; 0,01% de azul de bromofenol, pH 6,8). Foram aquecidas a 95 °C, durante 5 minutos e em seguida colocadas em gelo, seguindo-se a sua aplicação nos poços do gel. A eletroforese desenvolveu-se a 40 mA, durante cerca de 2 horas e 30 minutos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Extração das enzimas

Os resultados do processo de extração das enzimas da flor do cardo e da alcachofra em função da atividade proteolítica estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Valores médios da atividade proteolítica (U/ml) obtidos no processo de extração das proteases da *Cynara Scolymus* e *Cynara Cardunculus*.

Citrato de sódio				
Tempo	<i>Cynara Scolymus</i>		<i>Cynara Cardunculus</i>	
	Com ultrassom (U/mL)	Sem ultrassom (U/mL)	Com ultrassom (U/mL)	Sem ultrassom (U/mL)
3h	6,908 ± 0,230	6,749 ± 0,130	7,234 ± 0,190	7,459 ± 0,210
6h	7,021 ± 0,210	7,783 ± 0,280	7,087 ± 0,150	8,376 ± 0,190
9h	7,546 ± 0,900	7,205 ± 0,480	7,010 ± 0,180	7,967 ± 0,140
12h	7,179 ± 0,190	7,259 ± 0,110	7,385 ± 0,090	7,850 ± 0,013
Sulfato de amônio				
3h	6,699 ± 0,036	6,766 ± 0,120	7,345 ± 0,045	7,663 ± 0,015
6h	6,983 ± 0,050	8,101 ± 0,018	7,524 ± 0,032	8,876 ± 0,011
9h	6,208 ± 0,060	7,112 ± 0,003	7,678 ± 0,040	7,581 ± 0,090
12h	6,374 ± 0,001	7,477 ± 0,014	7,574 ± 0,056	7,890 ± 0,032

Os resultados obtidos para atividade específica foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e a significância do modelo verificada utilizando o teste estatístico de Fisher (test-F). Verificou-se que o uso do ultrassom e o tempo no processo de extração não foram significativos pelo teste F ao nível de 5% de significância, assim como o efeito das interações entre o tipo de solução, tempo e o uso de ultrassom. Verificou-se diferença significativa entre as soluções usadas na extração, com os melhores resultados sendo obtidos com as extrações realizadas com sulfato de amônio no tempo de 6h. O $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ é formado por um cátion e um ânion considerados cosmotrópicos pela série de Hofmeister, que tem efeito salting-out sobre as proteínas, promovendo assim a formação de agregados e maior estabilidade das mesmas (Kunz, 2010). Além disso, a solução extratora com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em pH 2,0 está mais distante do ponto isoelétrico das proteases aspárticas ($\text{pI} \cong 4,0$) que a solução extratora com Citrato de Sódio em pH 3,0. Neste caso, as proteases estão com carga líquida positiva maior o que conduz à uma maior interação com os íons presentes, em baixa concentração, que por sua vez irão ajudar a reforçar a camada de solvatação das mesmas.

Partição das enzimas nos SAB

A partição das proteases presentes nos extratos obtidos a partir da *Cynara cardunculus* e *Cynara scolymus* foi determinada experimentalmente para sistemas aquosos bifásicos formados por PEG/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}$, em pH 2,0 e temperatura de 25 °C, cujas as composições do ponto global estão identificadas na Tabela 3. Também na Tabela 3, estão

apresentados os resultados de CLA, K_p, K_e, S, FP, Y(%), Δ_{tr}H, Δ_{tr}G, TΔ_{tr}S obtidos neste experimento.

Tabela 3- Parâmetros determinados a partir do processo de partição das proteases presentes nos extratos obtidos da *Cynara cardunculus* e *Cynara scolymus*.

<i>Cynara scolymus</i>										
Composição total ¹		CLA	K _p	K _e	S	FP	Y(%)	Δ _{tr} H	Δ _{tr} G	TΔ _{tr} S
w ₁	w ₂									
0,090	0,110	0,259	4,736	9,049	1,910	2,204	90,049	21,253	-5,457	26,833
0,100	0,130	0,376	5,404	15,462	2,861	3,766	93,925	48,654	-6,785	55,456
0,110	0,150	0,412	9,746	95,181	9,766	23,181	98,960	69,523	-11,288	80,799
<i>Cynara cardunculus</i>										
0,090	0,110	0,259	4,521	6,513	1,441	0,967	86,691	9,342	-4,643	14,013
0,100	0,130	0,376	2,040	7,182	1,361	1,066	73,515	25,898	-4,885	30,709
0,110	0,150	0,412	1,038	11,101	10,696	1,648	91,736	44,925	-5,964	50,094

¹w₁ é a fração mássica de PEG e w₂ é a fração mássica de sulfato de amônio.

O coeficiente de partição de proteínas (K_p), superior a 1,0, mostra que as proteínas presentes nos extratos estão preferencialmente concentradas na fase superior rica em PEG. Verifica-se, também que a atividade proteolítica foi maior na fase superior devido ao fato dos valores de K_e também serem superiores a 1,0. Tal fato indica que as proteínas em geral, com ou sem atividade proteolítica, possuem maior afinidade com a fase rica em macromolécula. Observa-se que tanto os valores de K_p quanto de K_e foram maiores para o extrato de alcachofra que para o extrato do cardo e que para o maior valor de CLA os valores para o extrato de alcachofra foram aproximadamente 9 vezes maior que para o extrato do cardo. A partição de um soluto para uma fase preferencial está relacionada com as variações entálpicas e entrópicas, referentes ao balanço energético das interações intermoleculares entre os componentes do sistema e a molécula alvo e às variações das interações realizadas e da conformação do soluto, respectivamente. Estas contribuições dependem do CLA que é um parâmetro termodinâmico que indica as diferenças entre as propriedades termodinâmicas intensivas das fases em equilíbrio em um SAB.

Observa-se que para a partição das proteínas totais presentes nos extratos estudados ocorreu um comportamento inverso quando compara-se o extrato de alcachofra com o extrato de cardo. Para o extrato da alcachofra o K_p aumentou com o aumento do CLA e para o extrato do cardo ocorreu a redução no valor do K_p. Madhusudhan e Raghavarao (2011) observaram o mesmo comportamento ao estudar a partição de invertase em sistemas compostos por PEG 3350 e sulfato de magnésio. No entanto, para o valor de K_e o comportamento foi o mesmo, indicando que com o aumento do CLA as proteínas com

atividade proteolítica tiveram preferência em migrar para a fase superior. Este comportamento pode ser explicado pelo fato de que o aumento do CLA provoca um aumento na concentração de sal na fase inferior e um aumento na concentração de polímero na fase superior. Portanto, cresce o número de interações entre as enzimas e o PEG, pois o aumento da concentração de sal na fase inferior faz com que mais íons do sal passem competir com moléculas da enzima para formar interações intermoleculares com moléculas de água. Assim, as moléculas de enzimas são desidratadas por meio dos íons de sal, causando um aumento na hidrofobicidade das moléculas de proteases favorecendo a interação Protease-PEG (Rito-Palamares, 2005; Saravanan, 2008).

Avaliando-se os valores dos parâmetros termodinâmicos de transferência da enzima da fase inferior para a fase superior (ΔG , ΔH e $T\Delta S$), em todos os casos o valor do $\Delta_{\text{tras}}G$ foi negativo, evidenciando que a partição das proteases para a fase superior (rica na macromolécula) é termodinamicamente favorável, e que o valor deste parâmetro torna-se mais negativo com o aumento do CLA. Sabendo que o valor do $\Delta_{\text{tras}}G$ é composto pelos valores da parte entálpica ($\Delta_{\text{tras}}H$) e entrópica ($T\Delta_{\text{tras}}S$) do processo, ao analisarmos estes valores verificamos que o processo é entropicamente dirigido uma vez que os valores de $\Delta_{\text{tras}}H$ e $T\Delta_{\text{tras}}S$ foram positivos para todos os casos. De acordo com Sousa et al. (2009) o particionamento governado pela entropia deve-se ao fato das proteases presumivelmente migrarem para a fase superior, uma vez que as moléculas de água que estavam interagindo com o PEG foram liberadas e, portanto o sistema tem a entropia aumentada.

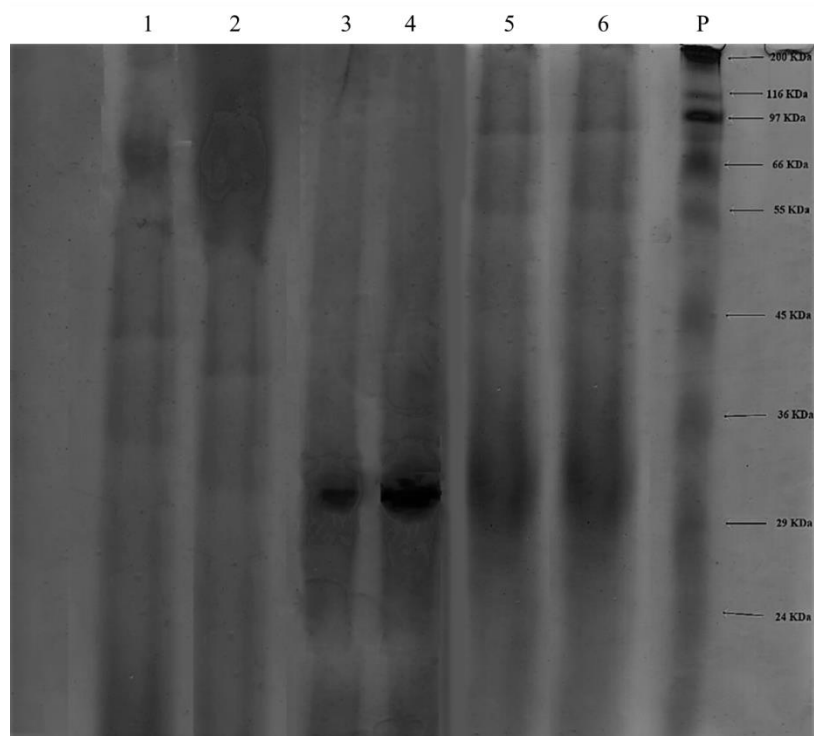
O índice de recuperação é uma medida da quantidade de proteína/enzima desejada que é recuperada em uma das fases em relação ao total proteína/enzima inicial no sistema. Os valores de recuperação de proteases nos extratos estão entre 73 – 91% e 90-98% para o extrato do cardo e da alcachofra, respectivamente. Segundo Jara e Pilosof (2011) em termos gerais, o índice de recuperação de proteínas/enzimas está na faixa de 60-95% para a maioria dos SAB comumente usados. De acordo com de Medeiros e Silva et al. (2013) estes valores, que podem ser considerados elevados, podem ser consequência da forma como o PEG interage com a proteína/enzima sem que ocorra uma alteração na estrutura da mesma que possa levar à variação da sua atividade. A seletividade e o fator de purificação aumentaram com o aumento do CLA para os dois extratos e tendo valores maiores para o extrato de alcachofra. Os valores para o fator de purificação obtidos neste estudo para o extrato de alcachofra foram próximos à vários trabalhos de purificação de proteases utilizando sistemas formados por PEG/Sal, como para protease alcalina (FP = 1,80) (Ketnawa *et al.*, 2010), protease produzida por *Penicillium fellutanum* (FP = 1,54) (Barros *et al.*, 2015) e protease

alcalina produzida por *Bacillus licheniformis* (FP = 1,37-2,62) (Yavari *et al.*, 2013). Portanto, a partir destes resultados pode-se inferir que existe a possibilidade de se utilizar os sistemas aqui estudados como parte de um processo de obtenção das proteases presentes, principalmente, na alcachofra.

Para comprovar a partição da enzima em uma das fases no sistema formado por PEG 8000 + sulfato de amônio + água no valor de pH 2,0 e temperatura de 25 °C linha de amarração 3 (CLA = 0,412) foi realizado a análise de eletroforese Uréia-PAGE, apresentado na Figura 3. As bandas do marcador molecular utilizado foram de 24 até 200 kDa (P). Pode-se supor a presença da cardosina no intervalo de 29 a 36 kDa nas linhas 5 (extrato bruto *Cynara Scolymus*) e linha 6 (extrato bruto *Cynara Cardunculus*). Llorente *et al.* (2005), estudando a purificação de protease aspártica de *Cynara Scolymus*, observaram que a massa molar para esta, foi de 31 kDa identificando-a como cardosina pela confirmação da sua sequência por meio de espectrometria de massa.

As amostras das fases superior e inferior do SAB com CLA de 0,412 (Tabela 3) estão representados da linha 1 a 4 (fase inferior – *Cynara Scolymus*, fase inferior – *Cynara Cardunculus*, fase superior – *Cynara Scolymus*, fase superior – *Cynara Cardunculus*, respectivamente). Pode-se observar que a cardosina presente no extrato bruto da *Cynara Scolymus* e *Cynara Cardunculus* foi preferencialmente concentrada na fase superior ($K_e > 1$) do sistema (linhas 3 e 4 respectivamente), enquanto os traços de impurezas dos dois extratos foram observadas na fase inferior (linha 1 e 2).

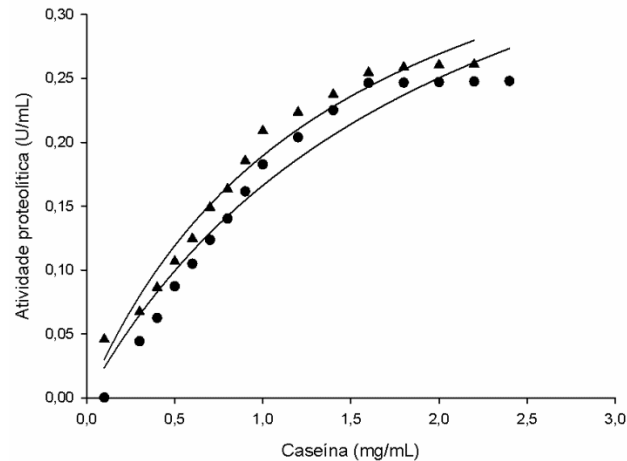
Figura 3: Perfil eletroforético (Uréia-PAGE) das proteases das flores de *Cynara Scolymus* e *Cynara Cardunculus*, (P) marcador molecular de proteínas (24 a 200 kDa); (1) Fase inferior – *Cynara Scolymus*; (2) Fase inferior – *Cynara Cardunculus*; (3) Fase superior – *Cynara Scolymus*; (4) Fase superior – *Cynara Cardunculus*; (5) Extrato Bruto *Cynara Scolymus*; (6) *Cynara Cardunculus*.



Parâmetros cinéticos

A fim de determinar os parâmetros cinéticos das proteases presentes nos extratos EA e EC após a partição, foi testado a capacidade de hidrólise da caseína. As enzimas apresentaram uma cinética de Michaelis-Menten (Fig. 1), com valores de K_m e V_{max} de 2,0532 mg/ml e 0,0503 μmol Tirosina/min e 1,4490 mg/ml e 0,0464 μmol Tirosina/min para EBA e EBC, respectivamente. K_m significa a afinidade da enzima pelo seu substrato, quanto maior a afinidade da enzima, menor o K_m . Podemos observar que as proteases do EC apresentaram maior afinidade pelo substrato do que as proteases do EA. Esse comportamento pode ser devido a maior atividade proteolítica do EC (6,76 U/ml) em comparação ao EA (4,11 U/ml).

FIGURA 1: Curva de Michaelis-Menten obtida para proteases presentes nos extratos EBA (●) e EBC (▲) usando caseína como substrato. Os valores de K_m e V_{max} foram computados a partir da equação Michaelis-Menten usando o software Sigmaplot.



Atividade de coagulação do leite

Segundo Nouani et al. (2009), a atividade de coagulação do leite é a característica mais importante das enzimas empregadas na fabricação de queijos. Portanto, experimentos de coagulação do leite foram realizados para avaliar a performance das proteases separadas na fase polimérica do SAB no qual os maiores valores de K_m , S , y e FP foram determinados. Foi avaliada, também, nestes experimentos, a influência do tipo de leite na atividade de coagulação destas proteases. Os valores da atividade de coagulação dos extratos EA e EC estão apresentados na Tabela 4. Pode-se observar que para os dois extratos a ACL aumentou na seguinte ordem: leite de búfala, leite de vaca, leite de cabra e leite de ovelha. Ou seja, nota-se que o leite de ovelha coagula mais rápido seguido do leite de cabra, bovino e búfala. Este fato pode ser explicado pelas diferenças de composição em matéria coagulável, essencialmente proteína e matéria gorda, e também devido à composição e características da fração proteica, mais precisamente a fração caseínica, mais determinante no fabrico de queijo (Barros, 2012). A concentração de caseínas no leite de ovelha (6,2%) é maior que no leite de cabra (3,4%), mas é menor do que no leite da vaca (3,2) e búfala (5,2%). Estas diferenças nas quantidades de caseína presentes no leite de ovelha e cabra explicam diferenças na estrutura da micela, que determinam variações na sua estabilidade e coagulação (Park *et al.*, 2007).

Segundo Afsharnejhad et al. (2019), um outro parâmetro importante para avaliar o potencial de substituição do coalho de uma protease é a razão entre ACL e a atividade proteolítica (AP). Um elevado valor desta razão aumenta a possibilidade da protease formar a coalhada e conseqüente ter um maior rendimento no processo e menor amargura. Llorente et al. (2005), ao caracterizar extrato a partir da *Cynara scolymus*, encontraram o valor de ACL/PA de 27,18 para leite de vaca e posteriormente o utilizou na fabricação de queijo tipo

gouda obtendo bons resultados tecnológicos (Llorente *et al.*, 2014). O valor encontrado pelos autores anteriormente mencionados está próximo ao encontrado neste trabalho para o extrato purificado de *Cynara scolymus*, como pode ser verificado na Tabela 4, indicando que o extrato purificado por sistema aquoso bifásico pode ser utilizado como coagulante na fabricação de queijo.

Tabela 4: Atividade de coagulação dos extratos de *Cynara Scolymus* e *Cynara Cardunculos* em diferentes tipos de leite.

<i>Cynara Scolymus</i>		
Tipo de leite	U/ml	ACL/AP
Búfala	50,131	12,19
Vaca	91,429	22,25
Cabra	101,053	24,59
Ovelha	166,957	40,62
<i>Cynara Cardunculus</i>		
Búfala	57,831	8,55
Vaca	99,482	14,72
Cabra	114,970	17,01
Ovelha	192,000	28,40

CONCLUSÃO

Foi possível verificar, com os estudos de partição, que as proteases presentes nos extratos da *Cynara Scolymus* e *Cynara cardunculos* foram preferencialmente concentradas na fase superior rica em PEG. Notou-se que, para ambos os extratos, o coeficiente de partição da enzima aumentou com o aumento do comprimento da linha de amarração, sendo os valores maiores para os K_e da *Cynara scolymus*.

Ao avaliar a energia livre de Gibbs de transferência ($\Delta_t G$) dos coeficientes de partição (K_p e o K_e) das proteases, de ambos extratos, observou-se que a transferência das proteínas para a fase polimérica é um processo espontâneo. E ao determinar a variação da Entalpia e da Entropia verificou-se que partição foi entropicamente dirigida para a fase superior.

Os valores de seletividade e o fator de purificação variaram de 1,9 a 9,7 e 2,2 a 23,1, respectivamente para *Cynara scolymus* e 1,4 a 10,69 e 0,96 a 1,65 para *Cynara cardunculus*. O rendimento de extração para ambos os extrato foi maior que 85% indicando a aplicabilidade do SAB para a purificação das proteases.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADETUNJI, V. AND O. SALAWU (2008). "West African soft cheese 'wara' processed with *Calotropis procera* and *Carica papaya*: A comparative assessment of nutritional values." African journal of Biotechnology 7(18).

AFSHARNEZHAD, M.; SHAHANGIAN, S. S.; SARIRI, R. A novel milk-clotting cysteine protease from *Ficus johannis*: Purification and characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 121, p. 173-182, 2019. ISSN 0141-8130.

AHMED, I. A. M. et al. Characterisation of partially purified milk-clotting enzyme from *Solanum dubium* Fresen seeds. *Food Chemistry*, v. 116, n. 2, p. 395-400, 2009. ISSN 0308-8146.

AHMED, I. A. M., I. MORISHIMA, ET AL. (2009). "Characterisation of partially purified milk-clotting enzyme from *Solanum dubium* Fresen seeds." *Food Chemistry* 116(2): 395-400.

ALCÂNTARA, L. A. P. et al. Aqueous two-phase poly (ethylene glycol)–sodium polyacrylate system for amyloglucosidase purification: Equilibrium diagrams and partitioning studies. *Separation and Purification Technology*, v. 118, p. 888-894, 2013. ISSN 1383-5866

AMID, M. et al. Purification of serine protease from mango (*Mangifera Indica* Cv. Chokanan) peel using an alcohol/salt aqueous two phase system. *Food chemistry*, v. 132, n. 3, p. 1382-1386, 2012. ISSN 0308-8146.

ANUSHA, R., M. K. SINGH, ET AL. (2014). "Characterisation of potential milk coagulants from *Calotropis gigantea* plant parts and their hydrolytic pattern of bovine casein." *European Food Research and Technology* 238(6): 997-1006.

BARROS, K. V. et al. Extraction protease expressed by *Penicillium fellutanum* from the Brazilian savanna using poly (ethylene glycol)/sodium polyacrylate/NaCl aqueous two-phase system. *Biotechnology and applied biochemistry*, v. 62, n. 6, p. 806-814, 2015. ISSN 0885-4513.

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, n. 1-2, p. 248-254, 1976. ISSN 0003-2697.

DE ARAUJO SAMPAIO, D. et al. 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. ISSN 0021-9614

DEVARAJ, K.; GOWDA, L. R.; PRAKASH, V. An unusual thermostable aspartic protease from the latex of *Ficus racemosa* (L.). *Phytochemistry*, v. 69, n. 3, p. 647-655, 2008. ISSN 0031-9422.

DOMSALLA, A. AND M. F. MELZIG (2008). "Occurrence and Properties of Proteases in Plant Latices." *Planta Med* 74(07): 699-711.

EGITO, A. S., J. M. GIRARDET, ET AL. (2007). "Milk-clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine κ -casein." *International Dairy Journal* 17(7): 816-825.

FERNÁNDEZ-SALGUERO, J., L. TEJADA, ET AL. (2002). "Use of powdered vegetable coagulant in the manufacture of ewe's milk cheeses." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82(4): 464-468.

E SILVA, G. M. D. M. et al. Extraction of fibrinolytic proteases from *Streptomyces* sp. DPUA1576 using PEG-phosphate aqueous two-phase systems. *Fluid Phase Equilibria*, v. 339, p. 52-57, 2013. ISSN 0378-3812.

JARA, F.; PILOSO, A. M. Partitioning of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in whey protein concentrate/hydroxypropylmethylcellulose aqueous two-phase systems. *Food hydrocolloids*, v. 25, n. 3, p. 374-380, 2011. ISSN 0268-005X.

KETNAWA, S.; RAWDKUEN, S.; CHAIWUT, P. Two phase partitioning and collagen hydrolysis of bromelain from pineapple peel Nang Lae cultivar. *Biochemical Engineering Journal*, v. 52, n. 2-3, p. 205-211, 2010. ISSN 1369-703X.

LI, Z. et al. Protease activity of enzyme extracts from tamarillo fruit and their specific hydrolysis of bovine caseins. *Food research international*, v. 109, p. 380-386, 2018. ISSN 0963-9969.

LLORENTE, B. E. et al. Use of artichoke (*Cynara scolymus*) flower extract as a substitute for bovine rennet in the manufacture of Gouda-type cheese: Characterization of aspartic proteases. *Food Chemistry*, v. 159, p. 55-63, 2014. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814614003926> >.

LLORENTE, B., C. B BRUTTI, ET AL. (2005). Purification and Characterization of a Milk-Clotting Aspartic Proteinase from Globe Artichoke (*Cynara Scolymus* L.).

LLORENTE, B.; B BRUTTI, C.; O CAFFINI, N. Purification and Characterization of a Milk-Clotting Aspartic Proteinase from Globe Artichoke (*Cynara scolymus* L.). 2005. 8182-9.

LO PIERO, A. R., I. PUGLISI, ET AL. (2002). "Characterization of "Lettucine", a Serine-like Protease from *Lactuca sativa* Leaves, as a Novel Enzyme for Milk Clotting." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(8): 2439-2443.

MADHUSUDHAN, M.C.; RAGHAVARAO, K.S.M.S. Aqueous two phase extraction of invertase from baker's yeast: Effect of process parameters on partitioning. *Process Biochemistry*, v. 46, n. 10, p. 2014-2020.

NASCIMENTO, R. G. et al. Liquid-Liquid Equilibrium of Two-Phase Aqueous Systems Composed of PEG 400, Na₂SO₄, and Water at Different Temperatures and pH Values: Correlation and Thermodynamic Modeling. *Journal of Chemical & Engineering Data*, v. 63, n. 5, p. 1352-1362, 2018/05/10 2018. ISSN 0021-9568. Disponível em: < <https://doi.org/10.1021/acs.jced.7b00947> >.

NOUANI, A. et al. Characterization of the purified coagulant extracts derived from artichoke flowers (*Cynara scolymus*) and from the fig tree latex (*Ficus carica*) in light of their use in the manufacture of traditional cheeses in Algeria. *J. Food Technol*, v. 7, n. 1, p. 20-29, 2009.

PARK, Y. et al. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small ruminant research*, v. 68, n. 1-2, p. 88-113, 2007. ISSN 0921-4488.

PONTUAL, E. V., B. E. A. CARVALHO, ET AL. (2012). "Caseinolytic and milk-clotting activities from *Moringa oleifera* flowers." *Food Chemistry* 135(3): 1848-1854.

ROSEIRO, L. et al. Cheesemaking with vegetable coagulants - The use of *Cynara* L. for the production of ovine milk cheeses. 2003. 76-85.

SINGH, R., A. MITTAL, ET AL. (2016). "Microbial protease in commercial applications." *J Pharm Chem Biol Sci* 4(3): 365-374.

SOUSA, M. J.; MALCATA, F. X. Advances in the role of a plant coagulant (*Cynara cardunculus*) in vitro and during ripening of cheeses from several milk species. *Lait*, v. 82, n. 2, p. 151-170, 2002. Disponível em: < <https://doi.org/10.1051/lait:2002001> >.

SOUSA, M.; MALCATA, F. Effects of processing conditions on the caseinolytic activity of crude extracts of *Cynara cardunculus* L/Efectos de las condiciones de extracción sobre la actividad caseinolítica de los extractos de *Cynara cardunculus* L. *Food science and technology international*, v. 2, n. 4, p. 255-263, 1996. ISSN 1082-0132.

SOUZA, P. M. et al. Production, purification and characterization of an aspartic protease from *Aspergillus foetidus*. *Food and Chemical Toxicology*, v. 109, p. 1103-1110, 2017. ISSN 0278-6915.

VERDOES, M. AND S. H. VERHELST (2016). "Detection of protease activity in cells and animals." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* 1864(1): 130-142.

YAVARI, M. et al. Partitioning of alkaline protease from *Bacillus licheniformis* (ATCC 21424) using PEG–K₂HPO₄ aqueous two-phase system. *Fluid Phase Equilibria*, v. 337, p. 1-5, 2013. ISSN 0378-3812.

Rito-Palomares M. Practical application of aqueous two phase partition to process development for the recovery of biological products. *J Chromatogr B*2005;807:3–11.

Saravanan S, Raghavarao J, Nair BU, Ramasami T. Aqueous two phase poly(ethylene glycol)–poly(acrylic acid) system for protein partitioning: influence of molecular weight, pH and temperature. *Process Biochem*2008;43:905–11.

Yegin S, Fernandez-Lahore M, Gama-Salgado AJ, Guvenc U, Goksungur Y, Tari C. Aspartic proteinases from *Mucor* spp. in cheese manufacturing. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011;89:949–60.

Chen J, Ouyang Y, Wang L, Xie W, Zhang Q. Aspartic proteases gene family in rice: Gene structure and expression, predicted protein features and phylogenetic relation. *Gene* 2009;442:108–18.

Vishwanatha KS, Appu Rao AG, Singh SA. Characterisation of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. *Food Chem* 2009;114:402–7.

Kumar S, Sharma NS, Saharan MR, Singh R. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: Purification and characterization. *Process Biochem* 2005;40:1701–5.