



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

Área de Concentração: Engenharia de Alimentos

ESTUDO EXPERIMENTAL E MODELAGEM TERMODINÂMICA DE SISTEMAS
AQUOSOS BIFÁSICOS PARA PARTIÇÃO DE LIPASE

ITAPETINGA
BAHIA- BRASIL

2021

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

ESTUDO EXPERIMENTAL E MODELAGEM TERMODINÂMICA DE SISTEMAS
AQUOSOS BIFÁSICOS PARA PARTIÇÃO DE LIPASE

IZABELLA DE CARVALHO BATISTA MUNIZ

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

Orientadora: DSc. Renata Cristina Ferreira Bonomo

CO-ORIENTADORES: DSc. Sérgio de Sousa Castro

DSc. Evaldo Cardozo de Souza Junior

ITAPETINGA
BAHIA - BRASIL
2021

660.634
M935e

Muniz, Izabella de Carvalho Batista.

Estudo experimental e modelagem termodinâmica de sistemas aquosos bifásicos para partição de lipase. / Izabella de Carvalho Batista Muniz. – Itapetinga-BA: UESB, 2021.
128f.

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte integrante das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração em Engenharia de Alimentos, para obtenção do título de mestre. Área de Concentração: Ciência de Alimentos. Sob a orientação da Prof^a. D. Sc. Renata Cristina Ferreira Bonomo e coorientação do Prof. D. Sc. Sérgio de Sousa Castro e Prof. D. Sc. Evaldo Cardozo de Souza Junior.

1. Sistemas aquosos bifásicos – PEG/sal - Partição de lipase. 2. Sistemas aquosos bifásicos – Álcool/sal - Partição de lipase. 3. Parâmetros termodinâmicos de transferência. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação de Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos, *Campus* de Itapetinga. II. Bonomo, Renata Cristina Ferreira. III. Castro, Sérgio de Sousa. IV. Souza Junior, Evaldo Cardozo de. V. Título.

CDD(21): 660.634

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. Partição de lipase – Extração líquido-líquido
2. Modelagem Termodinâmica dos SAB
3. Modelo UNIFAC



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB
Rectorado: Lado Sul, Caixa Postal 121
Nº 16.925, CEP-64-072016



DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: MODELAGEM E SIMULAÇÃO TERMODINÂMICA DE SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS UTILIZADOS PARA PARTIÇÃO DE LIPASE.

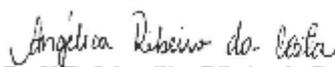
Autor (a): IZABELLA CARVALHO BATISTA MUNIZ

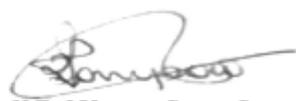
Orientador (a): Prof.ª Dr.ª Renata Cristina Ferreira Bonomo

Coorientador (a): Prof. Dr. Sérgio Souzaa Castro

Prof. Dr. Evaldo Cardozo de Souza Júnior

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


Prof.ª Dr.ª Angélica Ribeiro da Costa
Membro Externo – UFV


Prof.ª Dr.ª Vanessa Santos Sampaio
UESB



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

Itapetinga-BA, 26 de fevereiro de 2021.

“Precisamos encorajar mais mulheres a se atreverem a mudar o mundo”

(Monique Rocco)

A DEUS
Aos meus pais
Às minhas irmãs
À Gabriel, meu grande amor,
Dedico!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo amor verdadeiro e amparo nos momentos de angústia.

Aos meus pais, minha base, por todo incentivo e suporte. Por não medirem esforços para tornar os meus sonhos possíveis. Por acreditarem em mim até quando eu mesma não o faço. Vocês são donos do meu amor mais puro e sincero.

Às minhas irmãs, por todo amor. Por conseguirem se fazer presentes em todos os momentos, tristes e felizes, mesmo que à distância. Por sempre se alegrarem comigo e vibrarem com minhas conquistas.

A Gabriel, meu parceiro, por todo amor, cuidado e compreensão. Ter você perto de mim torna tudo mais fácil e leve.

À Karine, a amiga-irmã que Itapetinga me presenteou. Não tenho palavras pra agradecer todo apoio, carinho e amizade. Agradeço a Deus todos os dias por ter você em minha vida.

À professora Renata Bonomo, pela excelente orientação, compreensão, confiança e amizade. É uma honra poder conviver e aprender contigo!

Aos meus coorientadores, professores Sérgio e Evaldo. Agradeço as imensas contribuições e ensinamentos.

À Olga, pela amizade e trocas de experiências. Obrigada por todo incentivo e palavras de motivação. Não tenho palavras para agradecer todo apoio e ajuda que nunca hesitou em oferecer sempre que preciso. Tenho um carinho imenso por ti.

A Gui, Arthur e Lari, por todo amor e cuidado. Vocês são minha saudade diária.

Aos meus amigos de Itapetinga, por fazerem a morada aqui mais leve e aconchegante. Em especial, Gabriela, Jessyka, Jana, Thai, Kamila, Rebeca e Debóra, que estiveram mais presentes e em muitas vezes me proporcionaram momentos felizes.

Aos meus amigos da Terrinha.

Aos professores e alunos do laboratório de Engenharia de Processos (LEP) pelo apoio e trocas de conhecimento sempre que necessário. Em especial à Annie, Emília, Bia e Ka, por não medirem esforços para me ajudar. Sem dúvidas, eu não teria conseguido sem vocês.

Aos integrantes da banca examinadora, professoras Angélica e Vanessa por aceitarem fazer parte da avaliação desse trabalho e contribuírem tão positivamente.

Aos funcionários da UESB, em especial, Jam, por ser sempre tão prestativa, atenciosa e dedicada.

À Universidade Estadual Do Sudoeste Bahia (UESB) e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos (PPGECAL) pela oportunidade e por ter possibilitado o desenvolvimento deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

A todos aqueles que por ventura não tenham sido citados, mas que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, meu mais sincero muito obrigada!

ÍNDICE

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
2.1. Extração líquido-líquido	22
2.2. Sistemas aquosos bifásicos	22
2.3. Fatores que afetam os diagramas de equilíbrio.....	26
2.3.1. Massa molar do polímero	26
2.3.2. Tipo de álcool	27
2.4. Modelagem e teoria da formação dos SAB	29
2.5. Método UNIFAC (UNIquac Functional-group activity Coefficient).....	34
2.6. Lipase.....	38
2.7. Aplicação das lipases na indústria de alimentos	39
2.8. Purificação de lipases em sistema aquoso bifásico.....	39
3. OBJETIVOS	44
3.1. Objetivo Geral.....	44
3.2. Objetivos Específicos	44
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

CAPÍTULO 2

1. INTRODUÇÃO.....	57
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	59
2.1. Material.....	59
2.2. Determinação das curvas binodais e linhas de amarração	59
2.3. Determinação do efeito salting-out.....	61
2.4. Determinação do volume efetivo de exclusão	62
2.5. Determinação da Energia de Interação dos grupos dos sistemas.....	62
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
3.1. Diagramas de Equilíbrio	66
3.2. Efeito <i>salting-out</i> e volume efetivo de exclusão.....	69
3.3. Linhas de amarração	71
3.4. Modelagem Termodinâmica dos SAB'	75
4. CONCLUSÃO.....	83
5. REFERÊNCIAS	84

CAPÍTULO 3

1. INTRODUÇÃO	92
2. MATERIAL E MÉTODOS	93
2.1. Local do experimento	93
2.2. Material	93
2.3. Montagem dos sistemas aquosos bifásicos	94
2.4. Partição da lipase	97
2.4.1. <i>Determinação do teor de proteína</i>	98
2.4.2. <i>Determinação da atividade enzimática</i>	98
2.5. Determinação dos parâmetros de partição	99
2.5.1. <i>Determinação do coeficiente de partição de proteína</i>	99
2.5.2. <i>Determinação do coeficiente de atividade enzimática</i>	99
2.5.3. <i>Recuperação teórica</i>	99
2.5.4. <i>Fator de purificação da enzima</i>	99
2.5.5. <i>Seletividade dos SAB</i>	100
2.6. Avaliação dos parâmetros termodinâmicos de transferência	100
2.6.1. <i>Determinação da energia livre de Gibbs de transferência (ΔtrG)</i>	100
2.6.2. <i>Determinação da entalpia de transferência (ΔtrH)</i>	101
2.6.3. <i>Determinação da entropia de transferência (ΔtrS)</i>	101
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	102
3.1. Influência do comprimento da linha de amarração (<i>CLA</i>) no comportamento de partição da lipase LPP	102
3.2. Estudo dos parâmetros termodinâmicos de transferência	107
3.3. Avaliação da eficiência de extração da lipase nos SAB	115
4. CONCLUSÃO	119

APÊNDICES

Apêndice A. Teor de proteínas totais, atividade lipolítica, atividade enzimática específica da lipase pancreática de porco e coeficientes de partição de proteínas totais (K_p) e de atividade enzimática (K_e) nos SAB formados por PEG 4000 + K_2HPO_4/H_3PO_4 + água em diferentes temperaturas.....123

Apêndice B. Teor de proteínas totais, atividade lipolítica, atividade enzimática específica da lipase pancreática de porco e coeficientes de partição de proteínas totais (K_p) e de atividade

enzimática (Ke) nos SAB formados por PEG 6000 +K ₂ HPO ₄ /H ₃ PO ₄ + água em diferentes temperaturas.....	125
Teor de proteínas totais, atividade lipolítica, atividade enzimática específica da lipase pancreática de porco e coeficientes de partição de proteínas totais (Kp) e de atividade enzimática (Ke) nos SAB formados por 2-propanol +K ₂ HPO ₄ /H ₃ PO ₄ + água em diferentes temperaturas.....	127

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Estudos de modelagem termodinâmica e simulação aplicados a dados de equilíbrio de sistemas aquosos bifásicos..... 32

Tabela 2. Partição de lipases em sistemas aquosos bifásicos..... 41

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Composição global, expressas em fração mássica (m/m), dos sistemas formados por PEG (4000 ou 6000) ou álcool (1-propanol ou 2-propanol) + K_2HPO_4/H_3PO_4 + água..... 60

Tabela 2. Parâmetros R_K e Q_K dos grupos de contribuição de cada componente e quantidade de repetições de cada grupo em uma mesma molécula..... 62

Tabela 3. Parâmetros de ajuste a , b , c , e d da Eq. (1) para os SAB PEG (4000 ou 6000 $g \cdot mol^{-1}$) ou álcool (1-propanol ou 2-propanol) $[w_1]$ + K_2HPO_4/H_3PO_4 $[w_2]$ + água $[w_3]$, à 25 °C, pH 7.0 e $p = 0.1$ Mpa..... 67

Tabela 4. Parâmetros de ajuste (β e k) do efeito *salting-out* e do volume efetivo de exclusão (V_{213} *e f) para os SAB PEG (4000 ou 6000) ou álcool (1-propanol ou 2-propanol) + K_2HPO_4/H_3PO_4 + H_2O , à 25°C, pH 7.0 e $p = 0.1$ MPa^a..... 70

Tabela 5. Dados das linhas de amarração, em unidade de fração mássica, e densidades das fases dos SAB PEG (4000 ou 6000) ou álcool (1-propanol ou 2-propanol) $[w_1]$ + K_2HPO_4/H_3PO_4 $[w_2]$ + H_2O , à 25°C, pH 7.0 e $p = 0.1$ MPa. 72

Tabela 6. Valores dos parâmetros das correlações Othmer - Tobias (1942) (n e k_1) e Bancroft (r e k_2) para os SAB PEG (4000 ou 6000) ou álcool (1-propanol ou 2-propanol) + K_2HPO_4/H_3PO_4 + H_2O , à 25°C, pH 7,0 e $p = 0,1$ MPa. 75

Tabela 7. Parâmetros de interação (a_{ij} e a_{ji}) dos grupos de contribuição do modelo UNIFAC para sistemas formados por álcool (1-propanol ou 2-propanol) + K_2HPO_4/H_3PO_4 + H_2O 77

Tabela 8. Desvios nas composições dos sistemas formados por álcool (1-propanol ($\delta x_1(\%)$) ou 2-propanol ($\delta x_2(\%)$)) + K_2HPO_4/H_3PO_4 + H_2O correlacionadas pelo modelo UNIFAC por diferentes estratégias..... 78

Tabela 9. Parâmetros de interação (a_{ij} e a_{ji}) e Energia de interação (T_{ij} e T_{ji}) dos grupos de contribuição para sistemas formados por PEG (4000 ou 6000) ou álcool (1-propanol ou 2-propanol) + K_2HPO_4/H_3PO_4 + H_2O à 25°C..... 79

Tabela 10. Desvios nas composições dos sistemas formados por PEG (4000 e 6000) ou álcool (1-propanol ou 2-propanol) + K_2HPO_4/H_3PO_4 + H_2O , pelo modelo UNIFAC..... 82

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Composição global dos sistemas formado por PEG (4000 e 6000) + K ₂ HPO ₄ /H ₃ PO ₄ + água e álcool + K ₂ HPO ₄ /H ₃ PO ₄ + água, expressas em fração mássica.....	97
Tabela 2. Comprimento das linhas de amarração (CLA) dos SAB formados por PEG (4000 e 6000) + K ₂ HPO ₄ /H ₃ PO ₄ + água e álcool + K ₂ HPO ₄ /H ₃ PO ₄ + água.....	94
Tabela 3. Parâmetros termodinâmicos de transferência das proteínas nos SAB formados por PEG 4000 + K ₂ HPO ₄ /H ₃ PO ₄ + água em diferentes temperaturas (20, 25, 30 e 35) °C.....	108
Tabela 4. Parâmetros termodinâmicos de transferência das proteínas contaminantes nos SAB formados por 2-propanol + K ₂ HPO ₄ /H ₃ PO ₄ + água em diferentes temperaturas (20, 25, 30 e 35) °C.....	109
Tabela 5. Parâmetros termodinâmicos de transferência da lipase em SAB formados por PEG 4000 + K ₂ HPO ₄ /H ₃ PO ₄ + água em diferentes temperaturas (20, 25, 30 e 35) °C.....	111
Tabela 6. Parâmetros termodinâmicos de transferência da lipase em SAB formados por 2-propanol + K ₂ HPO ₄ /H ₃ PO ₄ + água em diferentes temperaturas (20, 25, 30 e 35) °C.....	112
Tabela 7. Índice de recuperação teórica (% Y), fator de purificação (FP) e Seletividade (S) dos SAB formados por PEG (4000 e 6000) + K ₂ HPO ₄ /H ₃ PO ₄ + água e 2-propanol + K ₂ HPO ₄ /H ₃ PO ₄ + água em diferentes temperaturas.....	112

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Diagrama de fases de um sistema aquoso bifásico, expresso em coordenadas retangulares. Fonte: (PEREIRA E COUTINHO, 2020).....24

CAPÍTULO 2

Figura 1. Curvas binodais expressas em unidade de fração mássica dos sistemas (A) PEG 4000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (●) ou PEG 6000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (○) $[\text{w}_1]$ + $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ $[\text{w}_2]$ + água $[\text{w}_3]$ e (B) álcool 1-propanol (○) ou 2-propanol (●) $[\text{w}_1]$ + $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ $[\text{w}_2]$ + água $[\text{w}_3]$, à 25 °C e pH 7.0. .68

Figura 2. Linhas de amarração obtidas pela regra da alavanca e preditas pelo modelo UNIFAC expressas em unidade de fração mássica, para SAB (A) PEG 4000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ou (B) PEG 6000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ $[\text{w}_1]$ + $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ $[\text{w}_2]$ + água $[\text{w}_3]$ e (C) álcool 1-propanol ou (D) 2-propanol $[\text{w}_1]$ + $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ $[\text{w}_2]$ + água $[\text{w}_3]$, à 25 °C e pH 7.0 e $p = 0,1$ MPa.82

CAPÍTULO 3

Figura 1. Coeficiente de partição de proteína (K_p) em função do comprimento da linha de amarração (CLA) dos SAB formados por PEG (4000 (A) e 6000 (B)) + $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ + água e 2-propanol + $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ + água (C) em diferentes temperaturas..... 103

Figura 2. Coeficiente de atividade enzimática (K_e) em função do comprimento da linha de amarração (CLA) dos SAB formados por PEG (4000 (A) e 6000 (B)) + $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ + água e 2-propanol + $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ + água (C) em diferentes temperaturas..... 104

RESUMO

MUNIZ, IZABELLA CARVALHO BATISTA. **Estudo experimental e modelagem termodinâmica de sistemas aquosos bifásicos para partição de lipase**. Itapetinga – BA: UESB, 2021. 128 p. Dissertação. (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos; Área de Concentração em Engenharia de Alimentos) *.

O método de extração líquido-líquido por sistemas aquosos bifásicos (SAB) é bastante atrativo para processos de extração, concentração e/ou purificação de biomoléculas. Um dos principais motivos pelo qual a técnica de extração de biocompostos por SAB vem despertado tanto interesse é o fato de esses sistemas serem constituídos majoritariamente por água. O conhecimento das interações que ocorrem no processo de formação de fases aliado à modelagem termodinâmica e à simulação molecular pode potencializar a utilização dos SAB no processo de purificação. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo estudar o equilíbrio de fases de SAB formados por PEG/sal e álcool/sal e a aplicação destes na partição de lipase. Inicialmente, determinaram-se dados de equilíbrio de fases de sistemas aquosos bifásicos formados por PEG (4000 e 6000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) + ou álcool (1-propanol ou 2-propanol) + sal + água. Para isto, foram obtidas as curvas binodais pela técnica turbidimétrica, totalizando quatro diagramas de fases com três linhas de amarração para cada, obtidas pela regra da alavanca. Tanto a massa molar do polímero quanto o tipo de álcool utilizado exerceram influência nos diagramas de fase. Foram observados acréscimos na região bifásica à medida que a hidrofobicidade dos componentes (PEG ou álcool) aumentou. Os elevados valores de coeficiente *salting-out* e volume de exclusão confirmaram o comportamento observado nos diagramas. Utilizaram-se os dados experimentais das linhas de amarração para estimar os parâmetros de interação de grupo por meio do modelo UNIQuac Functional Group Activity Coefficient (UNIFAC). Os baixos valores de desvios entre as composições experimentais e calculadas pelo modelo indicam que sua utilização é confiável para obter dados de equilíbrio para sistemas que contêm os mesmos grupos de contribuição. Posteriormente, foi realizado um estudo dos parâmetros termodinâmicos associados ao comportamento de partição da lipase pancreática de porco (LPP) comercial em sistemas aquosos bifásicos formados por PEG (4000 e 6000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) ou 2-propanol + sal + água em pH 7,0 nas temperaturas (20, 25, 30 e 35 °C). Os valores de K_p indicaram que as proteínas migraram preferencialmente para a fase superior dos sistemas (rica em PEG ou álcool). Na maioria dos sistemas estudados a maior atividade lipolítica ocorreu na fase salina, indicando que a LPP permaneceu em maior concentração na fase inferior. Verificou-se uma tendência de acréscimo no valor de K_p e redução dos valores de

K_e à medida que o comprimento da linha de amarração (CLA) aumentou. O melhor sistema para a partição da lipase pancreática de porco foi o SAB formado por 13% de PEG 4000 e 9% de K_2HPO_4/H_3PO_4 (LA 1) à 25 °C, o qual apresentou $K_e = 0,056$, indicando elevada capacidade da fase salina concentrar a lipase. Com esse sistema a recuperação teórica e o fator de purificação obtiveram valores máximos de 94,655% e 4,357, respectivamente, e a preferência da lipase pela fase salina foi movida por contribuições entálpicas, isto é, foi resultado da forte interação enzima-sal que foi maior que a interação proteína-PEG.

Palavras-chave: extração líquido-líquido, modelagem, simulação, modelo UNIFAC, parâmetros termodinâmicos de transferência, equação de Van't Hoff.

* Orientadora: Renata Cristina Ferreira Bonomo, DSc., UESB.

ABSTRACT

MUNIZ, IZABELLA CARVALHO BATISTA. **Experimental study and thermodynamic modeling of aqueous two-phase systems for lipase partition.** Itapetinga – BA: UESB, 2021. 128 p. Dissertation. (Master in Engineering and Food Sciences, Concentration in the Engineering area) *.

The liquid-liquid extraction method by aqueous two-phase systems (ATPS) is very attractive for biomolecules extraction, concentration and/or purification processes. One of the main reasons why the technique of extracting biocompounds by ATPS has attracted so much interest is the fact that these systems are mainly constituted by water. The knowledge of the interactions that occur in the phase formation process combined with thermodynamic modeling and molecular simulation can enhance the use of ATPS in the purification process. Therefore, this work aimed to study the phase equilibria of ATPS formed by PEG/salt and alcohol/salt and their application in the lipase partition. Initially, phase equilibrium data of ATPS formed by PEG (4000 and 6000 g·mol⁻¹) + or alcohol (1-propanol or 2-propanol) + salt + water were determined. For this, the binomial curves were obtained by the turbidimetric technique, totaling four phase diagrams with three tie-lines for each, obtained by the lever rule. Both the molar mass of the polymer and the type of alcohol used influenced the phase diagrams. Increases in the biphasic region as the increases hydrophobicity of the components (PEG or alcohol) were observed. The high values of *salting-out* coefficient and excluded volume confirmed the behavior observed in the diagrams. Experimental data from the tie-lines were used to estimate the group interaction parameters through the UNIQuac Functional Group Activity Coefficient (UNIFAC) model. The low values of deviations between the experimental and calculated compositions indicate that its use is reliable to obtain equilibrium data for systems that contain the same contribution groups. Subsequently, a study of the thermodynamic parameters associated with the partitioning behavior of commercial porcine pancreatic lipase (LPP) in ATPS formed by PEG (4000 and 6000 g·mol⁻¹) or 2-propanol + salt + water at pH 7.0 and temperatures (20, 25, 30 and 35 °C) was carried out. The K_p values indicated that the proteins migrated preferentially to the top phase of the systems (rich in PEG or alcohol). In most of the systems studied, the highest lipolytic activity occurred in the saline phase, indicating that LPP remained at a higher concentration in the lower phase. There was a tendency for an increase in the value of K_p and a reduction in the values of K_e as the tie-line length (TLL) increased. The best system for porcine pancreatic lipase partition was the ATPS formed by 13% of PEG 4000 and 9% of K_2HPO_4/H_3PO_4 (TL 1) at 25 °C, which presented $K_e = 0.056$, indicating high capacity of the saline phase concentrate the lipase. With this system, the theoretical recovery

and the purification factor obtained maximum values of 94.655% and 4.357, respectively, and the preference of lipase for the saline phase was driven by enthalpic contributions, that is, it was a result of the strong enzyme-salt interaction, which was higher than the enzyme-PEG interaction.

Keywords: liquid-liquid extraction, modelling, simulation, UNIFAC model, thermodynamic parameters of transfer, Van't Hoff Equation.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

REFERENCIAL TEÓRICO

OBJETIVOS

1. INTRODUÇÃO

Os sistemas aquosos bifásicos (SAB), técnica de extração líquido-líquido, vêm se destacando dentre as técnicas de purificação como alternativa viável aos métodos convencionais de separação e recuperação de biocompostos. São sistemas constituídos por duas fases imiscíveis ou parcialmente miscíveis entre si, ambas compostas majoritariamente por água, que promovem a separação do composto de interesse em condições amenas, de forma que sejam preservadas características como conformação estrutural, estabilidade e atividade biológica (NADAR et al., 2017). Essa técnica apresenta vantagens de possuir baixo custo, possibilidade de reprodução em larga escala, baixo consumo de energia, curto tempo de processamento, promover poucos impactos ambientais e elevada biocompatibilidade (PENIDO et al., 2019; SOUSA et al., 2017). Estes sistemas têm sido amplamente empregados para separar, purificar e recuperar biomoléculas de fontes convencionais e não convencionais (BLATKIEWICZ et al., 2018; SABO et al., 2018; DOBREVA, et al., 2019; ESCUDERO et al., 2019; SANTOS et al., 2020).

Para que a utilização de um SAB no processo de extração de compostos seja eficiente, é necessário o conhecimento do seu diagrama de fases. Dessa forma, além dos dados experimentais, os modelos termodinâmicos utilizados para correlacioná-los são importantes ferramentas a serem utilizadas para potencializar a aplicação dos mesmos (HAMTA et al., 2017). Vários modelos têm sido propostos para correlacionar os dados de equilíbrio e os parâmetros termodinâmicos, dentre eles destacam-se os modelos UNIQUAC e ASOG, que se baseiam no princípio de composição local, e UNIFAC e ASOG, que se baseiam no método de contribuição de grupos, os quais são comumente utilizados para estudar o comportamento de sistemas aquosos bifásicos. O modelo UNIFAC Functional Group Activity Coefficient (UNIFAC) proposto por Fredenslund, Jones e Prausnitz (1975) é um dos mais citados na literatura e tem como princípio básico a combinação do conceito de solução de grupos para a parte residual, devido a contribuições entálpicas, com o modelo UNIQUAC para a parte combinatória, devido a contribuições entrópicas.

Os SAB têm sido empregados com sucesso em processos de separação e purificação de lipases de fontes convencionais e não convencionais (ZHOU et al., 2013; ANVARI 2015; DUARTE et al. 2015; ALHELLI et al. 2016; RAMAKRISHNAN et al. 2016; CARVALHO et al. 2017; DOBREVA et al. 2019). Essas enzimas constituem um grupo com importante papel biotecnológico devido às suas inúmeras aplicações em diversos setores industriais tais como têxtil, químico, farmacêutico e alimentício (GULDHE et al., 2015; KUMAR et al., 2016). Na

indústria de alimentos atuam no processamento de queijos (ZHANG et al., 2012), na hidrólise da gordura do leite e na obtenção de ingredientes alternativos para produção de manteiga (VIRTO et al., 2003; PASCOAL e al., 2018), no aprimoramento das características do glúten, elevando a qualidade dos produtos de panificação (GOESAERT et al., 2005; GANDRA et al., 2008), também pode ser aplicada na obtenção de monoacilgliceróis, que são usados como agentes emulsificantes (FREIRE e CASTILHO, 2008).

A literatura reporta estudos que avaliam o processo de extração/purificação de lipases obtidas de fontes diversas em sistemas aquosos formados por polietilenoglicol/álcool e sal fosfato de potássio em diferentes condições de temperaturas e valores de pH (BLATKIEWICZ et al., 2018; CARVALHO et al., 2017; ALHELLI et al., 2016; RAMAKRISHNAN et al. 2016; ZHOU et al., 2013). Entretanto, a modelagem termodinâmica desses sistemas bem como o estudo das forças motrizes que governam a distribuição da biomolécula nas fases ainda são pouco explorados. Sendo assim, a continuidade desses estudos é necessária para aprimorar o conhecimento dos parâmetros que interferem no particionamento de moléculas de interesses e assim, potencializar a aplicação dos SAB. O presente trabalho teve como objetivo estudar o equilíbrio de fases de sistemas aquosos bifásicos formados por PEG (4000 ou 6000 g·mol⁻¹) + sal fosfato de potássio ou álcool (1-propanol ou 2-propanol) + sal fosfato de potássio e água à 25 °C e pH 7 e sua aplicação na partição de lipase.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Extração líquido-líquido

Extração líquido-líquido (ELL) é uma operação unitária amplamente utilizada pelas indústrias em processos de separação, concentração e purificação de compostos de interesse biotecnológico, a qual se baseia na transferência de massa de solutos entre dois solventes imiscíveis ou parcialmente miscíveis (PENA-PEREIRA et al., 2009; SONIYA; MUTHURAMAN, 2015).

Essa técnica de extração é atrativa por apresentar vantagens como alto rendimento, seletividade, simplicidade tecnológica e baixo custo (SOUSA et al., 2017). Entretanto a utilização de solventes orgânicos é um fator limitante para a utilização da ELL na obtenção de biomoléculas para aplicação biotecnológica tais como enzimas, proteínas, corantes e outros, uma vez que seus componentes podem ocasionar a redução da estabilidade da molécula-alvo. Além disso, pode ocasionar impactos ambientais negativos e desencadear problemas à saúde humana já que grande parte dos solventes utilizados, a exemplo do metanol, tolueno acetona, clorofórmio, hexano, dentre outros, podem ser tóxicos, inflamáveis e/ou cancerígenos (PENA-PEREIRA et al., 2009; MAGESTE et al., 2012; SOUSA et al., 2017).

Diante de tais desvantagens, muitos pesquisadores têm voltado seus estudos para um método alternativo de ELL conhecido como sistema aquoso bifásico (SAB). Esses sistemas constituem uma ferramenta viável de purificação porque são capazes de promover um ambiente ameno contribuindo para a estabilidade das biomoléculas, principalmente por serem formados predominantemente por água. Além de apresentarem elevada biocompatibilidade com materiais biológicos, baixa tensão interfacial, rápida separação de fases, baixo custo e facilidade de reprodução em larga escala (SOUSA et al., 2017).

2.2. Sistemas aquosos bifásicos

A formação dos SAB é conhecida desde o final do século XIX, quando o microbiologista holandês Beijerinck percebeu que ao misturar soluções aquosas de gelatina e ágar ou amido solúvel em determinadas faixas de temperatura e concentração, ocorria a separação espontânea em duas fases líquidas límpidas. A fase inferior era enriquecida em ágar ou amido e a superior em gelatina, sendo a água o componente majoritário em ambas as fases (DA SILVA; LOH, 2006). Entretanto, a utilização dos SAB como processo de bioseparação só ficou evidente no final da década de 1950, com os trabalhos de Per-Ake Albertsson, que mostrou à comunidade acadêmica a potencialidade destes sistemas em processos de extração

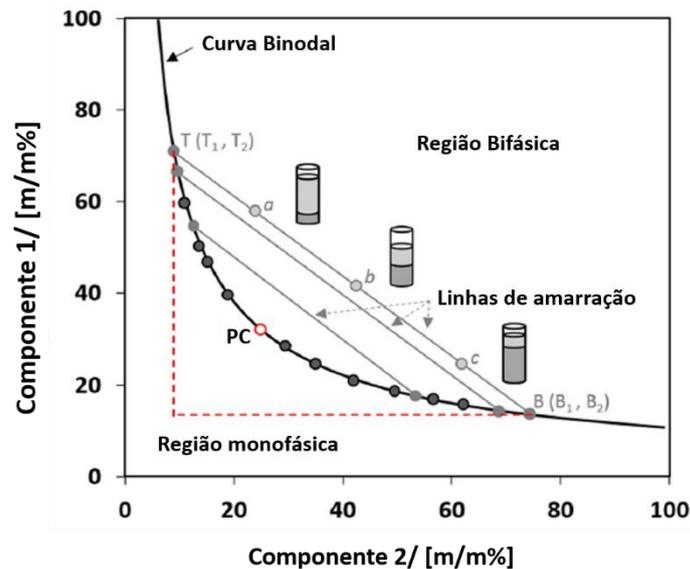
de materiais biológicos. Desde então, pesquisas relacionadas à utilização dos SAB em processos de purificação de biomoléculas como proteínas (LO et al., 2018; TEXEIRA-PINTO et al., 2018), enzimas (BLATKIEWICZ et al., 2018; DOBREVA et al., 2019), fármacos (SOUSA et al. 2017), peptídeos (SABO et al., 217), corantes (BATISTA et al., 2020; ESCUDERO et al., 2019) e outras moléculas de interesse biotecnológico têm se aprofundando cada vez mais.

Sistemas aquosos bifásicos são misturas compostas majoritariamente por água, que sob condições pré-estabelecidas de composição, temperatura e pressão apresentam duas fases imiscíveis ou parcialmente miscíveis, em equilíbrio termodinâmico. Podem ser formados por polímero-polímero, polímero-sal, álcool-sal, líquido iônico-sal, sal-surfactante, polímero-surfactante, líquido iônico-surfactante, surfactante-surfactante, dentre outras possíveis combinações (TAN et al., 2017; BARRETO et al., 2019; PIMENTEL et al., 2017; DIMITRIJEVIĆ et al., 2020; SALABAT et al., 2010; LIU et al., 2016; ESCUDERO et al., 2019; DAI et al., 2015).

O conhecimento dos dados de equilíbrio é fundamental para a utilização do SAB no processo de extração/purificação. Sendo assim, para a utilização dos SAB em processos de partição, faz-se necessário o estudo dos diagramas de equilíbrio de fases uma vez que estes são utilizados como ponto de partida para o desenvolvimento de um processo de separação de biomoléculas eficiente (KABIRI-BADR; CABEZAS Jr, 1996). O diagrama de fases consiste em uma representação gráfica dos dados de equilíbrio termodinâmico de um determinado sistema. Nesses diagramas são encontradas inúmeras informações relacionadas à minimização da energia livre do sistema, como por exemplo, as composições globais necessárias para que haja formação de fases (DA SILVA; LOH 2006).

Os diagramas de fases representam os solutos formadores dos sistemas presentes em maior quantidade nas fases inferior e superior, no eixo das abcissas e das ordenadas, respectivamente. A quantidade de água é calculada por diferença. A região onde a solução é homogênea e a região onde ocorre formação de fases são delimitadas por uma curva denominada curva binodal ou curva de equilíbrio. Sendo que a região acima da curva binodal é denominada como bifásica e abaixo, monofásica (ALBERTSSON, 1958). A Figura 1 esquematiza um diagrama de fases, ilustrando como que o conjunto de pontos globais constituídos pelas quantidades mínimas necessárias de w_1 e w_2 (em fração mássica) dos componentes incompatíveis 1 e 2, respectivamente, para que haja a formação de uma mistura bifásica, dão origem a curva binodal.

Figura 1. Diagrama de fases de um sistema aquoso bifásico, expresso em coordenadas retangulares. Fonte: (PEREIRA E COUTINHO, 2020).



Nos diagramas de fases também estão representadas as linhas de amarração, essas unem as composições das fases no equilíbrio. Os diferentes sistemas bifásicos originados de pontos globais presentes em uma mesma linha de amarração possuem fases com propriedades intensivas (densidade, volume molar, entalpia molar, entre outros) iguais e propriedades extensivas (massa, volume, etc.) diferentes. No ponto crítico (PC) as duas fases possuem a mesma composição, e o coeficiente de partição dos componentes é igual a 1 (ASENJO e ANDREWS, 2011). Em pontos próximos ao ponto crítico existem alterações na composição dos sistemas que provocam grandes alterações na qual o sistema varia de uma para duas fases e vice-versa (ALBERTSSON, 1986).

A partir da composição das fases é possível calcular o comprimento da linha de amarração (CLA). O CLA é um parâmetro termodinâmico utilizado para caracterizar o sistema, além de ser uma variável importante para determinar processos de partição dos solutos em SAB formados por diferentes componentes (DA SILVA; LOH, 2006; PEI et al., 2009). O valor de CLA pode ser calculado a partir das concentrações dos componentes nas fases, como mostra a Eq. (1).

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

Em que: $[\Delta C_1]$ e $[\Delta C_2]$ correspondem a diferença de concentração de componente 1 (C_1) e componente 2 (C_2), respectivamente, entre as fases do sistema.

Outro parâmetro estudado para caracterização dos SAB é a inclinação da linha de amarração (ILA). Tal parâmetro fornece uma medida de como a composição das fases podem variar em função das propriedades físico-químicas do sistema como temperatura, pH, massa molar/concentração dos componentes, dentre outras. O valor de ILA mensura o processo de partição dos componentes formadores das fases. Valores de ILA muito maiores ou menores que 1 indicam que ocorre uma grande partição do componente 2 para fase superior ou do componente 1 para fase inferior, respectivamente. Um valor de ILA próximo da unidade indica que a partição dos componentes é próxima em suas respectivas fases. Pequenos gradientes de concentração do componente 1 pode resultar em baixos valores de ILA, enquanto que valores elevados de ILA podem estar relacionados a pequenos gradientes de concentração do componente 2.

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

Em que: $[\Delta C_1]$ e $[\Delta C_2]$ são as diferenças de concentração de componente 1 (C_1) e componente 2 (C_2), respectivamente, entre as fases do sistema.

Recentemente, dois outros parâmetros têm sido frequentemente avaliados a fim de se estender a compreensão a respeito do processo de formação do SAB. São eles o efeito *salting-out* e o volume efetivo de exclusão (*EEV*). O efeito *salting-out* é um fenômeno induzido pela presença de íons em um determinado meio. Segundo Fu et al. (2019), a quantificação do efeito *salting-out* em um SAB pode refletir a tendência de um eletrólito inorgânico induzir a segregação de uma pequena molécula orgânica de uma fase para outra. Wang et al. (2010) afirma que escolha de um sal com habilidade *salting-out* elevada influencia de maneira significativa a formação de um sistema aquoso bifásico. Isso porque entende-se que quanto maior o efeito *salting-out* de um sal/íon, menor a sua quantidade mínima necessária para ocasionar a formação de duas fases. Alguns estudos confirmam tal hipótese, mostrando que quanto maior a habilidade *salting-out* do sal sobre os dados de equilíbrio, maior a região bifásica para os SAB estudados (FU et al., 2019; KHAYATI et al., 2016; PIMENTEL et al., 2017; WANG et al., 2010).

O volume efetivo de exclusão está relacionado com o volume de espaços vazios presente em uma molécula, disponíveis para interações intermoleculares. O modelo do *EEV* foi proposto por Guan et al. (1993) e se baseia no conceito de que a curva binodal é composta da mistura de solução geometricamente saturada de um soluto na presença de outro componente e macroscopicamente, qualquer espécie de molécula na solução é distribuída de forma aleatória.

Segundo Wang et al. (2010a), a competição mútua entre íons e moléculas de um solvente hidrofílico ou um polímero por moléculas de água em um SAB ocasiona a exclusão de tal solvente/polímero para uma fase oposta a qual os íons estão concentrados, resultando em fases com propriedades termodinâmicas bem definidas. Dessa maneira, a teoria do volume de exclusão pode ser utilizada para correlacionar a intensidade do efeito *salting-out* de um eletrólito na exclusão do polímero ou álcool hidrofílico.

Os mecanismos associados à formação de duas fases aquosas são dominados pelo equilíbrio termodinâmico do sistema (ASENJO e ANDREWS, 2011). Diversos fatores podem influenciar significativamente o equilíbrio termodinâmico de um SAB e conseqüentemente, o processo de partição de biomoléculas.

2.3. Fatores que afetam os diagramas de equilíbrio

As variáveis usualmente estudadas no processo de separação de fases são tipo e concentração dos componentes formadores dos sistemas, propriedades de superfície, massa molar do polímero, temperatura, pH, força iônica das soluções salinas e presença de componentes adjuvantes como líquidos iônicos, sais e surfactantes (MAGESTE et al., 2009; IQBAL et al., 2016; NADAR et al., 2017). A seção seguinte apresenta de forma mais detalhada as variáveis investigadas nesse trabalho.

2.3.1. Massa molar do polímero

O tamanho da cadeia polimérica exerce influência significativa sob os diagramas de equilíbrio. De um modo geral, o aumento da massa molar do polímero, reduz a concentração mínima requerida de sal ou de outro componente formador do sistema para que ocorra a formação de duas fases.

Dentre os diversos polímeros utilizados para a formação de sistemas aquosos bifásicos, destaca-se o polietilenoglicol (PEG). O PEG é formado por unidades de óxido de etileno contendo oxigênios portadores de pares de elétrons livres. Nesses sítios ativos ocorrem as interações com as moléculas de água, íons e outras substâncias. Trata-se de uma macromolécula de grande interesse biotecnológico por possuir ação precipitante e apresentar alta biodegradabilidade e não-toxicidade, sendo o seu descarte não problemático para o meio ambiente (SILVA, 2007). Sua baixa toxicidade permite ser amplamente utilizado em aplicações comerciais nas indústrias de alimentos, de sabões e medicamentos (PEREIRA, 2008). Tais fatores podem explicar a utilização do PEG na purificação de biomoléculas quando se emprega sistemas aquosos bifásicos. Diversos estudos reportados na literatura confirmam a influência

da massa molar do PEG no comportamento de sistemas aquosos bifásicos formados por PEG e sais.

Barbosa et al. (2015) analisaram o efeito da massa molar do PEG nas curvas binodais para sistemas formados por PEG (1500 e 4000 g·mol⁻¹), sulfato de sódio e água em diferentes temperaturas e concluíram que a região bifásica aumentou com o aumento da massa molar do polímero. Resultados semelhantes também foram obtidos por Barani et al. (2018) ao avaliarem SAB formados por PEG (1500 e 6000 g·mol⁻¹), tartarato de potássio e água em diferentes temperaturas e valores de pH e por Sosa et al. (2017) ao estudarem o efeito da massa molar do PEG nas curvas binodais para sistemas formados por PEG (2000, 4000 e 6000 g·mol⁻¹), sais de sulfato (CuSO₄ e MgSO₄) e água em diferentes temperaturas.

A maior facilidade de formação de fases em sistemas formados por PEG de maior massa molar é consequência do aumento da hidrofobicidade apresentada por estes. Isto é, aumento da cadeia carbônica, proporciona o fortalecimento das interação carbono-carbono na molécula, diminuindo a solubilidade do PEG em água e sua compatibilidade com outros componentes formadores do sistema que apresentem caráter mais hidrofílico, ocasionando a separação dos componentes da mistura.

2.3.2. Tipo de álcool

A hidrofobicidade de um álcool alifático tem relação direta de proporcionalidade com o comprimento de sua cadeia, sendo sua solubilidade em água reduzida à medida que o número de átomos de carbono aumenta (REIS et al., 2012). As interações intermoleculares álcool-água são decisivas para demonstrar a solubilidade de um álcool em meio aquoso. Portanto, em um sistema aquoso bifásico, álcoois que realizam interações intermoleculares mais fracas com as moléculas de água podem ser facilmente excluídos para uma fase oposta (rica em álcool) quando componentes com maior hidrofobicidade, a exemplo dos sais inorgânicos, são adicionados ao meio (NEMATIKANDE et al., 2012).

Os álcoois hidrofílicos de cadeia curta, como etanol e propanóis, possuem vantagens de baixo custo, baixa viscosidade e tensão superficial e elevada biodegradabilidade. SAB formados por esses álcoois e sal requerem pouco tempo para separação de fases, apresentam baixa toxicidade ambiental, e proporcionam facilidade de recuperação composto particionado a partir da reciclagem da fase rica em álcool, aumentando assim, a viabilidade econômica do processo de purificação (AKAMA et al., 1999; GUO et al., 2012; REIS et al., 2014).

Sabe-se que os propanóis (1-propanol e 2-propanol) são álcoois completamente miscíveis em água a qualquer temperatura acima do ponto de congelamento. Contudo, a

presença de certos componentes eletrolíticos no meio pode ocasionar a divisão da mistura em duas fases líquidas (GARCIA-CANO et al., 2019; LO et al., 2018; GUO et al., 2012; REIS et al., 2012; REIS et al., 2014), ambas formadas por elevada concentração de água, constituindo um meio promissor para processos de extração/purificação de biomoléculas.

A capacidade de formação de fases do álcool pode ser explicada em termos de suas propriedades principalmente, as energias de auto-interação, ramificação molecular e polaridade (ZAFARANI-MOATTAR et al., 2019; LO et al., 2015; KHAYATI; GHOLITABAR, 2016; WANG et al., 2010). Quanto maior a magnitude das forças de auto-interação, maior a hidrofobicidade da cadeia alquílica e como mencionado anteriormente, maior a facilidade de as moléculas de álcool serem excluídas para uma fase oposta. Esse comportamento tem sido observado e discutido em diversos estudos. Wang et al. (2010b) avaliaram a influência de diferentes álcoois em SAB formados por etanol/1-propanol/2-propanol + sulfato de amônio + água à 25 °C e verificaram que a capacidade de formação de fases seguiu a ordem 1-propanol > 2-propanol > etanol. Neste estudo eles associam as forças intramoleculares do álcool com seu respectivo ponto de ebulição, isto é, quanto maior a magnitude da energia de auto-interação do álcool, maior seu ponto de ebulição. Os valores das temperaturas de ebulição são (97,2; 82,3 e 78,29) ° C para 1-propanol, 2-propanol e etanol, respectivamente. Os autores afirmam que para os álcoois investigados, a diferença nos pontos de ebulição é determinada principalmente pela força de van der Waals e ligações de hidrogênio. Moléculas com maior quantidade dessas interações mencionadas anteriormente possuem maiores pontos de ebulição. Quanto aos isômeros, a ramificação existente no meio da cadeia alquílica do 2-propanol resulta em um impedimento estérico, resultando em redução das interações intramoleculares. Dessa forma, o ponto de ebulição do 1-propanol é muito maior que o do 2-propanol. Esse critério também é utilizado por Khayati e Gholitabar (2016) para explicar o comportamento desses álcoois hidrofílicos em sistemas formados por 1-propanol/2-propanol + sais de cloreto (KCl/NaCl/CaCl₂) e por Lo et al. (2018) ao estudarem sistemas formados etanol/1-propanol/2-propanol + Na₃C₆H₅O₇/K₃C₆H₅O₇/Na₂SO₄ nos quais os álcoois apresentaram comportamento semelhante.

Alguns estudos mostram que o deslocamento da curva binodal de um SAB para o sentido de maior miscibilidade do álcool pode estar associado à polaridade do mesmo. Isto é, quanto maior a polaridade do álcool, menor será a região bifásica observada no diagrama de fases (ZAFARANI-MOATTAR et al., 2020; ZAFARANI-MOATTAR et al., 2019). A definição atualmente aceita de polaridade é que ela é a soma de todas as possíveis interações intermoleculares específicas e não específicas solvente-soluto, tais como eletrostática, dipolo-

dipolo, dipolo induzido – dipolo induzido, ligações de hidrogênio e interações doador-aceitador de par de elétrons, excluindo aquelas interações que levam a transformações químicas do soluto (RANI et al., 2011; REICHARDT e WELTON, 2010). Assim, quanto maior a polaridade do álcool, maior serão as interações realizadas com os íons salinos e com a água presente no meio, o que implica em maiores quantidades necessária desses componentes para que haja a formação de fases e resulta na redução da área bifásica.

2.4. Modelagem e teoria da formação dos SAB

Segundo Da Silva e Loh (2006), a separação das fases durante o processo de mistura de soluções aquosas é significativamente influenciado pelas interações intermoleculares entre os constituintes formadores do sistema e das contribuições entrópicas resultantes do processo de mistura, expressa em termos de energia livre de mistura ($\Delta_{mix}G$).

A força motriz para transferência de massa e quantificação dos componentes das fases de um sistema são as relações de equilíbrio. De modo geral, o equilíbrio de fases é representado pela contribuição da isofugacidade (RODRIGUES e GONÇALVES, 2016). Isto é, para um sistema de múltiplas fases em equilíbrio termodinâmico, as fugacidades de cada um dos componentes em cada uma das fases são iguais, como mostra a Eq. (3):

$$\hat{f}_i^\alpha = \hat{f}_i^\beta = \dots = \hat{f}_i^\pi \quad (3)$$

Em que: \hat{f}_i^α , \hat{f}_i^β e \hat{f}_i^π são as fugacidades do componente i nas fases α , β e π , respectivamente.

As fugacidades são geralmente representadas pelo coeficiente de fugacidade, quando há uma fase vapor envolvida, ou pelo coeficiente de atividade, quando há fase líquida envolvida (γ). No equilíbrio líquido-líquido, as fugacidades são representadas pelo coeficiente de atividade, através da Eq. (4).

$$x_i^\alpha \gamma_i^\alpha = x_i^\beta \gamma_i^\beta \quad (4)$$

Em que: x_i^α e x_i^β são as frações molares e 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 dimensiona o quanto uma solução se afasta do comportamento ideal. Esse parâmetro termodinâmico está associado aos possíveis arranjos moleculares de um ou mais componentes em solução e com a formação ou quebra de ligações intermoleculares no processo de mistura. Por isso, a determinação de seus valores é primordial

para a descrição termodinâmica do equilíbrio de fases (AGUIAR, 2009). Sendo assim, para uma análise termodinâmica correta do equilíbrio de fases, são necessárias expressões analíticas confiáveis para os coeficientes de fugacidade ou de atividade, que permitam uma descrição confiável da dependência de concentração, temperatura e pressão dessas propriedades para sistemas binários, ternários ou multicomponente (GMEHLING et al., 2015). As relações a seguir correlacionam o coeficiente de atividade com a energia livre de Gibbs molar de excesso (G^E) (SMITH et al., 2007).

$$RT \ln \gamma_i = \left(\frac{\partial G^E}{\partial n_i} \right)_{T,P,n_{j \neq i}} \quad (5)$$

$$\ln \gamma_i = \frac{G^E}{RT} \quad (6)$$

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

Várias propriedades de mistura podem ser determinadas por meio do uso de relações termodinâmicas com base no conhecimento do comportamento da energia livre de Gibbs molar de excesso (G^E), ou seja, o comportamento do equilíbrio de fases de um sistema pode ser determinado medindo um número relativamente pequeno de dados de equilíbrio. Isso é possível considerando as relações de energia de Gibbs com outras propriedades termodinâmicas como propriedades parciais molares, coeficientes de atividade e outras propriedades de excesso (DANIELSKI e STRAGEVITCH, 2019).

Na literatura são encontrados diversos modelos matemáticos propostos para correlacionar dados de equilíbrio de fase e determinar coeficientes de atividade (DANIELSKI e STRAGEVITCH, 2019). Esses modelos podem ser classificados, de acordo com o referencial termodinâmico teórico, em semi-empíricos, como por exemplo, o modelo de Margules, Redlich-Kister e van Laar; os modelos teóricos baseados no conceito de composição local, como o modelo de Wilson, NRTL e UNIQUAC e os modelos de contribuição de grupos, destacando-se os modelos UNIFAC E ASOG (GEBREYOHANNES et al., 2014).

Os modelos teóricos que se baseiam no conceito de composição local estudam o comportamento molecular de soluções líquidas. Esse conceito pressupõe que a composição local seja diferente da composição global da solução devido às forças de interação intermolecular (GMEHLING et al., 2015). Isto é, no interior destas soluções as diferenças no tamanho molecular e das forças intermoleculares dos componentes são supostamente

resultantes das orientações moleculares de curto alcance e não aleatórias das composições locais e não da composição global de mistura (SMITH et al., 2007). O primeiro modelo para o comportamento de soluções foi proposto por G. M. Wilson (1964), conhecido como equação de Wilson. Esta equação foi a base para outros modelos como a equação NRTL (Non-Random-Two-Liquid) de Renon e Prausnitz (RENON E PRAUSNITZ, 1968) e a equação de Abrams e Prausnitz (1975), UNIQUAC (UNIversal QUAsi-Chemical), da qual se originou posteriormente o modelo UNIFAC, que determina os coeficientes de atividade a partir da contribuição de grupos que compõem as moléculas do sistema (FREDENSLUND et al., 1975).

Os modelos de contribuição de grupos também são conhecidos como métodos aditivos e assumem que as moléculas são divididas em grupos que podem ser átomos individuais ou conjunto de átomos. A contribuição de cada grupo é representada por parâmetros de interação binária e o somatório das contribuições de vários pares de grupos representa a interação entre um par de moléculas (KHALIFA e LUE, 2017; GANI, 2019). Perumalsamy e Murugesan (2009) consideram este método como o mais efetivo na determinação empírica dos coeficientes de atividade dos componentes. Entretanto, sua eficiência depende da quantidade de interações existentes entre os fragmentos das moléculas. A suposição fundamental admitida pelo método de contribuição de grupos é que o logaritmo do coeficiente de atividade possui uma parte combinatorial e outra residual. A primeira diz respeito à contribuição entrópica, isto é, aos diferentes tamanhos e formas que as moléculas podem assumir. O segundo termo está relacionado com a energia associada às interações no meio, representando a contribuição entálpica (FREDENSLUND et al., 1977; PERUMALSAMY e MURUGESAN, 2009; ROBLES et al., 2016).

A determinação experimental de dados de equilíbrio e dos parâmetros termodinâmicos requerem tempo e investimentos financeiros. Estes fatores têm incentivado cada vez mais os pesquisadores a desenvolverem modelos e abordagens teóricas para estimá-los de maneira rápida e eficiente. Dessa forma, a utilização de modelagens termodinâmicas como mecanismo de aprimorar o conhecimento a respeito do equilíbrio de fases em SAB tem crescido progressivamente. A tabela a seguir apresenta alguns estudos nos quais modelos termodinâmicos foram utilizados para correlacionar e/ou prever dados de equilíbrio líquido-líquido de SAB.

Tabela 1. Estudos de modelagem termodinâmica e simulação aplicados a dados de equilíbrio de sistemas aquosos bifásicos.

SAB	Modelo termodinâmico	Desvios globais médio (δx) entre as composições experimentais e estimadas das linhas de amarração	Referência
PEG 6000 + citrato de sódio + H ₂ O nas temperaturas (298,15, 308,15 e 318,15) K.	UNIQUAC com e sem a adição do termo de Debye-Hückel.	Modelo UNIQUAC sem o termo de Debye-Hückel: $\delta x = 6\%$; Modelo UNIQUAC com adição do termo de Debye-Hückel: $\delta x = 2\%$.	Zafarani -Moattar et al. (2004).
PEG (2000 e 6000 g·mol ⁻¹) + citrato de sódio + água em diferentes temperaturas (298,15; 308,15 e 318,15) K.	Modelos ASOG e UNIFAC.	$\delta x_{\text{Modelo ASOG}} > \delta x_{\text{Modelo UNIFAC}}$	Perumalsamy e Murugesan (2009).
PEG 1500, sais de sulfato ((NH ₄) ₂ SO ₄ , ZnSO ₄ ou K ₂ HPO ₄) e água em diferentes temperaturas (283,15; 298,15 e 313,15) K.	Modelos UNIFAC E NRTL.	Modelo NRTL: $\delta x = 1,21\%$; Modelo UNIFAC: $\delta x = 0,99\%$.	Lemos et al. (2011).
2-propanol + sais de sulfato (Na ₂ SO ₄ ou MgSO ₄) + água em diferentes temperaturas (293,15-323,15) K	Modelo UNIFAC.	$\delta x = 0,68\%$.	Pimentel et al. (2017).

PEG 1500, sulfato de sódio e água em diferentes temperaturas (293.15, 303.15 e 313.15) K.	Modelo UNIFAC.	$\delta x = 1,71\%$	Barreto et al. (2019).
PEG 8000 + sais de sulfato (Na_2SO_4 , MgSO_4 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) + água nas temperaturas (298,15; 308,15 e 318,15) K e pH 2,0.	Modelo UNIFAC	$\delta x = 3,90\%$	Sampaio et al. (2019)
PEG (4000 ou 6000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) + sal (Li_2SO_4 , NH_4SO_4 ou Na_2SO_4) + água a 298,15 K e pH 6,5.	Modelo UNIFAC	$\delta x = 0,25\%$	Santos et al. (2020).

Como visto, a utilização de modelo termodinâmicos para predição de dados de equilíbrio de sistemas aquosos bifásicos se constitui uma boa ferramenta de otimização dessa técnica em processos de recuperação de compostos, uma vez que a ocorrência de baixos desvios entre composições de equilíbrio experimentais e estimadas possibilita a utilização dos mesmos para predição de novos dados sem que haja a necessidade de determinação experimental. Segundo alguns autores, uma das melhores abordagem é o modelo UNIFAC, constituindo-se uma ferramenta promissora o projeto, otimização e operação de processos (LETYANINA et al., 2016; SANTIAGO et al., 2010).

2.5. Método UNIFAC (UNIQuac Functional-group activity Coefficient)

O modelo UNIFAC (Functional-group activity coefficient), proposto por Fredenslund, Jones e Prausnitz (1975), foi desenvolvido inicialmente com o intuito de solucionar problemas relacionados à necessidade de predição de dados de equilíbrio vapor-líquido (EVL) (DANIELSKI e STRAGEVITCH, 2019). Entretanto devido à sua flexibilidade e confiabilidade, o modelo foi estendido, sendo aplicável para predizer tanto de dados de equilíbrio de fases quanto de propriedades termoquímicas dos mais variados sistemas (LETYANINA et al., 2016). Por esta razão, o modelo UNIFAC é um dos mais utilizados dentre os métodos de contribuição de grupos em SAB (BARRETO et al., 2019; NASCIMENTO et al., 2018; NASCIMENTO et al., 2018a; PIMENTEL et al., 2017).

A proposta do modelo UNIFAC (Functional-group activity coefficient) é combinar o conceito de solução de grupos para a parte residual (γ_i^R) com o modelo UNIQUAC (Universal Quasi-Chemical) para a parte combinatória (γ_i^C), como mostra a Eq. (7).

$$\ln\gamma_i = \ln\gamma_i^C + \ln\gamma_i^R \quad (7)$$

Em que: γ_i^C e γ_i^R são a parte combinatorial e residual do coeficiente de atividade do componente i , respectivamente.

A parte combinatorial ($\ln\gamma_n^C$) do modelo leva em consideração a contribuição da entropia configuracional, isto é, a influência do tamanho e da forma das moléculas em soluções não ideais. Cada grupo funcional é caracterizado por dois parâmetros de estrutura: um em relação ao volume de van der Waals (r_i) e outro com a área superficial de van der Waals (q_i). A Eq. (8) demonstra como termo combinatorial do modelo UNIFAC é calculado:

$$\ln \gamma_n^C = \frac{G_C^E}{RT} = \ln \frac{\varphi_i}{X_i} + \frac{z}{2} q_i \ln \frac{\theta_i}{\varphi_i} + l_i - \frac{\varphi_i}{X_i} \sum_j X_j l_j \quad (8)$$

Em que:

$$\varphi_i = \frac{r_i X_i}{\sum_j r_j X_j} \quad (9)$$

$$\theta_i = \frac{q_i X_i}{\sum_j q_j X_j} \quad (10)$$

$$l_i = \frac{z}{2} (r_i - q_i) - r_i + 1 \quad (11)$$

Em que: z é o número de coordenação, geralmente adotado igual a 10; φ_i é a fração de volume da molécula i ; θ_i é a fração de superfície da molécula i .

Os parâmetros r_i e q_i são calculados como a soma dos parâmetros de área e volume dos grupos:

$$r_i = \sum_k V_k^{(i)} R_k \quad (12)$$

$$q_i = \sum_k V_k^{(i)} Q_k \quad (13)$$

Que, por sua vez, são calculados a partir da área superficial e volume dos grupos de van der Waals, dados por Bondi (1968):

$$R_k = \frac{V_{wk}}{15.17} \quad (14)$$

$$Q_k = \frac{A_{wk}}{2.5 \times 10^9} \quad (15)$$

Onde: V_{wk} é o volume de van der Waals do grupo k na molécula i ; A_{wk} é a área superficial de van der Waals do grupo k na molécula i . Os fatores de normalização 15.17 e 2.5×10^9 foram determinados por Abrams e Prausnitz (1975), correspondendo ao volume e à área superficial externa de uma unidade CH_2 em polietileno.

A parte residual leva em consideração a soma das contribuições individuais de cada grupo do soluto presentes na solução menos a soma das contribuições individuais dos mesmos grupos no componente puro (FREDENSLUND et al., 1975), como pode ser observada na Eq.

(16). Este termo constitui a chamada “solução por grupo”, no qual as contribuições individuais de cada grupo são funções da concentração e da temperatura (WILSON e DEAL, 1962). O termo residual quantifica as interações intermoleculares dos grupos dos componentes, refere-se à contribuição entálpica.

$$\ln \gamma_i^R = \frac{G_R^E}{RT} = \sum_k v_k^{(i)} (\ln \Gamma_k - \ln \Gamma_k^{(i)}) \quad (16)$$

Em que Γ_k é o coeficiente de atividade da parte residual do grupo k na solução; $\Gamma_k^{(i)}$ é o coeficiente de atividade residual do grupo k numa solução referência contendo unicamente moléculas do tipo i e $k = 1, 2, \dots, n$, sendo n o número de diferentes grupos na mistura.

Os coeficientes de atividade residuais, Γ_k , são dados pela Eq. (17):

$$\ln \Gamma_k = Q_k \left[1 - \ln \left(\sum_m \theta_m \Psi_{mk} \right) - \sum_m \frac{\theta_m \Psi_{km}}{\sum_n \theta_n \Psi_{nm}} \right] \quad (17)$$

Em que θ_m é a fração de área do grupo m , que pode ser calculada pela Eq. (18).

$$\theta_m = \frac{Q_m X_m}{\sum_n Q_n X_n} \quad (18)$$

X_m é a fração molar do grupo m na mistura, conforme mostra a Eq. (19).

$$X_m = \frac{\sum_i^M V_m^{(i)} X_i}{\sum_i^M \sum_j^N V_j^{(i)} X_i} \quad (19)$$

Os termos do tipo Ψ_{mk} , que aparecem na Eq. (19) são os parâmetros de interação energética entre os grupos i e j , dados pela Eq. (20).

$$\Psi_{mn} = \exp \left[-\frac{u_{ij} - u_{ji}}{T} \right] = \exp \left(-\frac{a_{ij}}{T} \right) \quad (20)$$

Os parâmetros energéticos de interação entre os grupos i e j é representado por u_{ij} e o seu valor corresponde ao somatório de todos os grupos presentes na mistura. Os parâmetros de interação de grupo a_{ij} podem ser avaliados a partir dos dados experimentais de equilíbrio de fase.

Apesar da imensa aplicação, o modelo UNIFAC possui algumas limitações como incapacidade de distinguir alguns tipos de isômeros, negligenciamento dos efeitos de

proximidade molecular, dentre outros (DANIELSKI e STRAGEVITCH, 2019). Em vista das limitações, algumas modificações no modelo UNIFAC original foram sugeridas ao longo dos anos. As modificações realizadas acrescentam algum termo à equação de forma a levar em consideração alguns efeitos ignorados ou mal estimados, como por exemplo interações eletrostáticas. Kikic et al. (1991) sugeriram a adição de um termo referente as interações de longo alcance (forças colombianas) no coeficiente de atividade representada pela teoria de Debye-Huckel. Nessa abordagem o sal é considerado como um grupo de cátion e ânion.

Sendo assim, o coeficiente de atividade (γ_n) pode ser calculado pela seguinte equação:

$$\ln\gamma_n = \ln\gamma_n^{D-H} + \ln\gamma_n^C + \ln\gamma_n^R \quad (21)$$

Em que: $\ln\gamma_n^{D-H}$ é o termo de Debye-Huckel, $\ln\gamma_n^C$ é a contribuição combinatorial do modelo UNIFAC e $\ln\gamma_n^R$ a contribuição residual do modelo UNIFAC.

O termo de Debye-Huckel $\ln\gamma_n^{D-H}$ é calculado a partir da Eq. (22) como descrito por Macêdo et al. (1990).

$$\ln\gamma_n^{D-H} = \frac{G_{D-H}^E}{RT} = \frac{2AM_n d_s}{b^3 d_n} \left[1 + b\sqrt{I} - \frac{1}{1 + b\sqrt{I}} - 2\ln(1 + b\sqrt{I}) \right] \quad (22)$$

Em que M_n é a massa molar do solvente n, I é o comprimento iônico, d_n é a densidade do solvente n, enquanto a densidade da mistura do solvente d_s é calculada pela Eq. (23):

$$d_s = \frac{M_s}{\sum_n x'_n M_n / d_n} \quad (23)$$

Em que x'_n é a fração molar do solvente n livre do sal e $M_s - \sum_n x'_n M_n$ é a massa molar da mistura líquida.

Os parâmetros A e b são dados pelas Eqs. (24) e (25) (KIKIC et al., 1991).

$$A = 1.327757 \cdot 10^5 d_s^{1/2} / (\epsilon T)^{3/2} \quad (24)$$

$$b = 6.359696 d_s^{1/2} / (\epsilon T)^{1/2} \quad (25)$$

Em que: d_s é a densidade da água, ϵ é a constante dielétrica do solvente na mistura e T é a temperatura.

Mesmo diante de uma vasta gama de trabalhos abordando a obtenção de dados experimentais de equilíbrio líquido-líquido e as variáveis que afetam o comportamento dos diagramas de fases, a continuidade de estudos voltados para a modelagem termodinâmica dos SAB é relevante uma vez que ainda não são encontrados na literatura estudos que abordem uma

avaliação mais detalhada a respeito de como as energias de interação existentes entre os grupos pertencentes às moléculas que constituem o sistema interferem no processo de partição dos componentes entre as fases do sistema. Para além disso, o conhecimento das energias envolvidas no processo pode potencializar a utilização adequada desses sistemas nos processos de obtenção de biomoléculas.

2.6. Lipase

As lipases (triacilglicerol acilhidrolases E.C.3.1.1.3) são enzimas hidrolíticas que podem apresentar duas funções principais a depender do meio no qual se encontram. Em meio aquosos, atuam na quebra das ligações ésteres presentes nas moléculas e consequente liberação de ácidos graxos e glicerol. Enquanto em meio orgânico, catalisam reações de esterificação e transesterificação (GHOSH et al., 1996; SAIFUDDIN E RAZIAH, 2008; GULDHE et al., 2015; PASCOAL et al., 2018).

De uma maneira geral, essas enzimas apresentam peso molecular variando de 20 a 75 kDa e estabilidade em uma ampla faixa de pH (4,0 – 9,0) e temperatura (25 - 70°C), sendo que, em sua maioria, apresentam atividade ótima entre valores de pH 6,0 – 8,0 e termoestabilidade entre 30 °C e 40 °C. Entretanto, essas características podem variar consideravelmente em função de sua origem bem como das condições de obtenção (SINGH E MUKHOPADHYAY, 2011; PASCOAL et al., 2018).

As principais fontes de obtenção de lipases são as bactérias (45%), fungos (21%), animais (18%), plantas (11%) e algas (3%) (PATIL et al., 2011). As lipases microbianas se destacam entre as demais por apresentar características que despertam grande interesse para aplicação industrial, como elevada atividade em condições amenas de temperatura, pH, força iônica, dentre outras, estabilidade em solventes orgânicos, alta especificidade de substrato e regio- e enantioselectividade e por isso são mais utilizadas comercialmente (HASAN et al., 2006; SINGH E MUKHOPADHYAY, 2011). As lipases de origem vegetal não são comumente exploradas comercialmente devido ao baixo rendimento e à complexidade dos processos envolvidos (PASCOAL et al., 2018).

As enzimas lipolíticas constituem um grupo com importante papel biotecnológico devido às suas inúmeras aplicações em diversos setores industriais tais como têxtil, químico, farmacêutico e alimentício (GULDHE et al., 2015; KUMAR et al., 2016).

2.7. Aplicação das lipases na indústria de alimentos

A literatura reporta diversos estudos voltados para aplicação de lipases em diversos processos na indústria de alimentos. Em laticínios, são utilizadas no processamento de queijos tanto para intensificar sabor e aroma, a partir da modificação de lipídeos, quanto para acelerar processos de maturação, potencializando as reações de lipólise com consequente acúmulo de ácidos graxos livre reduzindo período de maturação (ZHANG et al., 2012). Além de atuarem na hidrólise da gordura do leite e na obtenção de ingredientes alternativos para produção de manteiga, a adição desses hidrolisados fornece aos alimentos uma variedade de características sensoriais (VIRTO et al., 2003; PASCOAL e al., 2018).

Na indústria de panificação, as lipases atuam no aprimoramento das características do glúten, como o aumento da elasticidade e fortalecimento da massa, melhoram o volume específico e maciez do miolo e retardam o envelhecimento dos pães (GOESAERT et al., 2005; GANDRA et al., 2008). A hidrólise realizada por lipases pode ser aplicada também para a obtenção de monoacilgliceróis, que são usados como agentes emulsificantes (FREIRE e CASTILHO, 2008).

Na indústria de óleos e gorduras, as lipases são utilizadas para concentrar ácidos graxos poliinsaturados de lipídios de origem animal e vegetal. Os concentrados obtidos são utilizados no processamento de alimentos com o intuito de aprimorar suas propriedades físico-químicas, tecnológicas e nutricionais (CARVALHO et al., 2003). Na indústria farmacêutica, os monos e diacilglicerídeos obtidos a partir da hidrólise desses compostos poliinsaturados são usados para produzir uma variedade de medicamentos. Na maioria desses processos, são utilizadas lipases de origem microbiana devido, em particular, à enantioseletividade exibida pela maioria dessas enzimas lipolíticas (PASCOAL et al., 2018).

Na literatura diversos trabalhos mostram a aplicação de lipases com características halotolerantes e de resistência a solventes orgânicos que permitem a produção de ésteres de açúcar comestíveis e ésteres de aroma (DIAS et al., 2018; LISBOA et al., 2018; NADY et al., 2019). Os inúmeros papéis desempenhados pelas lipases nos diversos setores industriais fortalecem a necessidade de pesquisas voltadas para o desenvolvimento e otimização de técnicas de extração e purificação de enzimas que permitam a sua utilização de maneira eficaz e econômica.

2.8. Purificação de lipases em sistema aquoso bifásico

A literatura aponta inúmeros trabalhos voltados à aplicação de sistemas aquosos bifásicos como técnica de extração/purificação de lipases. A tabela seguinte reporta alguns

estudos que avaliaram variáveis que influenciam no processo de partição (massa molar do polímero, tipo de sal, concentração dos componentes, temperatura, pH, dentre outras), apresentando também as condições nas quais foram obtidos os melhores resultados para os parâmetros considerados importantes para avaliar a eficiência do processo.

Tabela 2. Partição de lipases em sistemas aquosos bifásicos.

LIPASE	SAB	Resultados	REFERÊNCIA
Lipase pancreática de porco (LPP)	PEG (1000, 1500 e 4000 g·mol ⁻¹) + fosfato de potássio dibásico + água à 4°C e pH 7,0.	PEG 1500 + fosfato de potássio (17/13 [%m/m], respectivamente); K _e = 12,7; E = 94,70% e FP = 4,0.	Zhou et al. (2013)
Lipase obtida por <i>Rhizopus microsporus</i>	PEG (600, 1000, 2000, 4000, 6000 e 8000 g·mol ⁻¹) + diferentes sais (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ , MgSO ₄ , Na ₂ HPO ₄ e (NH ₄) ₂ SO ₄) + água.	PEG 2000 + (NH ₄) ₂ SO ₄ (20/12% [%m/m], respectivamente) com adição de 5% Na ₂ CO ₃ , em pH 8,0; K _p = 0,47 e K _e = 11,65; FP = 19,8.	Anvari (2015)
Lipase produzida por levedura psicrotrófica <i>Leucosporidium scottii</i> L117	PEG (1500, 4000 e 8000 g·mol ⁻¹) + fosfato de sódio + água à 25 °C e pH 7,0; PEG (1500, 4000 e 8000 g·mol ⁻¹) + ácido poliacrílico + água à 25 °C; Triton X-114 + Tampão McIlvaine + água nas temperaturas de 25 °C e 28°C.	Triton X-114 + Tampão McIlvaine (10,38% m/m de surfactante) a 25 °C e pH 5,1; K _e = 7,76 e	Duarte et al. (2015)
Lipase alcalina extracelular obtida por <i>Penicillium candidum</i> PCA 1/TT031	PEG (1000-10.000) + tampão fosfato de potássio (KH ₂ PO ₄ /	PEG 3000 + tampão fosfato + NaCl (9,2/13,8/3,3 [%m/m],	Alhelli et al. (2016)

	K ₂ HPO ₄) + água em pH 7,0, com e sem adição de NaCl.	respectivamente); K _e = 4,0; FP = 33,9 e R = 84,0%.	
Lipase obtida por <i>Enterococcus faecium</i> MTCC5695	PEG 6000 + diferentes sais (Na ₂ SO ₄ , (NH ₄) ₂ SO ₄ , K ₂ HPO ₄ , Na ₂ HPO ₄ e MgSO ₄) + água; PEG (1000, 4000, 6000 e 8000 g·mol ⁻¹) + Na ₂ HPO ₄ + água.	PEG 8000 + Na ₂ HPO ₄ (2,11/1,98 [% m/m] (pH 9,0); CLA= 41,24%; Razão de volume = 0,25; K _e < 1,0; R = 94,20% e FP=4,12.	Ramakrishnan et al. (2016)
Lipase extracelular proveniente da levedura <i>Yarrowia lipolytica</i> IMUFRJ 50682.	PEG 1500 + fosfato de potássio em diferentes valores de pH (6,0-8,0) e temperatura (4 e 25) °C.	PEG 1500 + fosfato de potássio a 4 °C e pH 6,0; FP = 40; K _p >1,0 e K _e < 1,0; S = 500;	Carvalho et al. (2017)
Lipase obtida por fermentação em estado sólido (FES) por <i>Rhizopus arrhizus</i>	PEG 4000 + tartarato de sódio e potássio + água a 25 °C.	PEG 4000 (30% m/m) + KNaC ₄ H ₄ O ₆ (21% m/m); K _p = 4,60 e K _e = 77,75; S= 6,34 e FP = 6,10;	Dobreva et al. (2019)

Parâmetros de partição: coeficiente de partição de proteína (K_p), coeficiente de partição de atividade enzimática (K_e), eficiência de extração (E), fator de purificação (FP), recuperação teórica (R) e seletividade (S).

Os trabalhos supracitados reportam a utilização de SAB em etapas de extração/purificação de lipase, porém a continuidade de estudos relacionados às forças motrizes que governam a distribuição da biomolécula nas fases irá aprimorar o entendimento sobre o processo de transferência. O estudo dos parâmetros termodinâmicos ($\Delta_{tr}G$, $\Delta_{tr}H$, $\Delta_{tr}S$) possibilita maior compreensão do processo de transferência da molécula de interesse entre as fases.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Estudo do equilíbrio de fases de sistemas aquosos formados por polietilenoglicol 4000 ou 6000 g·mol⁻¹ (PEG 4000 ou 6000) ou álcool (1-propanol ou 2-propanol) e sal fosfato de potássio e da aplicação destes sistemas na partição de lipase pancreática de porco.

3.2. Objetivos Específicos

- Obter curvas binodais de sistemas formados por polietilenoglicol 4000 ou 6000 g·mol⁻¹ (PEG 4000 ou 6000) ou álcool (1-propanol ou 2-propanol) e sal fosfato de potássio;
- Obter as linhas de amarração dos SAB PEG/sal e álcool/sal;
- Estimar parâmetros de interação entre os grupos de contribuição presentes nos SAB em estudo através do modelo UNIFAC;
- Determinar os parâmetros envolvidos na partição da lipase: coeficientes de partição de proteínas (K_p) e de atividade enzimática (K_p), índice de recuperação teórica (%Y), fator de purificação (FP) e seletividade (S).
- Determinar os parâmetros termodinâmicos da partição da lipase nos SAB.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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**, v. 21, p. 116-128, 1975.
- ALHELLI, A. M., MANAP, M. Y. A, MOHAMMED, A. S., MIRHOSSEINI, S, H., SHAD, E. S. Z., MOHAMMED, N., K., HUSSIN, A. S. M., Use of Response Surface Methodology for Partitioning, One-Step Purification of Alkaline Extracellular Lipase from *Penicillium candidum* (PCA 1/TT031), **Journal of Chromatography B**, v. 16, p. 31121-31127, 2016.
- ANVARI, M. Extraction of lipase from *Rhizopus microspores* fermentation culture by aqueous two-phase partitioning. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 29, p. 723-731, 2015.
- AGUIAR, R. S. D. S. **Modelagem termodinâmica de equilíbrio líquido-líquido em sistemas envolvendo líquidos iônicos com modelos de composição local/contribuição de grupo e estruturas moleculares determinadas via química quântica**. 2009. 189 p. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Faculdade de Engenharia Química, Campinas, SP.
- AKAMA, Y., TONG, A., ITO, M., TANKA, S., The study of the partitioning mechanism of methyl orange in an aqueous two-phase system, **Talanta**, v. 48, p. 1133-137, 1999.
- ALBERTSSON, P.A. Partition of cell and macromolecules. New York: John Wiley, 1986, 346p.
- ALBERTSSON, P.-Å. Partition of proteins in liquid polymer-polymer two-phase systems. **Nature**, v. 182(4637), p. 709, 1958.
- ASENJO, J. A.; ANDREWS, B. A. Aqueous two-phase systems for protein separation: A perspective. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 8826-8835, 2011.
- BARANI, A.; PIRDASHTI, M.; HEIDARI, Z.; DRAGOI, E.-N. Influence of the molecular weight of polymer, temperature and pH on phase diagrams of poly (ethylene glycol) + dipotassium tartrate aqueous two-phase systems. **Fluid Phase Equilibria**, v. 458, p. 1-9, 2018.
- BARBOSA, A. A.; BONOMO, R. C. F.; MARTINS, C. V.; FONTAN, R. C. I.; SOUZA JR, 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 and Engineering Data**, v. 61, p.3-11, 2016.

- BARRETO, C. L. R.; CASTRO, S. DE S.; SOUZA JR, E. C. S.; VELOSO, C. M.; VERÍSSIMO, L. A. A.; SAMPAIO, V. S.; GANDOLFI, O. R. R.; FONTAN, R. C. I.; NEVES, I. C. O.; BONOMO, R. C. F. Liquid-Liquid Equilibrium Data and Thermodynamic Modeling for Aqueous Two-Phase System Peg 1500 + Sodium Sulfate + Water at Different Temperatures. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 64 (2), p. 810–816, 2019.
- BATISTA, I. de C.; GANDOLFI, O. R. R.; Sampaio, V. S.; dos SANTOS, K. A.; FONTAN, R. C. I.; Veloso, C. M.; Bonomo, R. C. F. Thermodynamics for Curcumin (Curcuma Longa L.) Partitioning in the Alcohol–Salt Aqueous Two-Phase System. **Journal of Technology and Biotechnology**, v. 95 (3), p. 577–584, 2020.
- BLATKIEWICZ, M.; ANTECKA, A.; BORUTA, T.; GÓRAK, A.; LEDAKOWICZ, S. Partitioning of Laccases Derived from *Cerrena Uicolor* and *Pleurotus Sapidus* in Polyethylene Glycol – Phosphate Aqueous Two–Phase Systems. **Process Biochemistry**, v. 67, p. 165–174, 2018.
- BONDI, A. Physical Properties of Molecular Crystals, Liquids and Glasses. New York: Wiley, 1968.
- C. A. S. **Partição do glicomacropéptido usando sistemas aquosos bifásicos**. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa-MG, 57 p., 2007.
- CARVALHO, P.O.; CAMPOS, P.R.B.; NOFFS, M. D’A.; OLIVEIRA, J.G.; SHIMIZU, M.T.; SILVA, D.M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poli-insaturados. **Química Nova**, v. 26, n.1, p. 75-80, 2003.
- CARVALHO, T.; FINOTELLI, P. V.; BONOMO, R. C. F.; FRANCO, M.; AMARAL, P. F. F. Evaluating Aqueous Two-Phase Systems for *Yarrowia Lipolytica* Extracellular Lipase Purification. **Process Biochemistry**, v. 53, p. 259–266, 2017.
- DA SILVA, L. H. M.; LOH, W. Sistemas Aquosos Bifásicos: Fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. **Química Nova**, v. 29, p. 1345- 1351, 2006.
- DAI, C.; LIU, Y.; WANG, S.; DU, M.; PENG, D.; WANG, K.; YANG, Z.; ZHAO, M. Investigation on the Phase Behaviors of Aqueous Surfactant Two-Phase Systems in a Mixture of N-Dodecyl-N-Methylpiperidinium Bromide (C12MDB) and Sodium Dodecyl Sulfate (SDS). **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 468, p. 322–326, 2015.
- DANIELSKI, L.; STRAGETICH, L. Cap. 4: Classical Models Part 2: Activity Coefficient Models and Applications. **Thermodynamics of Phase Equilibria in Food Engineering**, p. 103-162, 2019.

DIAS, A. L. B.; DOS SANTOS, P.; MARTÍNEZ, J. Supercritical CO₂ Technology Applied to the Production of Flavor Ester Compounds through Lipase-Catalyzed Reaction: A Review. **Journal of CO₂ Utilization**, v. 23, p. 159–178, 2018.

DIMITRIJEVIĆ, A.; MILIĆEVIĆ, J.; JOCIĆ, A.; MARIĆ, S.; TRTIĆ-PETROVIĆ, T.; PAPOVIĆ, S.; TOT, A.; GADŽURIĆ, S.; VRANEŠ, M. Further Insight into the Influence of Functionalization and Positional Isomerism of Pyridinium Ionic Liquids on the Aqueous Two-Phase System Equilibria. **Fluid Phase Equilibria**, v. 512, 112520, 2020.

DOBREVA, V.; ZHEKOVA, B.; DOBREV, G. Use of Aqueous Two-Phase and Three-Phase Partitioning Systems for Purification of Lipase Obtained in Solid-State Fermentation by *Rhizopus Arrhizus*. **The Open Biotechnology Journal**, v. 13 (1), p. 27–36, 2019.

DUARTE, A. W. F., LOPES, A. M., MOLINO, J. V. D., PESSOA, A., SETTE, L. D. Liquid–liquid extraction of lipase produced by psychrotrophic yeast *Leucosporidium scottii* L117 using aqueous two-phase systems. **Separation and Purification Technology**, v. 156, p. 215-225, 2015.

ESCUDERO, N.; DEIVE, F. J.; SANROMÁN, M. Á.; ÁLVAREZ, M. S.; RODRÍGUEZ, A. Design of Eco-Friendly Aqueous Two-Phase Systems for the Efficient Extraction of Industrial Finishing Dyes. **Journal of Molecular Liquids**, v. 284, p. 625–632, 2019.

FREDENSLUND A, GMEHLING J, RASMUSSEN P. Vapor-liquid equilibrium using UNIFAC. Amsterdam: Elsevier; 1977.

FREDENSLUND, A.; JONES, R. L.; PRAUSNITZ, J. M. Group contribution estimation of activity coefficients in nonideal liquid mixtures. **AIChE Journal**, v. 21, p. 1086-99, 1975.

FREIRE, D.M.A.; CASTILHO, L.R. Lipases em biocatálise. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A., et al (Ed.). **Enzimas em biotecnologia – produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, p.506, 2008.

FU, C.; SONG, W.; YI, C.; XIE, S. Creating Efficient Novel Aqueous Two-Phase Systems: *Salting-out* Effect and High Solubility of Salt. **Fluid Phase Equilibria**, v. 490, p. 77–85, 2019.

GANDRA, K.M.; BIANCHI, M.D.; GODOY, V.P.; QUEIROZ, F.P.C.; STEEL, C.J. Application of lipase na monoglyceride in fiber enriched pan bread. **Food Science and Technology**. v.28, n.1, p.182-192, 2008.

GANI, R. Group contribution-based property estimation methods: advances and perspectives. **Current Opinion in Chemical Engineering**, v. 33, p. 184-196, 2019.

GARCIA-CANO, J.; GOMIS, A.; FONT, A.; GOMIS, V. Effect of Temperature on the Phase-Separation Ability of KCl in Aqueous Two-Phase Systems Composed of Propanols:

Determination of the Critical Temperature and Extension of the Results to Other Salts. *J. Chem. Thermodyn.*, 2019, 136, 88–99.

GEBREYOHANNES, S.; NEELY, B. J.; GASEM, K. A. M. One-parameter modified nonrandom two-liquid (NRTL) activity coefficient model. ***Fluid Phase Equilibria***, v. 379, p. 196-205, 2014.

GHOSH, R. **Principles of bioseparations engineering**. Singapore: World Scientific Publishing, 2006. 282p.

GMEHLING, J.; CONSTANTINESCU, D; SCHMID, B. Group Contribution Methods for Phase Equilibrium Calculations. ***Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering***, v. 6, p. 267-292, 2015.

GOESAERT, H.; BRIJS, K.; VERAVERBEKE, W.S.; COUTIN, C.M.; GEBRUERS, K; DELCOUR, J.A. Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality. ***Trends in Food Science and Technology***, v.16, n.1-3, p.12-30, 2005.

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***, v. 26, p. 3971-3979, 1993.

GULDHE, A.; SINGH, B.; MUTANDA, T.; PERMAUL, K.; BUX, F. Advances in Synthesis of Biodiesel via Enzyme Catalysis: Novel and Sustainable Approaches. ***Renewable and Sustainable Energy Reviews***, v. 41, p. 1447–1464, 2015.

GUO, W., MA, J., WANG, Y., HAN, J., LI, Y., SONG, S. Liquid-Liquid equilibrium of aqueous two-phase systems composed of hydrophilic alcohols (etanol/2-propanol/1-propanol) and $MgSO_4/ZnSO_4$ at (303.15K and 303.15) K and correlation, ***Thermochimica Acta***, v. 546, p. 8-15, 2012.

HAMTA, A.; DEHGHANI, M. R.; GHOLAMI, M. Novel Experimental Data on Aqueous Two-Phase System Containing PEG–6000 and Na_2CO_3 at $T = (293.15, 303.15 \text{ and } 313.15) \text{ K}$. *Journal of Molecular Liquids*, v. 241, p. 144–149, 2017.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. ***Enzyme and Microbial Technology***; v. 39, p. 235-251, 2006.

IQBAL, M.; TAO, Y.; XIE, S.; ZHU, Y.; CHEN, D.; WANG, X.; HUANG, L.; PENG, D.; SATTAR, A.; SHABBIR, M. A. B.; HUSSAIN, H. I.; AHMED, S.; YUAN, Z. Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications. ***Biological Procedures Online***, v. 18, p. 18, 2016.

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

KHALIFA, M.; LUE, L. A group contribution method for predicting the solubility of mercury. **Fluid Phase Equilibria**, v. 432, p. 76-84, 2017.

KHAYATI, G.; GHOLITABAR, A. Liquid–Liquid Equilibrium of Hydrophilic Alcohols with Three Different Salts of Chloride: Experiment and Correlation. **Journal of Chemical and Engineering Data**. v. 61, 1454-1461, 2016.

KIKIC, I.; FERMEGLIA, M.; RASMUSSEN, P. UNIFAC prediction of vapor-liquid equilibria in mixed solvent-salt systems. **Chemical Engineering Science**, v. 46, p. 2775-2780, 1991.

KUMAR, A.; DHAR, K.; KANWAR, S. S.; ARORA, P. K. Lipase Catalysis in Organic Solvents: Advantages and Applications. **Biological Procedures Online**, v. 18 (1), p. 1-11, 2016.

LEMOES, L. R. DE; PATRÍCIO, P. DA R.; RODRIGUES, G. D.; CARVALHO, R. M. M. DE; SILVA, M. C. H. DA; SILVA, L. H. M. DA. Liquid-Liquid Equilibrium of Aqueous Two-Phase Systems Composed of Poly(Ethylene Oxide) 1500 and Different Electrolytes ((NH₄)₂SO₄, ZnSO₄ and K₂HPO₄): Experimental and Correlation. **Fluid Phase Equilibria**, v. 305 (1), p. 19–24, 2011.

LETYANINA, I.; TSVETOV, N.; TOIKKA, A. Application of the UNIFAC Models for Prediction and Description of Excess Molar Enthalpies for Binary Mixtures of N-Propanol, Acetic Acid, n-Propyl Acetate, and Water. **Fluid Phase Equilibria**, v. 427, p. 202–208, 2016.

LISBOA, M. C.; RODRIGUES, C. A.; BARBOSA, A. S.; MATTEDI, S.; FREITAS, L. S.; MENDES, A. A.; DARIVA, C.; FRANCESCHI, E.; LIMA, Á. S.; SOARES, C. M. F. New Perspectives on the Modification of Silica Aerogel Particles with Ionic Liquid Used in Lipase Immobilization with Platform in Ethyl Esters Production. **Process Biochemistry**, v. 75, p. 157–165, 2018.

LIU, Y.; ZHANG, Y.; WU, X.; YAN, X. Effect of Excluded-Volume and Hydrophobic Interactions on the Partition of Proteins in Aqueous Micellar Two-Phase Systems Composed of Polymer and Nonionic Surfactant. **Fluid Phase Equilibria**, v. 429, p. 1–8, 2016.

LO, S. C.; RAMANAN, R. N.; TEY, B. T.; TAN, W. S.; SHOW, P. L.; LING, T. C.; OOI, C. W. Purification of the Recombinant Enhanced Green Fluorescent Protein from Escherichia Coli

Using Alcohol + Salt Aqueous Two-Phase Systems. **Separation and Purification Technology**, v. 192, p. 130–139, 2018.

MACÊDO, E. A.; SKOVBOG, P.; RASMUSSEN, P. Calculation of phase equilibria for solutions of strong electrolytes in solvent—water mixtures. **Chemical Engineering Science**, v. 45, p. 875-882, 1990.

MAGESTE, A. B.; LEMOS, L. R.; SILVA, M. C. H.; FERREIRA, G. M. D.; SILVA, L. H. M.; BONOMO, R. C. F.; MINIM, L. A. Aqueous two-phase systems: An efficient, environmentally safe and economically viable method for purification of natural dye carmine. **Journal Chromatography A**, v. 1216, p. 7623-7629, 2009.

MAGESTE, A. B.; SENRA, T. D. A.; DA SILVA, M. C. H.; BONOMO, R. C. F.; DA SILVA, L. H. M. Thermodynamics and optimization of norbixin transfer processes in aqueous biphasic systems formed by polymers and organic salts. **Separation and Purification Technology**, v. 98, p. 69-77, 2012.

NADAR, S. S.; PAWAR, R. G.; RATHOD, V. K. Recent Advances in Enzyme Extraction Strategies: A Comprehensive Review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 101, p. 931–957, 2017.

NADY, D.; ZAKI, A. H.; RASLAN, M.; HOZAYEN, W. Enhancement of Microbial Lipase Activity via Immobilization over Sodium Titanate Nanotubes for Fatty Acid Methyl Esters Production. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 146, p. 1169–1179, 2020.

NASCIMENTO, M. B.; CASTRO, S. S.; VELOSO, C. M.; FONTAN, R. C. I.; NASCIMENTO, D. J.; 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**, v. 463, p.69-79, 2018.

NASCIMENTO, R. G.; FONTAN, R. C. I.; BONOMO, R. C. F.; VELOSO, C. M.; CASTRO, S. 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 and Engineering Data**, v. 63, p. 1352-1362, 2018a.

NEMATIKANDE, E.; SHEKAARI, H.; JAFARI, S. A. Liquid-Liquid Equilibrium of 1-Propanol, 2-Propanol, 2-Methyl-2-Propanol or 2-Butanol + sodium Sulfite + water Aqueous Two-Phase Systems. **Fluid Phase Equilibria**, v. 329, p. 42–54, 2012.

PASCOAL, A.; ESTEVINHO, L. M.; MARTINS, I. M.; CHOUPINA, A. B. REVIEW: Novel Sources and Functions of Microbial Lipases and Their Role in the Infection Mechanisms. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 104, p. 119–126, 2018.

PATIL, K. J.; CHOPDA, M. Z.; MAHAJAN, R. T. Lipase biodiversity. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 4, n. 8, p. 971–982, 2011.

PENA-PEREIRA, F.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. Miniaturized Preconcentration Methods Based on Liquid-Liquid Extraction and Their Application in Inorganic Ultratrace Analysis and Speciation: A Review. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 64 (1), p. 1–15, 2009.

PENIDO, J. A.; MAGESTE, A. B.; MARTINS, P. L.; FERREIRA, G. M. D. Surfactant as Selective Modulator in the Partitioning of Dyes in Aqueous Two-Phase Systems: A Strategy for Separation. **Journal of Molecular Liquids**, v. 293, p. 1-8, 2019.

PERUMALSAMY, M.; MURUGESAN, T. Prediction of liquid–liquid equilibria for polyethylene glycol based aqueous two-phase system by ASOG and UNIFAC method. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 26, p. 171-180, 2009.

PIMENTEL, J. G.; BICALHO, S. F.; GANDOLFI, O. R. R.; VERRÍSIMO, L. A. A.; CASTRO, S. S.; SOUZA, E. A.; VELOSO, C. M.; FONTAN, R. C. I.; SAMPAIO, V. S.; BONOMO, R. C. F. Evaluation of *salting-out* effect in the liquid–liquid equilibrium of aqueous two-phase systems composed of 2-propanol and Na₂SO₄/MgSO₄ at different temperatures. **Fluid Phase Equilibria**, v. 450, 1p. 84-193, 2017.

RAMAKRISHNAN, V.; GOVEAS, L. C.; SURALIKERIMATH, N.; JAMPANI, C.; HALAMI, P. M.; NARAYAN, B. Extraction and Purification of Lipase from *Enterococcus Faecium* MTCC5695 by PEG/Phosphate Aqueous-Two Phase System (ATPS) and Its Biochemical Characterization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 6, p. 19–27, 2016.

REIS, I. A. O., SANTOS, S. B., PEREIRA, F. D. S., SOBRAL, C. R. S., FREIRE, M. G., FREITAS, L. S., SOARES, C. M. F., LIMA, A. S., Extraction and Recovery of Rutin from

Acerola Waste using Alcohol-Salt-Based Aqueous Two-Phase Systems, **Separation Science and Technology**, v. 49; p. 656–663; 2014.

REIS, I. A.O., SANTOS, S. B., SANTOS, L.A., OLIVEIRA, N., FREIRE, M.G., PEREIRA, J. F. B., VENTURA, S. P. M., COUTINHO, J. A. P., SOARES, C. M. F., LIMA, A. S., Increased significance of food wastes: Selective recovery of added-value compounds, **Food Chemistry**, v. 135, p. 2453-2461, 2012.

RENON, H.; J.M. PRAUSNITZ, "Local Compositions in Thermodynamic Excess Functions for Liquid Mixtures", **AIChE Journal**, v. 14 p. 135-144, 1968.

ROBLES, P. A.; MORALES, J. W.; CISTERNAS, L. A. Modeling of liquid - liquid equilibrium for binary and ternary systems containing ionic liquids with the hexafluorophosphate anion using the ASOG method. **Fluid Phase Equilibria**, v. 429, p. 119-126, 2016.

RODRIGUES, C. E. COSTA.; GONÇALVES, C. B. Extração líquido-líquido. In TADINI, C. C.; TELIS, V. R. N.; MEIRELLES, A. J. A.; PESSOA FILHO, P. A. **Operações unitárias na indústria de alimentos**. Editora LTC, 210-248, 2016.

SABO, S. DA S.; LOPES, A. M.; SANTOS-EBINUMA, V. DE C.; RANGEL-YAGUI, C. DE O.; OLIVEIRA, R. P. DE S. Bacteriocin Partitioning from a Clarified Fermentation Broth of *Lactobacillus Plantarum* ST16Pa in Aqueous Two-Phase Systems with Sodium Sulfate and Choline-Based Salts as Additives. **Process Biochemistry**, v. 66, p. 212–221, 2018.

SAIFUDDIN, N.; RAZIAH, A. Z. Enhancement of Lipase Enzyme Activity in Non-Aqueous Media through a Rapid Three Phase Partitioning and Microwave Irradiation. **E-Journal Chemistry**, v. 5 (4), p. 864–871, 2008.

SALABAT, A.; TIANI MOGHADAM, S.; RAHMATI FAR, M. Liquid-Liquid Equilibria of Aqueous Two-Phase Systems Composed of TritonX-100 and Sodium Citrate or Magnesium Sulfate Salts. **Calphad Computer Coupling of Phase Diagrams and Thermochemistry**, v. 34 (1), p. 81–83, 2010.

SANTIAGO, R. S.; SANTOS, G. R.; AZNAR, M.; Liquid–liquid equilibrium in ternary ionic liquid systems by UNIFAC: New volume, surface area and interaction parameters. Part I. **Fluid Phase Equilibria**, v. 295, p. 93-97, 2010.

SANTOS, K. A.; FONTAN, R. C. I.; SANTOS, L. S.; BATISTA, I. DE C.; GANDOLFI, O. R. R.; CASTRO, S. DE S.; SAMPAIO, V. S.; VELOSO, C. M.; BONOMO, R. C. F. Partitioning of Amylase Produced by *Aspergillus Niger* in Solid State Fermentation Using Aqueous Two-Phase Systems. **Process Biochemistry**, v. 94, p. 116–125, 2020.

SMITH, J. M.; VAN NESS, H. C.; ABBOTT, M. M. Introdução à Termodinâmica da Engenharia Química, 7ª Ed. Editora LTC, 2007.

SONIYA, M. E MUTHURAMAN G. Comparative study between liquid-liquid extraction and bulk liquid membrane for the removal and recovery of methylene blue from waste water. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 30, p. 266-273, 2015.

SOSA, F. H. B.; SAMPAIO, D. A.; 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 (2000, 4000, and 6000) and sulfate salts (manganese sulfate and copper sulfate) at different temperatures (298.15, 318.15, and 338.15 K). **Fluid Phase Equilibria**, v. 449, p. 68-75, 2017.

SOUSA, R. DE C. S.; PEREIRA, M. M.; FREIRE, M. G.; COUTINHO, J. A. P. Evaluation of the Effect of Ionic Liquids as Adjuvants in Polymer-Based Aqueous Biphasic Systems Using Biomolecules as Molecular Probes. **Separation and Purification Technology**, v. 196, p. 244–253, 2018.

TEIXEIRA-PINTO, R. G. R.; MOLINO, J. V. D.; SANTOS-EBINUMA, V. C.; PESSOA, A.; VALENTINI, S. R.; PEREIRA, J. F. B.; LOPES, A. M. Effect of Electrolytes as Adjuvants in GFP and LPS Partitioning on Aqueous Two-Phase Systems: 2. Nonionic Micellar Systems. **Separation and Purification Technology**, v. 210, p. 69–79, 2019.

VIRTO, M.; CHÁVARRI, F.; BUSTAMANTE, M. A.; BARRON, L. J. R.; ARAMBURU, M.; VICENTE, M. S.; PÉREZ-ELORTONDO, F. J.; ALBISU, M.; DE RENOBALLES, M. Lamb Rennet Paste in Ovine Cheese Manufacture. Lipolysis and Flavour. **International Dairy Journal**, v. 13 (5), p. 391–399, 2003.

WANG, Y.; MAO, Y.; HAN, J.; LIU, Y.; YAN, Y.; Liquid - Liquid equilibrium of potassium phosphate/potassium citrate/sodium citrate + ethanol aqueous two-phase systems at (298.15 and 313.15) K and correlation, **Journal of Chemical Engineering Data**, v. 55, p. 5621–5626, 2010a.

WANG, Y.; WANG, J.; HAN, J.; HU, S.; YAN, Y. Liquid-liquid equilibrium of novel aqueous two-phase systems and evaluation of *salting-out* abilities of salts, **Cent. Eur. J. Chem.** v. 8, p. 886–891, 2010.

WANG, Y.; YAN, Y.; HU, S.; HAN, J.; XU, X. Phase Diagrams of Ammonium Sulfate + Ethanol/1-Propanol/2-Propanol + Water Aqueous Two-Phase Systems at 298.15 K and Correlation. **Journal of Chemical Engineering Data**, v. 55 (2), p. 876–881, 2010b.

WILSON, G.; DEAL, C. Activity coefficients and molecular structure. Activity coefficients in changing environments-solutions of groups. **Industrial and Engineering Chemistry Fundamentals**, v. 1, p. 20-23, 1962.

ZAFARANI-MOATTAR, M. T.; SADEGHI, R.; HAMIDI, A. A. Liquid–liquid equilibria of an aqueous two-phase system containing polyethylene glycol and sodium citrate: experiment and correlation. **Fluid Phase Equilibria**, v. 219, p. 149-155, 2004.

ZHANG, C.; KIM, S. K. Application of Marine Microbial Enzymes in the Food and Pharmaceutical Industries, 1st ed.; **Elsevier Inc.**, 2012; Vol. 65.

ZHOU, Y. J.; HU, C. L.; WANG, N.; ZHANG, W. W.; YU, X. Q. Purification of Porcine Pancreatic Lipase by Aqueous Two-Phase Systems of Polyethylene Glycol and Potassium Phosphate. **Journal of chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 926, p. 77–82, 2013.

ZAFARANI-MOATTAR, M. T., SHEKAARI, H., JAFARI, P. Liquid-liquid equilibria of choline chloride + 1-propanol or 2-propanol + water ternary systems at different temperatures: Study of choline chloride ability for recovering of these alcohols from water mixtures, **Journal of Molecular Liquids**, v. 273, p. 463–475, 2019.

ZAFARANI-MOATTAR, M. T., SHEKAARI, H., POURBAGHERIAN, E., Study of the liquid-liquid equilibrium for aqueous ternary systems containing choline bitartrate and 1-propanol or 2-propanol at different temperatures and their performances in acetaminophen separation and alcohols recovery, **Fluid Phase Equilibria**, v. 514, p. 112536, 2020.

REICHARDT, C., WELTON, T., Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry, 4th ed. Wiley-VCH, Weinheim, 2010.

ARTIGO 1

Dados de equilíbrio de SAB formados por PEG (4000 ou 6000) ou álcool (1-propanol ou 2-propanol) + fosfato de potássio + água: dados experimentais, correlações e modelagem termodinâmica

RESUMO

Dados experimentais de equilíbrio líquido-líquido foram obtidos para sistemas aquosos bifásicos (SAB) formados por PEG (4000 ou 6000 g·mol⁻¹) / fosfato de potássio e álcool (1-propanol ou 2-propanol) / fosfato de potássio à 25°C e pH 7.0. Foram obtidas quatro curvas binodais e três linhas de amarração para cada curva. Os parâmetros volume efetivo de exclusão (EEV) e efeito *salting-out* do sal foram determinados para auxiliar no entendimento acerca do comportamento dos diagramas de equilíbrio. Os diagramas formados por PEG 6000/sal e 1-propanol/sal apresentaram maior região bifásica bem como valores de EEV e coeficiente *salting-out* mais altos quando comparados aos SAB PEG 4000 ou 2-propanol, respectivamente. Tais resultados são explicados pela maior hidrofobicidade apresentada pelo PEG 6000 e do álcool 1-propanol. As composições das fases foram estimadas por meio da regra da alavanca. O aumento da massa molar não influenciou no comportamento de *CLA* e *ILA*. Dentre os SAB formados por álcool, os compostos por 1-propanol apresentaram os maiores valores absolutos de *CLA* e *ILA*. As equações de Othmer e Tobias e Bancroft foram utilizadas com o intuito de se verificar a precisão dos dados obtidos por meio da regra da alavanca para composição das fases das linhas de amarração. Os elevados valores de R² (0,996 – 0,999) indicam a consistência termodinâmica dos dados das linhas de amarração e a confiabilidade da metodologia utilizada para obtê-los. Os parâmetros de interação foram obtidos utilizando o modelo Universal Functional Group Activity Coefficient (UNIFAC). A partir dos valores de energia de interação calculados por meio dos novos parâmetros de interação binária estimados na modelagem termodinâmica, foi possível reafirmar alguns resultados discutidos previamente. O modelo UNIFAC apresentou baixos desvios (1,141 – 3,493) entre as composições calculadas pelo modelo e estimadas pela regra da alavanca indicando que sua utilização é confiável para obter dados de equilíbrio para sistemas que contém os mesmos grupos de contribuição, podendo reduzir o número de experimentos a serem realizados.

Palavras-chave: Volume efetivo de exclusão; Coeficiente *salting-out*; grupos de contribuição; Coeficiente de atividade; parâmetros de interação;

1. INTRODUÇÃO

Sistemas aquosos bifásicos têm se mostrado um potencial método de purificação/extração de diferentes biomoléculas como proteínas (LIU et al, 2016; LO et al., 2018; WU et al., 2017), enzimas (NASCIMENTO et al., 2018; DOBREVA et al., 2019; SANTOS et al., 2020), corantes (BATISTA et al., 2020; PENIDO et al., 2019), dentre outras, devido suas características vantajosas de baixo custo, não-toxicidade, relativa biodegradabilidade e possibilidade de aplicação em larga escala. Além disso, esses sistemas possuem baixa tensão interfacial e constituem um ambiente ameno para materiais biológicos por apresentar fases constituídas majoritariamente por água influenciando positivamente na manutenção da estabilidade e atividade biológica da molécula-alvo (LEMOS et al., 2011; LO et al., 2015; PENIDO et al., 2019; SOUSA et al., 2017).

O equilíbrio líquido-líquido (LLE) de um SAB é representado por meio de diagramas de fases ou de equilíbrio. Esses diagramas são únicos e exclusivos para cada SAB em condições preestabelecidas de composição, pH e temperatura (CHAKRABORTY e SEN, 2016) e podem ser obtidos experimentalmente ou por meio de modelos, empíricos ou teóricos, os quais fornecem informações a respeito das composições de equilíbrio das fases e das interações entre os componentes formadores da mistura. A modelagem termodinâmica do equilíbrio líquido-líquido de SAB possibilita a redução do tempo investido na obtenção de dados experimentais bem como economia com custos operacionais.

Diversos modelos matemáticos propostos para correlacionar dados de equilíbrio de fase e determinar coeficientes de atividade são encontrados na literatura. Dentre eles, os modelos UNIQUAC e NRTL, que se baseiam no princípio de composição local, e UNIFAC e ASOG, que se baseiam no método de contribuição de grupos, são comumente utilizados para estudar o comportamento de sistemas bifásicos aquosos (HAMTA et al., 2017; PIMENTEL et al., 2017; PERUMALSAMY et al., 2009; NAZER et al., 2017; SANTOS et al., 2020). O modelo UNIFAC (Universal Functional Group Activity Coefficient) é um dos mais empregados para predição de SAB. A proposta deste modelo é calcular o coeficiente de atividade dos componentes presentes no sistema a partir da combinação de um termo residual, que quantifica a contribuição entálpica dos componentes do sistema, com um termo combinatorial, que leva em consideração a contribuição entrópica (Kikic et al., 1991; Magnussen et al., 1980).

SAB formados por álcool-sal ou polímero-sal são eficientes nos processos de recuperação de biomoléculas. Polietilenoglicóis (PEG) são comumente utilizados por serem facilmente encontrados a baixo custo, possuírem elevada capacidade de formação de fases com

outros polímeros neutros, bem como sais, principalmente devido aos grupos hidroxila terminais nas cadeias polimérica que são responsáveis por sua hidrofilicidade. Além disso, PEG de massa molar menores apresentam baixa viscosidade e tensão interfacial (BLATKIEWICZ et al., 2018; HAGHTALAB e MOKHTARANI, 2004; SÁNCHEZ-TRASVINÃ et al., 2017). Os álcoois hidrofílicos de cadeia curta apresentam vantagens semelhantes ao PEG como baixo custo e baixa viscosidade. Também apresentam alta biodegradabilidade. Além disso, sistemas formados por álcoois requerem pouco tempo para separação de fases e a molécula alvo pode ser facilmente recuperada da fase alcoólica, o que aumenta a viabilidade econômica do processo de purificação (AKAMA et al, 1999; REIS et al., 2014). De acordo com Blatkiewicz et al. (2018), soluções de sais de fosfato, a exemplo do fosfato de potássio, em valores de pH igual ou superior a 7,0 mantém a estabilidade de biomoléculas que apresentam maior atividade em meios alcalinos. Tais características explicam o motivo pelo qual a literatura reporta tantos estudos de dados de equilíbrio líquido-líquido de sistemas formados PEG/fosfato ou álcool/fosfato bem como a utilização desses sistemas em processos de partição de biomoléculas (BATISTA et al., 2020; BLATKIEWICZ et al., 2018; KHAYATI et al., 2015; KHAYATI e GHOLITABAR, 2016; REIS et al., 2014; WANG et al., 2010; YAN et al., 2018).

Embora se encontre na literatura inúmeros trabalhos voltados para aplicação de modelagens termodinâmicas e simulações computacionais de sistemas de extração líquido-líquido, estudos que buscam otimizar e compreender de uma maneira mais profunda e detalhada as interações intermoleculares responsáveis pelo processo de formação de fases desses sistemas por meio das energias de interação ainda são escassos. Diante do exposto, o presente trabalho apresenta dados de equilíbrio líquido-líquido para SAB formados por PEG (4000 ou 6000) ou álcool (1-propanol ou 2-propanol), sal (K_2HPO_4/H_3PO_4) e água determinados experimentalmente. Estudou-se a influência dos componentes formadores dos sistemas e dos parâmetros efeito *salting-out* e volume efetivo de exclusão nos diagramas de equilíbrio. Realizou-se a modelagem termodinâmica dos sistemas estudados. Os parâmetros de interação binária foram utilizados para predizer as composições das fases bem como para calcular as energias de interação existentes entre os pares de grupos de contribuição e assim, explicar o equilíbrio termodinâmico dos SAB estudados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

Polietilenoglicol 4000 (CAS No. 25322-68-3) e 6000 g mol^{-1} (CAS 25322-68-3) foram adquiridos da Sigma. 1-propanol (CAS No. 71-23-8), 2-propanol (CAS No. 67-63-0), fosfato de potássio bibásico (K_2HPO_4) (CAS No. 7558-79-4) e ácido fosfórico (H_3PO_4) (CAS No. 7664-38-2) foram adquiridos da Synth, Brazil. Todos os reagentes utilizados no presente trabalho foram de grau analítico e não foram submetidos a nenhum método de tratamento ou purificação prévio. Utilizou-se água destilada em todo o experimento.

2.2. Determinação das curvas binodais e linhas de amarração

Os diagramas de fases foram determinados através do método de titulação turbidimétrica proposto por Albertson (1986). Para o preparo dos sistemas foram utilizados álcool (1-propanol ou 2-propanol) ou soluções aquosas de polietilenoglicol (4000 ou 6000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ [50% m/m]) com solução salina de fosfato de potássio ($\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$) [22%]. Foram obtidas 4 curvas binodais à 25°C e pH 7,0.

O procedimento consistiu em pesar 1,00 g da solução estoque do polímero ou do sal em tubos de ensaio. O tubo contendo a solução de PEG ou sal foi colocado em um banho termostático (Tecnal, Te-184, Piracicaba, Brasil) com precisão $\pm 0,1$ K, onde foi incubado até atingir o equilíbrio térmico. Em seguida, foram adicionadas alíquotas da solução estoque do sal (20 μL) no tubo contendo polímero ou alíquotas da solução estoque do álcool (20 μL) para o tubo contendo sal, com uma pipeta automática, até que houvesse a turvação do sistema (solução bifásica). O sistema foi então titulado com água destilada até o desaparecimento da turvação. A quantidade de solução salina/álcool e de água necessária para turvação e desturvação dos sistemas foi registradas. Esse procedimento se repetiu continuamente até a obtenção dos pontos necessários para obtenção da curva. Os dados experimentais de cada curva binodal foram correlacionados pela equação empírica não-linear (Eq. (1)) sugerida por Mistry et al. (1996) utilizando o software SigmaPlot v.11.0.

$$[w_1] = \exp(a + b[w_2]^{0,5} + c[w_2] + d[w_2]^2) \quad (1)$$

Em que: w_1 e w_2 são as composições em fração mássica do PEG ou álcool e sal, respectivamente, e a , b , c e d são parâmetros de ajuste da equação obtidos pela análise de regressão dos dados experimentais.

As linhas de amarração foram obtidas utilizando o método gravimétrico proposto por Merchuk et al. (1998) (SAMPAIO et al., 2019; SANTOS et al., 2020; SOSA et al., 2017), que consiste em selecionar um ponto (ponto global) na região bifásica que dará origem a linha de amarração. Foram selecionados 3 pontos globais para cada sistema. As composições globais dos sistemas estudados estão expressas na Tabela 1.

Tabela 1. Composição global, expressas em fração mássica (m/m), dos sistemas formados por PEG (4000 ou 6000) ou álcool (1-propanol ou 2-propanol) + K_2HPO_4/H_3PO_4 + água.

Ponto Global	PEG	Álcool	sal
1	0,13	0,24	0,10
2	0,15	0,26	0,11
3	0,17	0,28	0,12

Foram pesadas em balança analítica (Bel Engineering, modelo M254A, Piracicaba, Brasil) quantidades apropriadas dos componentes até uma massa total de 40 g, em tubos graduados de fundo cônico de 50 mL. O sistema foi agitado em vórtice (Modelo AP-56, Phoenix, Brazil) e centrifugados a $2000 \times g$ durante 15 minutos (Modelo Sp-701, SPLABOR, Brasil) para acelerar a separação de fases. Os tubos foram mantidos em repouso por aproximadamente 24 h em estufa B.O.D (Longen Scientific, modelo LG340 FT220, Brasil) na temperatura desejada para assegurar que o equilíbrio das fases fosse atingido e que houvesse a formação de duas fases bem definidas. Após ter atingido o equilíbrio, as fases foram coletadas com seringas e pesadas. Todos os sistemas foram preparados em triplicata.

As concentrações de cada componente nas fases dos sistemas foram quantificadas pela regra da alavanca, que utiliza a relação entre a composição em massa da fase superior e a composição total do sistema por meio de um sistema de quatro equações (Eqs. (2)-(5)) e quatro incógnitas desconhecidas $[w_1]_t$, $[w_1]_b$, $[w_2]_t$, $[w_2]_b$ foi resolvido utilizando a ferramenta solver do Excel (MERCHUK et al., 1998):

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

$$[w_1]_b = \exp(a + b[w_2]_b^{0.5} + c[w_2]_b + d[w_2]_b^2) \quad (3)$$

$$\frac{[w_1]_t - [w_1]}{[w_1] - [w_1]_b} = \frac{m_b}{m_t} \quad (4)$$

$$\frac{[w_2] - [w_2]_t}{[w_2]_b - [w_2]} = \frac{m_b}{m_t} \quad (5)$$

Em que: w_1 e w_2 são as composições em fração mássica do PEG/álcool e sal nas fases, e os subscritos “t”, “b” e “m” representam as fases superior e inferior e a composição de mistura, respectivamente; m_t e m_b , as massas das fases superior e inferior, respectivamente.

O comprimento das linhas de amarração (*CLA*) foram determinados utilizando a Eq. (6):

$$CLA = [(w_1^t - w_1^b)^2 + (w_2^t - w_2^b)^2]^{0.5} \quad (6)$$

A inclinação das linhas de amarração (*ILA*) foram determinadas pela Eq. (7):

$$ILA = \frac{w_1^t - w_1^b}{w_2^t - w_2^b} \quad (7)$$

A confiabilidade dos dados das linhas de amarração foi verificada por meio das equações empíricas propostas por Othmer-Tobias (OTHMER e TOBIAS, 1942) (Eq. (8)) e Bancroft (Eq. (9)).

$$\left(\frac{1 - w_1^t}{w_1^t}\right) = k_1 \left(\frac{1 - w_2^b}{w_2^b}\right)^n \quad (8)$$

$$\left(\frac{w_3^b}{w_2^b}\right) = k_2 \left(\frac{w_3^t}{w_1^t}\right)^r \quad (9)$$

Em que: w_1 , w_2 e w_3 são as composições em fração mássica do PEG ou álcool, sal e água na fase superior “t” e inferior “b”, respectivamente. k_1 , n , k_2 , e r são parâmetros de ajuste.

As massas específicas das fases obtidas para cada linha de amarração foram determinadas usando um densímetro digital de bancada DMA 5000M (Anton Paar, Graz, Áustria) com precisão de $\pm 5 \times 10^{-6} \text{ g.cm}^{-3}$ e repetibilidade de $\pm 1 \times 10^{-6} \text{ g.cm}^{-3}$ na faixa de operação de 0 a 3 g.cm^{-3} . A faixa de temperature do equipamento é de 273,15 K a 363,15 K com precisão de $\pm 273,16 \text{ K}$ e repetibilidade de $\pm 273,151 \text{ K}$. As leituras foram realizadas em duplicata 25 °C.

2.3. Determinação do efeito *salting-out*

Para avaliar o efeito *salting-out*, utilizou-se a equação modificada de Setschenow (Eq. (10)) para correlacionar os dados das linhas de amarração dos sistemas em estudo.

$$\ln\left(\frac{w_1^t}{w_1^b}\right) = \beta + k(w_2^b - w_2^t) \quad (10)$$

Em que: w é a fração mássica para os componentes que formam as fases dos SAB “1” e “2” referem-se ao PEG/álcool e sal, respectivamente, “t” e “b” caracterizam as fases superior e inferior, respectivamente; k é o coeficiente *salting-out*; β é a constante relacionada ao coeficiente de atividade. Os parâmetros k e β serão calculados por análise de regressão da Eq. (10).

2.4. Determinação do volume efetivo de exclusão

O efeito do volume efetivo de exclusão (*EEV*) foi calculado utilizando as frações molares obtidas na determinação experimental das curvas binodais. O modelo foi ajustado aos dados experimentais no software Origin 6, utilizando o método numérico de Levenberg-Marquadt com as equações (Eqs. (11) e (12)) desenvolvidas por Guan et al., (1993) que se baseia na geometria estatística.

$$\ln\left(V_{213}^* \frac{w_2}{m_2} + f_{213}\right) + \left(V_{213}^* \frac{w_1}{m_1}\right) = 0 \quad (11)$$

Em que: o V_{213}^* e f_{213} indicam o volume de exclusão do sal e a fração volumétrica efetiva do sal na fase polimérica ou na cadeia hidrofílica do álcool, M e w representam a massa molar e a fração de massa, os índices “1” e “2” referem-se às quantidades de PEG ou álcool e sal respectivamente, nas fases. Os valores de *EEV* são calculados por análise de regressão das Eqs. (11) e (12).

Uma das considerações da Eq. 11 é que se o valor f_{213} for muito pequeno, ele pode ser ignorado (Eq. (12)).

$$\ln\left(V_{213}^* \frac{w_2}{m_2}\right) + \left(V_{213}^* \frac{w_1}{m_1}\right) = 0 \quad (12)$$

2.5. Determinação da Energia de Interação dos grupos dos sistemas

O modelo UNIFAC modificado por Kikic et al. (1991) foi utilizado para estimar novos parâmetros de interação binária entre os grupos de contribuição que compõem as moléculas da mistura e simular a formação do SAB a partir dos parâmetros obtidos. Inicialmente, realizou-se a divisão dos componentes que constituíam os sistemas em grupos de contribuição. Na Tabela 2 estão representados os parâmetros de volume (R_K) e área (Q_K) de cada grupo de contribuição.

Tabela 2. Parâmetros R_K e Q_K dos grupos de contribuição de cada componente e quantidade de repetições de cada grupo em uma mesma molécula.

Grupo k	R_K	Q_K	Referências
P1	3,250	3,128	Magnussen et al, (1981)
P2	3,2491	3,124	Magnussen et al, (1981)
CH ₂	0,674	0,540	Magnussen et al, (1981)
CH ₂ CH ₂ O	1,593	1,320	Ninni et al, (1999)
OH ⁻	1,000	1,200	Magnussen et al, (1981)
HPO ₄ ²⁻	1,329	1,210	Haghtalab and Mokhtarani (2004)
K ⁺	0,437	0,578	Haghtalab and Mokhtarani (2004)
H ₂ O	0,920	1,400	Magnussen et al, (1981)

No modelo utilizado, considera-se que o coeficiente de atividade do componente i na solução (γ_i) é resultado das somas das contribuições de um termo combinatorial (γ_i^C), que leva em consideração a entropia configuracional, e um termo residual (γ_i^R), resultado da entalpia associada às interações entre os grupos de contribuição presentes no sistema. Além disso, também é levado em consideração alguns efeitos não estimados no modelo UNIFAC original, como por exemplo interações eletrostáticas. Kikic et al. (1991) sugeriram a adição de um termo referente as interações de longo alcance (forças colombianas) no coeficiente de atividade representada pela teoria de Debey-Hückel (Eq. (13)). Nessa abordagem o sal é considerado como um grupo formado por cátion e ânion.

$$\ln\gamma_n = \ln\gamma_n^{D-H} + \ln\gamma_n^C + \ln\gamma_n^R \quad (13)$$

Sendo

$$\ln\gamma_i = \frac{G^E}{RT} \quad (14)$$

Em que: R é a constante dos gases ideais ($\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\text{K}^{-1}$); T é a temperatura (K); G^E é a energia livre de Gibbs de excesso; γ_i é o coeficiente de atividade do componente i , n_i é o número de moles do componente i , $\ln\gamma_n^{D-H}$ é o termo de Debey-Hückel, $\ln\gamma_n^C$ é a contribuição combinatorial do modelo UNIFAC e $\ln\gamma_n^R$ a contribuição residual do modelo UNIFAC.

O termo de Debye-Hückel ($\ln\gamma_n^{D-H}$) é calculado a partir da Eq. (15) como descrito por Macêdo et al. (1990).

$$\ln\gamma_n^{D-H} = \frac{G_{D-H}^E}{RT} = \frac{2AM_n d_s}{b^3 d_n} \left[1 + b\sqrt{I} - \frac{1}{1 + b\sqrt{I}} - 2\ln(1 + b\sqrt{I}) \right] \quad (15)$$

Em que M_n é a massa molar ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) do solvente n , I é o comprimento iônico, d_n é a densidade do solvente n , enquanto a densidade da mistura do solvente d_s é calculada pela Eq. (16):

$$d_s = \frac{M_s}{\sum_n x'_n M_n / d_n} \quad (16)$$

Em que x'_n é a fração molar do solvente n livre do sal e $M_s - \sum_n x'_n M_n$ é a massa molar da mistura líquida.

Os parâmetros A e b são dados pelas Eqs. (17) e (18) (KIKIC et al., 1991).

$$A = 1,327757 \times 10^5 d_s^{1/2} / (\epsilon T)^{3/2} \quad (17)$$

$$b = 6,359696 d_s^{1/2} / (\epsilon T)^{1/2} \quad (18)$$

A parte combinatorial do modelo UNIFAC é calculada por meio da Eq. (19):

$$\ln\gamma_n^C = \frac{G_C^E}{RT} = \ln \frac{\varphi_i}{X_i} + \frac{z}{2} q_i \ln \frac{\theta_i}{\varphi_i} + l_i - \frac{\varphi_i}{X_i} \sum_j X_j l_j \quad (19)$$

Em que:

$$\varphi_i = \frac{r_i X_i}{\sum_j r_j X_j} \quad (20)$$

$$\theta_i = \frac{q_i X_i}{\sum_j q_j X_j} \quad (21)$$

$$l_i = \frac{z}{2} (r_i - q_i) - r_i + 1 \quad (22)$$

Em que: z é o número de coordenação, geralmente adotado igual a 10; φ_i é a fração de volume da molécula i ; θ_i é a fração de superfície da molécula i .

Os parâmetros r_i e q_i são calculadas como a soma dos parâmetros de área e volume dos grupos:

$$r_i = \sum_k V_k^{(i)} R_k \quad (23)$$

$$q_i = \sum_k V_k^{(i)} Q_k \quad (24)$$

que, por sua vez, são calculados a partir da área superficial e volume dos grupos de van der Waals, dados por Bondi (1968):

$$R_k = \frac{V_{wk}}{15,17} \quad (25)$$

$$Q_k = \frac{A_{wk}}{2,5 \times 10^9} \quad (26)$$

Em que: V_{wk} é o volume de Van Der Waals do grupo k na molécula i ; A_{wk} é a área superficial de Van Der Waals do grupo k na molécula i . Os fatores de normalização 15.17 e 2.5×10^9 foram determinados por Abrams e Prausnitz (1975), correspondendo ao volume e à área superficial externa de uma unidade CH_2 em polietileno.

A contribuição da parte residual é calculada por meio da Eq. (27):

$$\ln \gamma_i^R = \frac{G_R^E}{RT} = \sum_k v_k^{(i)} (\ln \Gamma_k - \ln \Gamma_k^{(i)}) \quad (27)$$

Em que $v_k^{(i)}$ é o número de grupos k presente na espécie i ; Γ_k é o coeficiente de atividade da parte residual do grupo k na solução; $\Gamma_k^{(i)}$ é o coeficiente de atividade residual do grupo k numa solução referência contendo unicamente moléculas do tipo i e $k = (1, 2, \dots, n)$, onde n é o número de diferentes grupos na mistura.

Os coeficientes de atividade residuais, Γ_k , são dados pela Eq. (28):

$$\ln \Gamma_k = Q_k \left[1 - \ln \left(\sum_m \theta_m \Psi_{mk} \right) - \sum_m \frac{\theta_m \Psi_{km}}{\sum_n \theta_n \Psi_{nm}} \right] \quad (28)$$

Em que θ_m é a fração de área do grupo m , que pode ser calculada pela Eq. (29).

$$\theta_m = \frac{Q_m X_m}{\sum_n Q_n X_n} \quad (29)$$

X_m é a fração molar do grupo m na mistura, conforme mostra a Eq. (30).

$$X_m = \frac{\sum_i^M V_m^{(i)} X_i}{\sum_i^M \sum_i^N V_j^{(i)} X_i} \quad (30)$$

Os termos do tipo Ψ_{mk} , que aparecem na Eq. (28) são os parâmetros de interação energética entre os grupos i e j , dados pela Eqs. (31) e (32).

$$\tau_{ij} = \exp \left[-\frac{u_{ij} - u_{jj}}{RT} \right] = \exp \left(-\frac{a_{ij}}{T} \right) \quad (31)$$

$$\tau_{ji} = \exp \left[-\frac{u_{ji} - u_{ii}}{RT} \right] = \exp \left(-\frac{a_{ji}}{T} \right) \quad (32)$$

Em que: u_{ij} representa os parâmetros energéticos de interação entre os grupos i e j e o seu valor é a soma de todos os grupos presentes na mistura e são ligeiramente dependentes da temperatura, a_{ij} representa os parâmetros de interação do grupo e tem a unidade de Kelvin; além disso, enfatiza-se que $a_{ij} \neq a_{ji}$ e também $u_{ij} \neq u_{ji}$.

Os parâmetros de interação dos grupos de contribuição (a_{ij} e a_{ji}) foram estimados a partir dos dados experimentais de equilíbrio líquido-líquido de cada sistema utilizando um algoritmo implementado no código de Fortran TML-LLE 2.0 (AZNAR et al., 1998) que é baseado no método simplex modificado (NELDER e MEAD, 1965) e consiste em minimizar a função objetivo das composições (Eq. (33)).

$$S = \sum_k^D \sum_j^M \sum_i^{N-1} \left\{ (x_{ijk}^{I,exp} - x_{ijk}^{I,calc})^2 + (x_{ijk}^{II,exp} - x_{ijk}^{II,calc})^2 \right\} \quad (33)$$

A raiz quadrada do desvio médio (δx) foi utilizada para avaliar a precisão do modelo através da comparação entre os valores preditos e experimentais de cada componente em cada uma das fases.

$$\delta x = 100 \sqrt{\frac{\sum_j^M \sum_i^{N-1} \left\{ (x_{ijk}^{I,exp} - x_{ijk}^{I,calc})^2 + (x_{ijk}^{II,exp} - x_{ijk}^{II,calc})^2 \right\}}{2MN}} \quad (34)$$

Em que N e M são os números dos componentes e linhas de amarração em cada número de dados, respectivamente. Os subscritos I e II são as duas fases em equilíbrio, enquanto os subscritos exp e $calc$ referem-se aos valores experimentais e calculados, respectivamente, da fase líquida.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Diagramas de Equilíbrio

Os dados experimentais das curvas binodais dos sistemas formado por PEG ou álcool e fosfato de potássio e água foram correlacionados à equação não linear sugerida por Mistry et al. (1996). Os valores obtidos para os parâmetros a , b , c e d , assim como o respectivo desvio padrão (sd) e o coeficiente de determinação (R^2) da equação ajustada estão apresentados na Tabela 3. Com base nos valores elevados de R^2 e baixos valores de sd , pode-se verificar que o modelo se ajustou de forma satisfatória aos dados experimentais.

Tabela 3. Parâmetros de ajuste a , b , c , e d da Eq. (1) para os SAB PEG (4000 ou 6000 g·mol⁻¹) ou álcool (1-propanol ou 2-propanol) [w_1] + K₂HPO₄/H₃PO₄ [w_2] + água [w_3], à 25 °C, pH 7.0 e $p = 0.1$ Mpa.

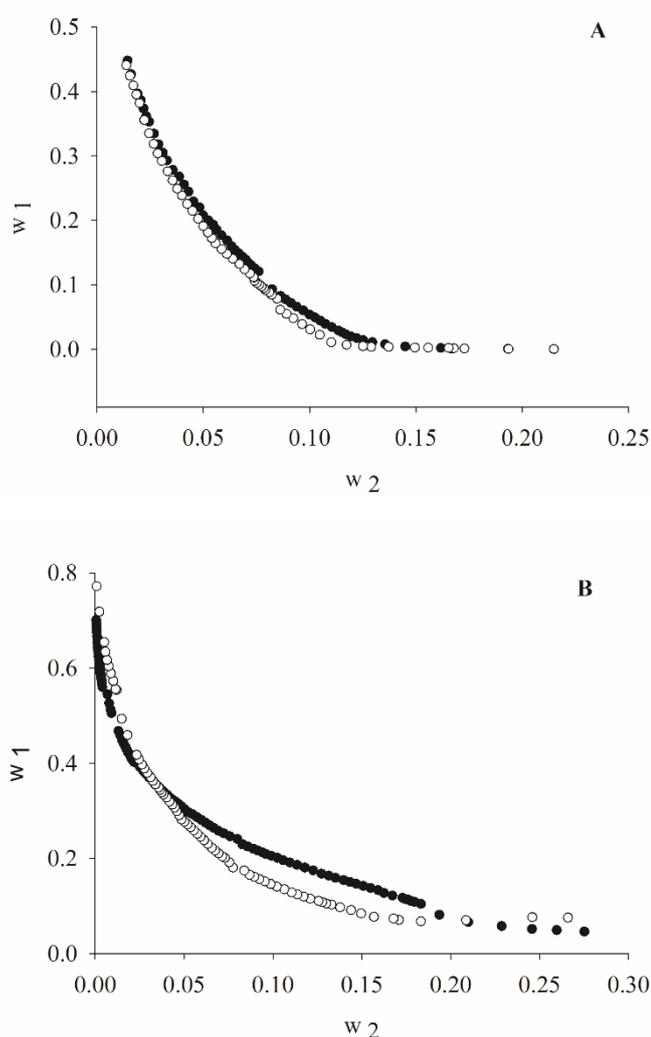
	a	b	c	d	R^2	Sd
PEG						
4000	0.579	-16.364	44.969	-285.211	0.999	0.003
6000	0.894	-21.069	62.415	-374.693	0.998	0.005
Álcool						
1-propanol	-0.242	-5.220	5.636	-24.540	0.999	0.006
2-propanol	-0.174	-2.720	-11.471	25.604	0.998	0.007

Os diagramas de fases para os sistemas formados por PEG (4000 ou 6000) ou álcool (1-propanol ou 2-propanol), sal (K₂HPO₄/H₃PO₄) e água estão apresentados nas Figuras 1A e 1B em função da massa molar do polímero e do tipo de álcool utilizado, respectivamente.

A capacidade de formação de fases dos componentes de um SAB pode ser explicada com base na posição das curvas binodais no diagrama de fase. Uma curva binodal localizada mais perto da origem implica que menores concentrações dos constituintes são requeridas para formar uma mistura bifásica, indicando que esses componentes possuem elevada capacidade de segregação de fases (IQBAL et al. 2016; LO et al., 2018). Como observado na Figura 1A, o sistema formado por PEG 6000 apresentou maior região bifásica. Indicando assim, que menores concentrações de sal e água são necessárias para formação do SAB. Tal resultado é consequência da maior hidrofobicidade desse polímero quando comparado ao PEG de massa molar menor (PEG 4000). De acordo com Yu et al. (2019), polímeros de menor massa molar exigem maiores quantidades de sal para formar a região de duas fases. À medida que a cadeia carbônica do PEG aumenta, ocorre o fortalecimento das interações intramoleculares e consequentemente, redução da solubilidade do polímero em meio aquoso (BARANI et al., 2018). Dessa forma, há uma menor competição entre os íons salinos e PEG pelas moléculas de água, o que favorece a formação de duas fases em menores quantidades de sal e polímero. Resultados semelhantes são encontrados em diversos estudos realizados para SAB formados por polímeros e sal (BARANI et al., 2018; MURARI, et al., 2015; SAMPAIO et al., 2016; SOSA et al., 2017).

Em termos de energia livre de Gibbs do processo de mistura, a contribuição da entropia configuracional é reduzida à medida que se adicionam segmentos -CH₂- na cadeia polimérica. Dessa forma, o aumento do grau de polimerização do PEG promove a redução da variação da energia livre de Gibbs ($\Delta_{mix}G$), induzindo a separação de fases em concentrações mais baixas de polímero (DA SILVA E LOH, 2006; MURARI et al., 2015).

Figura 1. Curvas binodais expressas em unidade de fração mássica dos sistemas (A) PEG 4000 g·mol⁻¹ (●) ou PEG 6000 g·mol⁻¹ (○) [w₁] + K₂HPO₄/H₃PO₄ [w₂] + água [w₃] e (B) álcool 1-propanol (○) ou 2-propanol (●) [w₁] + K₂HPO₄/H₃PO₄ [w₂] + água [w₃], à 25 °C e pH 7.0.



Observa-se na Figura 1B que a habilidade de formação de fases dos álcoois hidrofílicos estudados segue a ordem 1-propanol > 2-propanol. O deslocamento da curva binodal do SAB formado por 2-propanol no sentido de maior miscibilidade do álcool pode ser explicado com

base na maior polaridade apresentada pelo 2-propanol em comparação ao 1-propanol (ZAFARANI-MOATTAR et al., 2019; ZAFARANI-MOATTAR et al., 2020). A maior polaridade do 2-propanol ocasiona uma maior competição entre esse álcool e os íons salinos pelas moléculas de água, promovendo maior diluição dos componentes da mistura e conseqüentemente, a formação de menor região bifásica. Além disso, segundo Wang et al. (2010), outro critério que permite avaliar e entender de maneira eficaz a capacidade de formação de fases desses álcoois é o ponto de ebulição. O ponto de ebulição dimensiona a magnitude das forças de auto-interação como forças de Van Der Waals e ligações de hidrogênio, entre moléculas de álcool. O ponto de ebulição do 1-propanol (97.2 °C) é maior que o do 2-propanol (82.3 °C), indicando assim que a intensidade dessas forças intramoleculares é maior no 1-propanol. Dessa forma, as moléculas desse álcool estão menos disponíveis para interagir com água presente no meio, ou seja, há pouca competição entre o álcool e os íons pelas moléculas de água. Assim, uma menor quantidade de sal é suficiente para ocasionar a formação de uma mistura bifásica. Outros estudos encontrados na literatura para SAB formados por esses álcoois e sais reportam resultados similares (GUO et al., 2012; KHAYATI e GHOLITABAR, 2016; LO et al., 2018; ZAFARANI-MOATTAR et al., 2019; ZAFARANI-MOATTAR et al., 2020).

3.2. Efeito *salting-out* e volume efetivo de exclusão

Para uma melhor compreensão do comportamento dos SAB e de como os componentes (PEG ou álcool e sal) afetam processo de formação de fases, avaliou-se o efeito *salting-out* do sal K_2HPO_4/H_3PO_4 e o volume de exclusão do álcool ou PEG nos sistemas. Os parâmetros de ajuste (β e k) do efeito *salting-out* (Eq.10) e volume efetivo de exclusão (V_{213}^*) (Eqs.11 e 12), bem como os respectivos valores de R^2 e sd são apresentados na Tabela 4. De acordo com os coeficientes de determinação (R^2) e os valores de desvio padrão (sd), observa-se que as equações foram ajustadas satisfatoriamente aos dados experimentais.

Tabela 4. Parâmetros de ajuste (β e k) do efeito *salting-out* e do volume efetivo de exclusão (V_{213}^*) para os SAB PEG (4000 ou 6000) ou álcool (1-propanol ou 2-propanol) + $K_2HPO_4/H_3PO_4 + H_2O$, à 25°C, pH 7.0 e $p = 0.1$ MPa.

	V_{213}^* (gmol ⁻¹)	R ²	sd^b	k	β	R ²	sd^b
PEG							
4000	5444,062	0,975	0,003	64,120	-3,252	0,987	0,316
6000	6602,651	0,927	0,003	84,582	-5,119	0,993	0,285
Álcool							
1-propanol	465,525	0,945	0,079	11,609	-0,551	0,998	0,031
2-propanol	438,141	0,953	0,037	7,943	0,725	0,997	0,015

O modelo do volume efetivo de exclusão proposto por Guan et al. (1993) tem sido frequentemente utilizado para correlacionar a habilidade *salting-out* dos sais à exclusão do polímero ou álcoois hidrofílicos e assim, avaliar a capacidade de formação de fases desses componentes. Segundo Wang et al. (2010), o EEV permite avaliar a afinidade entre os componentes formadores dos sistemas (PEG-sal ou álcool-sal) e assim, mensurar a habilidade *salting-out* dos sistemas. Observou-se que os sistemas formados por PEG e sal apresentaram valores elevados de volume exclusão (V_{213}^*) e coeficiente *salting-out* (k) quando comparados aos sistemas formados por álcool e sal. Esse resultado pode ser associado ao tipo de interações presentes nas moléculas de PEG e de álcoois. As cadeias poliméricas dos polietilenoglicóis utilizados nesse trabalho são formadas por uma sequência linear de carbonos ligados entre si por ligações covalentes (MORRIS, 2017). Essas interações são mais fortes do que as ligações de hidrogênio e de Van Der Waals presentes na cadeia alquílica o que faz com que as moléculas de água tenham mais dificuldade em interagir com a cadeia polimérica do que com as moléculas de álcool. Uma vez que o volume efetivo de exclusão representa a quantidade de espaços vazios disponíveis na cadeia polimérica ou alquílica para realizar interações moleculares com os outros componentes do sistema, os sistemas formados por PEG tendem a apresentar maiores valores de EEV pois possuem fortes interações polímero-polímero, e se tornam menos disponíveis para interagir com as moléculas de água presentes no meio. Por consequência, ocorre uma maior interação íon-água que reflete nos elevados valores de efeito *salting-out*. Sosa et al. (2017)

avaliou o efeito *salting-out* de sais de sulfato (CuSO_4 e MnSO_4) em sistemas formados por PEG de diferentes massas molares (2000, 4000 e 6000) e verificaram que o valor do coeficiente *salting-out* (k) aumentou proporcionalmente ao aumento da massa molar do polímero.

Nos sistemas formados por PEG e sal, os valores de EEV do polímero e efeito *salting-out* do sal foram maiores nos sistemas formados por PEG 6000. Para os SAB formados por álcoois hidrofílicos e sal, observou-se que o sistema 1-propanol apresentou os maiores valores para ambos os parâmetros quando comparados com o formado por 2-propanol. Raciocínio análogo, ao que foi discutido anteriormente pode ser utilizado para entender tais comportamentos. A maior hidrofobicidade do PEG 6000 diminui a disponibilidade deste polímero para interações com as moléculas de água, ocasionando o aumento do volume de exclusão dessas moléculas da fase superior rica em PEG. Em contrapartida, ocorre o aumento significativo de moléculas de água disponíveis para solvatar os íons presentes na fase salina (fase inferior). O mesmo acontece com o 1-propanol, uma vez que esse álcool apresenta interações intramoleculares mais fortes (maior ponto de ebulição). Segundo Wang et al. (2010), o aumento do volume efetivo de exclusão reflete na redução da quantidade de sal requerida para que haja a formação de fase indicando assim, o aumento da habilidade *salting-out* do sal no sistema bem como da capacidade de formação de duas fases. Resultados semelhantes foram encontrados por Khayati e Gholitabar (2016), ao avaliarem a capacidade de formação de fase do 1-propanol e 2-propanol com diferentes sais de cloreto (KCl , NaCl e CaCl_2). Nesse estudo os três sais apresentaram maior capacidade *salting-out* nos sistemas formados por 1-propanol.

3.3. Linhas de amarração

Os coeficientes a , b , c e d obtidos para cada SAB a partir da equação de ajuste das curvas binodais (Eq. (1)) foram utilizados para quantificar os componentes em cada fase por meio das Eq. (2)-(5). As composições de equilíbrio (em fração mássica), densidades das fases, bem como o comprimento (CLA) e inclinação (ILA) das linhas de amarração dos sistemas compostos por PEG (4000 ou 6000) ou álcool (1-propanol ou 2-propanol) + $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ + água estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5. Dados das linhas de amarração, em unidade de fração mássica, e densidades das fases dos SAB PEG (4000 ou 6000) ou álcool (1-propanol ou 2-propanol) [w_1] + K_2HPO_4/H_3PO_4 [w_2] + H_2O , à 25°C, pH 7.0 e $p = 0.1$ MPa.

LA	Composição Global		Fase superior			Fase inferior			CLA	ILA
	w_1	w_2	w_1	w_2	ρ (kg.m ⁻³)	w_1	w_2	ρ (kg.m ⁻³)		
PEG 4000										
1	0,13	0,10	0,274	0,037	1080,899	0,003	0,156	1130,436	0,295	-2,282
2	0,15	0,11	0,343	0,025	1081,342	0,001	0,176	1169,020	0,373	-2,278
3	0,17	0,12	0,365	0,023	1084,512	0,000	0,205	1177,002	0,408	-2,001
PEG 6000										
1	0,13	0,10	0,284	0,001	1078,025	0,001	0,157	1129,775	0,309	-2,249
2	0,15	0,11	0,336	0,000	1080,254	0,000	0,179	1153,672	0,370	-2,166
3	0,17	0,12	0,364	0,000	1082,279	0,000	0,207	1174,950	0,409	-1,959

1-propanol										
1	0,24	0,10	0,584	0,009	975,156	0,104	0,136	1182,273	0,496	-3,786
2	0,26	0,11	0,611	0,007	945,065	0,087	0,161	1212,399	0,547	-3,424
3	0,28	0,12	0,639	0,006	926,732	0,075	0,185	1244,992	0,592	-3,144
2-propanol										
1	0,24	0,10	0,312	0,047	895,485	0,066	0,228	1099,979	0,305	-1,364
2	0,26	0,11	0,388	0,026	887,885	0,053	0,247	1129,409	0,402	-1,510
3	0,28	0,12	0,442	0,016	881,415	0,037	0,276	1156,164	0,482	-1,555

Observa-se na Tabela 5 que, em todos os sistemas avaliados, ocorreu uma exclusão dos íons salinos da cadeia polimérica ou alquílica propiciando a formação de duas fases, a fase salina era a fase inferior e a fase superior era formada pelo polímero ou álcool. Ambas as fases eram compostas majoritariamente por água (0.4070 – 0.8549). As fases inferiores, ricas em sal, apresentaram maiores valores de densidade quando comparadas às fases superior, ricas em PEG ou álcool. Verificou-se um aumento na densidade das fases com o aumento nas concentrações dos componentes do sistema.

Segundo Chakraborty e Sem (2016) o comprimento da linha de amarração (*CLA*) é um parâmetro termodinâmico que, em pressão e temperatura constantes, expressa a diferença de funções termodinâmicas entre as fases superior e inferior. Dessa maneira, é útil para caracterizar a composição de cada fase do sistema. O aumento da composição global dos sistemas promoveu aumento da concentração de PEG ou álcool na fase superior e de sal na fase inferior, ocasionando um acréscimo na diferença de concentração de cada componente nas fases e assim, incrementos nos valores de *CLA*. Tal fato, resulta em fases com propriedades termodinâmicas cada vez mais bem definidas. Resultados semelhantes são reportados por diversos autores para SAB formados por PEG-sal e álcool-sal (BARANI et al., 2018; BATISTA et al., 2020; SAMPAIO et al., 2019; PIMENTEL et al., 2017).

Para todos os sistemas estudados, os valores absolutos da inclinação das linhas de amarração (*ILA*) foram maiores que |1|. Verificou-se pequena variação entre os valores de *ILA* das linhas de amarração de um mesmo sistema. Para os sistemas formados por PEG (4000 ou 6000), o aumento da massa molar não influenciou no comportamento de *ILA*. Foi observado que as linhas de amarração dos sistemas formados por 1-propanol apresentaram valores absolutos de *ILA* maiores que as dos sistemas formados por 2-propanol. Isso significa que nos sistemas formados por 1-propanol a diferença de concentração dos componentes nas fases foi maior que os formados por 2-propanol. O que permite afirmar que o 1-propanol tem uma capacidade de segregação de fase superior ao 2-propanol.

Foi observado que, para uma mesma linha de amarração, os sistemas formados por álcool 1-propanol apresentaram fases superior com maior concentração de álcool do que os sistemas formados por 2-propanol, e comportamento contrário para a concentração de sal na fase inferior. Enquanto que para os sistemas formados por PEG (4000 ou 6000), as linhas de amarração não apresentaram diferenças pronunciadas nas concentrações de polímero e sal nas fases superior e inferior, respectivamente, com o aumento da massa molar da macromolécula. Tal resultado pode estar associado a magnitude do efeito *salting-out* do K_2HPO_4/H_3PO_4 em cada sistema. A diferença entre os valores dos coeficientes *salting-out* (*k*) nos sistemas

formados por álcoois (aproximadamente 46%) foi maior do que nos sistemas formados por polietilenoglicol (aproximadamente 32%). Nos sistemas formados por 1-propanol (maior valor de k) houve maior interação sal-água do que nos sistemas formados por 2-propanol, ocasionando na migração de um maior número de moléculas de água para a fase salina (inferior) e conseqüentemente, a diluição do sal nessa fase bem como a concentração de álcool na fase superior. Possivelmente nos sistemas formados por PEG, o aumento da habilidade *salting-out* do sal não foi suficiente para ocasionar comportamento semelhante quando a massa molar do polímero foi aumentada.

A literatura reporta algumas equações propostas com o intuito de avaliar a confiabilidade de dados de equilíbrio líquido-líquido. Dentre estas, as equações de Othmer - Tobias (1942) e Bancroft (1996) tem sido muito utilizada para correlacionar dados de linhas de amarração de sistemas aquosos bifásicos. Na Tabela 6 são apresentados os parâmetros (k_1 , n , k_2 e r) bem como, os valores de coeficiente de determinação (R^2) e desvios médios para todos os sistemas investigados. Diante dos elevados valores de R^2 ($> 0,996$) e baixos desvios entre as composições obtidas pela regra da alavanca e calculadas ($< 0,065$), é possível verificar a elevada consistência dos dados experimentais bem como a confiabilidade da metodologia utilizada para obtê-los.

Tabela 4. Valores dos parâmetros das correlações Othmer - Tobias (1942) (n e k_1) e Bancroft (r e k_2) para os SAB PEG (4000 ou 6000) ou álcool (1-propanol ou 2-propanol) + $K_2HPO_4/H_3PO_4 + H_2O$, à 25°C, pH 7,0 e $p = 0,1$ MPa.

	n	k_1	R^2	r	k_2	R^2	sd_1	sd_2
PEG 4000	2,265	0,136	0,996	0,411	2,326	0,998	0,048	0,025
PEG 6000	0,626	0,224	0,999	1,497	9,569	0,999	0,041	0,025
1-propanol	1,347	0,263	0,998	0,693	2,879	0,999	0,065	0,024
2-propanol	0,362	1,147	0,999	0,866	2,5206	0,999	0,028	0,025

3.4. Modelagem Termodinâmica dos SAB

O comportamento dos diagramas de equilíbrio pode ser melhor explicado por meio da energia proveniente da interação entre pares de grupos de contribuição dos componentes presentes no sistema. As composições de equilíbrio obtidas experimentalmente para as linhas de amarração de cada sistema foram utilizadas para estimar parâmetros de interação dos grupos

de contribuição através do modelo UNIFAC modificado por Kikic et al (1991). Para a predição dos parâmetros de interação (a_{ij} e a_{ji}) utilizou-se os parâmetros de volume (R_k) e área de superfície (Q_k) de cada grupo de contribuição (Tabela 2) como parâmetros de entrada.

Neste estudo, a molécula de cada propanol foi representada como um único grupo de contribuição. P1 e P2 representam 1-propanol e 2-propanol, respectivamente, e não interagem entre si. Não foi encontrado na literatura parâmetros de interação binária para representar as interações presentes entre as moléculas de álcool e os íons formadores do sal fosfato de potássio (K_2HPO_4/H_3PO_4). Os parâmetros (a_{ij} e a_{ji}) reportados por Magnussen et al. (1981) para interação álcool (P1 ou P2) / água não apresentaram precisão satisfatória na predição do comportamento das linhas de amarração. Sendo assim, para determinar quais interações melhor descrevem os sistemas estudados, realizou-se um estudo preliminar para auxiliar o entendimento acerca dos possíveis fatores que poderiam dificultar o bom ajuste do modelo utilizado aos dados de equilíbrio.

Nos sistemas formados por álcool-sal, os parâmetros de interação entre os álcoois (P1 e P2) com água e com os íons salinos (K^+ e HPO_4^-) presentes no sistema foram obtidos adotando diferentes valores de interação como hipótese inicial. A modelagem foi realizada de 4 maneiras distintas. Os indicadores (1 – 4) descritos na Tabela 7 correspondem às diferentes possibilidades testadas para ajustar o modelo aos dados experimentais: utilizando os parâmetros (a_{ij} e a_{ji}) reportados por Magnussen et al. (1981) para as interações entre P1 e P2 com a água (1); estimando novos parâmetros (a_{ij} e a_{ji}) para as interações entre P1 e H_2O (2); estimando novos parâmetros (a_{ij} e a_{ji}) para as interações entre P2 e H_2O (3) e estimando novos parâmetros (a_{ij} e a_{ji}) para as interações tanto de P1 quanto de P2 com água (4).

Tabela 5. Parâmetros de interação (a_{ij} e a_{ji}) dos grupos de contribuição do modelo UNIFAC para sistemas formados por álcool (1-propanol ou 2-propanol) + K_2HPO_4/H_3PO_4 + H_2O .

Grupo i	Grupo j	1		2		3		4	
		a_{ij}/K	a_{ji}/K	a_{ij}/K	a_{ji}/K	a_{ij}/K	a_{ji}/K	a_{ij}/K	a_{ji}/K
P1	HPO_4^-	523,800*	348,340*	- 0,059*	618,690*	2604,600*	563,990*	-8,512*	221,750*
P1	K^+	776,550*	38,051*	824,020*	213,660*	3584,900*	- 45,415*	-849,960*	5352,700*
P1	H_2O	- 61,290 ^a	247,000 ^a	420,500*	-3,595*	- 61,290 ^a	247,000 ^a	433,260*	- 9,390*
P2	HPO_4^-	143,850*	743,610*	549,680*	218,780*	2312,300*	1310,4*	2162,300*	2541,200*
P2	K^+	- 1486,300*	182,350*	473,190*	324,340*	4536,800*	1,854*	-1003,200*	24,056*
P2	H_2O	5,890 ^a	104,900 ^a	5,890 ^a	104,900 ^a	356,670	- 37,391*	174,850*	- 44,628*
HPO_4^-	K^+	- 212,990 ^b	- 668,670 ^b	- 212,990 ^b	- 668,670 ^b	- 212,990 ^b	- 668,670 ^b	- 212,990 ^b	- 668,670 ^b
HPO_4^-	H_2O	913,900 ^b	1099,000 ^b	913,900 ^b	1099,000 ^b	913,900 ^b	1099,000 ^b	913,900 ^b	1099,000 ^b
K^+	H_2O	513,060 ^b	- 2643 ^b	513,060 ^b	- 2643,600 ^b	513,060 ^b	- 2643,600 ^b	513,060 ^b	- 2643,600 ^b

P1 e P2 representam 1-propanol e 2-propanol, respectivamente; * indicam os parâmetros estimados;

^aDados obtidos de Magnssen et al. (1981); ^bDados obtidos de Haghtalab e Mokhtarani (2004).

O ajuste nos parâmetros referentes à interação álcool-água resultou no aumento significativo da confiabilidade da predição do comportamento das linhas de amarração por meio do modelo utilizado. Tal resultado pode ser comprovado por meio dos valores dos desvios entre valores experimentais e ajustados das composições das fases dos sistemas 1-propanol-sal (δx_1) e 2-propanol-sal (δx_2), bem como do desvio médio global desses sistemas ($\delta x_{1,2}$), apresentados na Tabela 8. Verifica-se que ao se utilizar os valores dos parâmetros de interação (a_{ij} e a_{ji}) P1-H₂O e/ou P2-H₂O reportados Magnussen et al. (1981) como chute inicial, elevados valores de desvios foram obtidos para os sistemas indicando assim, ajuste insatisfatório do modelo. Em contrapartida, ao se utilizar os novos parâmetros, baixos valores de desvios foram obtidos, indicando elevada precisão dos dados empíricos.

Tabela 6. Desvios nas composições dos sistemas formados por álcool (1-propanol (δx_1 (%)) ou 2-propanol (δx_2 (%))) + K₂HPO₄/H₃PO₄ + H₂O correlacionadas pelo modelo UNIFAC por diferentes estratégias.

	δx_1 (%)	δx_2 (%)	$\delta x_{1,2}$ (%)
1	12,66	4,97	9,62
2	1,08	4,54	3,30
3	12,41	2,02	8,89
4	1,14	2,06	1,67

As energias de interação calculadas a partir dos novos parâmetros estimados para os sistemas à 25°C foram comparadas com os valores de energia calculados a partir dos parâmetros obtidos por Magnussen et al. (1981) na mesma temperatura de estudo. A proximidade entre valores de energia de interação dos álcoois com a água calculados por meio dos parâmetros de interação já existentes na literatura e os estimados nesse trabalho indicam que os novos parâmetros de interações binárias entre esses grupos devem ser utilizados, pois apresentam maior precisão ($\delta x_{1,2} = 1,67$).

Na Tabela 9 estão apresentados os parâmetros de interação (a_{ij} e a_{ji}) obtidos na literatura, bem como os parâmetros de interação estimados e os valores da energia de interação (T_{ij} e T_{ji}) entre os grupos de contribuição para os todos os sistemas estudados.

Tabela 7. Parâmetros de interação (a_{ij} e a_{ji}) e Energia de interação (T_{ij} e T_{ji}) dos grupos de contribuição para sistemas formados por PEG (4000 ou 6000) ou álcool (1-propanol ou 2-propanol) + K_2HPO_4/H_3PO_4 + H_2O à 25°C.

Grupo i	Grupo j	a_{ij} (K)	a_{ji} (K)	T_{ij} (J.mol ⁻¹)	T_{ji} (J.mol ⁻¹)
P1	HPO_4^{-2}	-8,512*	221,750*	1,029	0,475
P1	K^+	-849,960*	5352,700*	17,301	<<1
P1	H_2O	433,260*	- 9,390*	0,234	1,032
P2	HPO_4^{-2}	2162,300*	2541,200*	<<1	<<1
P2	K^+	-1003,200*	24,056*	28,926	0,922
P2	H_2O	174,850*	- 44,628*	0,556	1,161
CH ₂	CH ₂ CH ₂ O	-248,540 ^a	1633,900 ^a	2,302	0,004
CH ₂	OH	644,600 ^b	328,200 ^b	0,115	0,333
CH ₂	HPO_4^{-2}	0,456*	4816,100*	0,998	<<1
CH ₂	K^+	657,970*	880,220*	0,110	0,052
CH ₂	H_2O	1300,000 ^b	342,500 ^b	0,013	0,317
CH ₂ CH ₂ O	OH	455,400 ^a	191,630 ^a	0,217	0,526
CH ₂ CH ₂ O	HPO_4^{-2}	- 67,732*	110,44*	1,255	0,690
CH ₂ CH ₂ O	K^+	8237,700*	1927,800*	<<1	<<1
CH ₂ CH ₂ O	H_2O	885,440 ^a	- 31,692 ^a	0,051	1,112
OH	HPO_4^{-2}	- 1679,100*	1459,700*	279,144	<<1
OH	K^+	599,630*	3668,100*	0,134	<<1
OH	H_2O	28,730 ^b	- 122,400 ^b	0,908	1,508
HPO_4^{-2}	K^+	- 212,99 ^c	- 668,67 ^c	2,043	9,419
HPO_4^{-2}	H_2O	913,90 ^c	1099,0 ^c	0,047	0,025
K^+	H_2O	513,06 ^c	- 2643,6 ^c	0,179	7091,682

*Parâmetros estimados; ^aDados obtidos de Sampaio et al. (2019); ^bDados obtidos de Yan et al. (1999); ^cDados obtidos de Haghtalab e Mokhtarani (2004).

De acordo com os valores de energia de interação obtidos por meio da simulação molecular representados na Tabela 9, é possível verificar que ambos os álcoois (P1 e P2) apresentaram elevados valores de interações com os íons salinos e com água. Em ambos os

sistemas a interação álcool-cátion foi mais forte que a interação álcool-água. No entanto, observou-se baixa energia de interação K^+ - P1 ($\ll 1 \text{ J.mol}^{-1}$) e ao mesmo tempo, elevada energia de interação água - K^+ ($7091,682 \text{ J.mol}^{-1}$), sendo significativamente maior que a interação água - P1 ($1,032 \text{ J.mol}^{-1}$). Tais resultados indicam, que nos sistemas formados pelo 1-propanol, a formação de fase se deve ao efeito *salting-out* do K^+ , que ocasiona a expulsão das moléculas de álcool para a fase oposta e ainda, uma maior migração das moléculas de água da fase superior rica em álcool para a camada de hidratação desses íons, resultando na diluição do sal na fase inferior e concentração do álcool na fase superior, como observado na Tabela 5. As interações discutidas para os sistemas formados por 1-propanol-sal reafirmam a maior região bifásica apresentada por esse sistema quando comparada ao SAB 2-propanol-sal, já que a baixa afinidade entre K^+ e o grupo P1 e maior interação K^+ - água resultam em menores concentrações de sal e água requeridas para a formação de duas fases.

Para os sistemas formados pelo álcool 2-propanol, os baixos valores obtidos para energias de interação entre o grupo P2 e o ânion HPO_4^{2-} ($\ll 1 \text{ J.mol}^{-1}$), indicam a baixa afinidade entre eles, ocasionando à exclusão desses íons da fase rica em álcool, bem como o *salting-out* das moléculas de álcool da fase inferior, rica em sal. Como as energias de interação dos grupos K^+ e P2 com água são altas, ocorre uma maior competição entre esses grupos pelas moléculas de água quando comparados com os sistemas formados por 1-propanol (P1) e como resultado, obtém-se menor diferença de composição entre as fases nos sistemas formados por 2-propanol. Tal comportamento explica o porquê de os sistemas formados por pelo álcool 2-propanol apresentarem valores de *CLA* menores que os sistemas formados por 1-propanol, partindo de uma mesma composição global.

Observou-se que o grupo de contribuição P1 apresentou menor energia de interação com água quando comparado com P2 ($0,234 \text{ J.mol}^{-1} < 0,556 \text{ J.mol}^{-1}$). A maior hidrofobicidade do 1-propanol pode estar associada à posição das hidroxilas na cadeia alquílica desse álcool, já que a disposição estrutural é a característica que distingue as propriedades desses isômeros. No álcool n-propanol ou 1-propanol, a hidroxila se posiciona na extremidade da cadeia, isto é, o grupo OH está ligado a um carbono primário. Na cadeia do isopropanol (2-propanol), o grupo hidroxil se liga a um carbono secundário, já que se encontra no meio da cadeia carbônica. Segundo Dai et al. (2020), a capacidade de doação de elétrons dos grupos hidroxilas aumentam quando estes estão ligados a carbonos secundários ou terciários. Diante disso, é possível atribuir a menor energia de interação entre o 1-propanol e água à menor disponibilidade de interação entre sua hidroxila e as moléculas de água, o que resulta em um maior volume de exclusão (1-propanol $>$ 2-propanol).

Em relação aos sistemas formados por PEG-sal, os baixos valores de interação observados entre os grupos $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ com a água e com o cátion (K^+), explicam o elevado valor de EEV desses sistemas, uma vez que, tal parâmetro está relacionado à exclusão das moléculas de água e íons salinos da fase polimérica (fase superior). Ainda foi possível observar que as energias de interação álcool-água, tanto para P1 quanto para P2 ($0,234 \text{ J.mol}^{-1}$ e $0,556 \text{ J.mol}^{-1}$, respectivamente) foram maiores que a energia de interação entre o grupo $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ e água ($0,051 \text{ J.mol}^{-1}$). Tais valores confirmam a maior hidrofobicidade apresentada pelos polímeros quando comparada aos álcoois e concordam com o maior volume de exclusão apresentado pelos sistemas formados por PEG.

Verificou-se que a energia de interação entre a molécula de água e o íon K^+ ($7091,682 \text{ J.mol}^{-1}$) foi significativamente maior do que as energias provenientes das outras interações. A partir desse resultado é possível inferir que, em todos os sistemas estudados, a habilidade *salting-out* do sal formador dos SAB ($\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$) se deve principalmente à forte interação água-cátion, que resulta na elevada tendência de migração das moléculas de água para a fase inferior dos sistemas (fase salina). À medida que as concentrações de sal e álcool ou PEG aumentam, essas interações ficam mais significativas em cada fase, ocasionando assim, uma maior diferença de composição entre as fases superior e inferior e conseqüentemente, acréscimo nos valores de CLA.

A Figura 2 mostra as linhas de amarração obtidas pela regra da alavanca e calculadas pelo modelo UNIFAC. Na Tabela 10 estão presentes os valores de desvios médios de cada sistema, bem como os desvios médio global. O modelo UNIFAC apresentou um ajuste satisfatório dos sistemas analisados. Os novos parâmetros de interação estimados no presente trabalho podem ser utilizados para predizer dados de equilíbrio líquido-líquido confiáveis para sistemas formados por PEG (4000 ou 6000) ou álcool (1-propanol ou 2-propanol) + $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4 + \text{H}_2\text{O}$.

Figura 2. Linhas de amarração obtidas pela regra da alavanca (—) e previstas pelo modelo UNIFAC (-----) expressas em unidade de fração mássica, para SAB (A) PEG 4000 g·mol⁻¹ ou (B) PEG 6000 g·mol⁻¹ [w₁] + K₂HPO₄/H₃PO₄ [w₂] + água [w₃] e (C) álcool 1-propanol ou (D) 2-propanol [w₁] + K₂HPO₄/H₃PO₄ [w₂] + água [w₃], à 25 °C e pH 7.0 e p = 0,1 MPa.

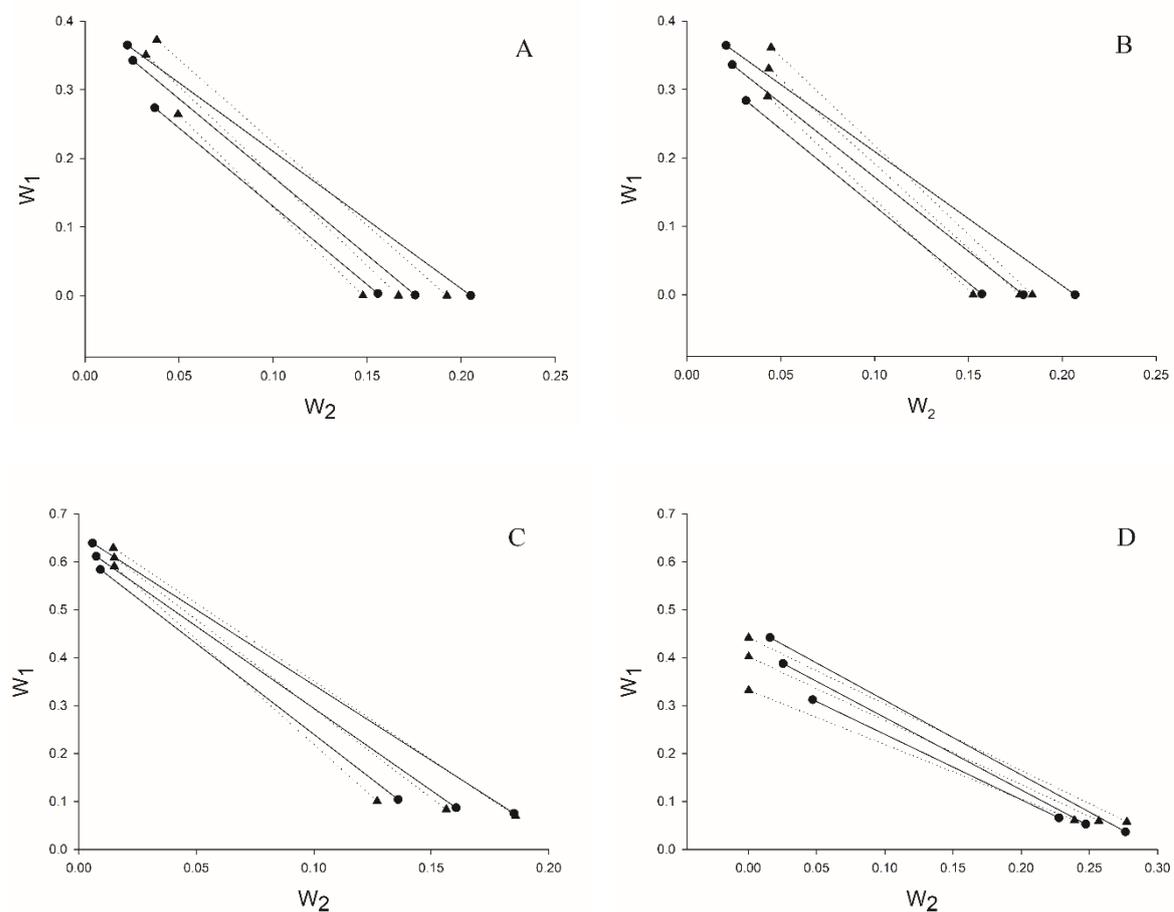


Tabela 8. Desvios nas composições dos sistemas formados por PEG (4000 e 6000) ou álcool (1-propanol ou 2-propanol) + K₂HPO₄/H₃PO₄ + H₂O, pelo modelo UNIFAC.

SAB	$\delta x(\%)$
PEG4000 + K ₂ HPO ₄ /H ₃ PO ₄	2,563
PEG6000 + K ₂ HPO ₄ /H ₃ PO ₄	3,493
1-propanol + K ₂ HPO ₄ /H ₃ PO ₄	1,141
2-propanol+ K ₂ HPO ₄ /H ₃ PO ₄	2,062
Desvio médio global SAB formados por PEG	3,064
Desvio médio global SAB formados por álcool	1,667

4. CONCLUSÃO

Dados de equilíbrio foram obtidos experimentalmente para sistemas aquosos formados por polietilenoglicol (PEG 4000 ou PEG 6000 gmol^{-1}) ou álcool (1-propanol ou 2-propanol), sal ($\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$) e água. Verificou-se que tanto a massa molar do polímero quanto o tipo de álcool utilizado influenciaram no deslocamento da região bifásica. Os sistemas formados por PEG e sal apresentaram valores elevados de volume exclusão (V_{213}^*) e coeficiente *salting-out* (k) quando comparados aos sistemas formados por álcool e sal. Os valores de EEV e efeito *salting-out* seguiram a ordem PEG 6000 > PEG 4000 > 1-propanol > 2-propanol. Foram obtidas 3 linhas de amarração para cada sistema, sendo possível verificar incrementos nos valores de *CLA* com o aumento da composição global dos constituintes dos sistemas. O aumento da massa molar não influenciou no comportamento de *CLA* e *ILA*. Entretanto o tipo de álcool utilizado exerceu influência sob esses parâmetros. Sistemas formados 1-propanol apresentaram valores absolutos de *CLA* e *ILA* maiores que as dos sistemas formados por 2-propanol. Por meio da modelagem termodinâmica foi possível concluir que a interação água-cátion foi significativamente maior do que as outras interações, indicando assim, que em todos os SAB estudados a habilidade *salting-out* do $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ se deve principalmente à essa forte, que resulta na elevada tendência de migração das moléculas de água para a fase salina dos sistemas. O modelo UNIFAC foi adequado para prever o comportamento dos sistemas, apresentando baixos desvios entre as composições experimentais e calculadas, variando de 1,141 – 3,493 %. Esses valores indicam que o modelo UNIFAC pode ser usado para correlacionar satisfatoriamente os dados LLE de SAB formados pelos mesmos grupos de contribuição utilizados nesse trabalho.

5. REFERÊNCIAS

- [1] L. Liu, Y. Liu, L. Du, Y. Zhao, H. Du, (Liquid+liquid) phase equilibrium of aqueous two-phase system containing (surfactant+sodium sulfate+water) at different temperatures, *Fluid Phase Equilib.* 415 (2016) 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2016.01.039>.
- [2] S.C. Lo, R.N. Ramanan, B.T. Tey, W.S. Tan, P.L. Show, T.C. Ling, C.W. Ooi, Purification of the recombinant enhanced green fluorescent protein from *Escherichia coli* using alcohol + salt aqueous two-phase systems, *Sep. Purif. Technol.* 192 (2018) 130–139. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.09.072>.
- [3] Z. Wu, G. Hu, K. Wang, B.Y. Zaslavsky, L. Kurgan, V.N. Uversky, What are the structural features that drive partitioning of proteins in aqueous two-phase systems?, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics.* 1865 (2017) 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.09.010>.
- [4] V. Dobрева, B. Zhekova, G. Dobrev, Use of Aqueous Two-Phase and Three-Phase Partitioning Systems for Purification of Lipase Obtained in Solid-State Fermentation by *Rhizopus arrhizus*, *Open Biotechnol. J.* 13 (2019) 27–36. <https://doi.org/10.2174/1874070701913010027>.
- [5] M.B. do Nascimento, S. de S. Castro, C.M. Veloso, R. da C.I. Fontan, D.J.S. do Nascimento, O.R.R. Gandolfi, V.S. Sampaio, L.A.A. Veríssimo, R.C.F. Bonomo, Equilibrium data and thermodynamic studies of α -amylase partition in aqueous two-phase systems, *Fluid Phase Equilib.* 463 (2018) 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2018.02.005>.
- [6] K.A. dos Santos, R. da Costa Ilhéu Fontan, L.S. Santos, I. de Carvalho Batista, O.R.R. Gandolfi, S. de Sousa Castro, V.S. Sampaio, C.M. Veloso, R.C.F. Bonomo, Partitioning of amylase produced by *Aspergillus niger* in solid state fermentation using aqueous two-phase systems, *Process Biochem.* 94 (2020) 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.03.028>.
- [7] I. de C. Batista, O.R.R. Gandolfi, V.S. Sampaio, K.A. dos Santos, R. da Costa Ilhéu Fontan, C.M. Veloso, R.C.F. Bonomo, Thermodynamics for curcumin (*Curcuma longa* L.) partitioning in the alcohol–salt aqueous two-phase system, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 95 (2020) 577–584. <https://doi.org/10.1002/jctb.6236>.
- [8] J.A. Penido, A.B. Mageste, P.L. Martins, G.M.D. Ferreira, Surfactant as selective modulator in the partitioning of dyes in aqueous two-phase systems: A strategy for separation, *J. Mol. Liq.* 293 (2019) 111501. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111501>.

- [9] L.R. de Lemos, P. da R. Patrício, G.D. Rodrigues, R.M.M. de Carvalho, M.C.H. da Silva, L.H.M. da Silva, Liquid-liquid equilibrium of aqueous two-phase systems composed of poly(ethylene oxide) 1500 and different electrolytes ((NH₄)₂SO₄, ZnSO₄ and K₂HPO₄): Experimental and correlation, *Fluid Phase Equilib.* 305 (2011) 19–24. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2011.03.001>.
- [10] R. de C.S. Sousa, M.M. Pereira, M.G. Freire, J.A.P. Coutinho, Evaluation of the effect of ionic liquids as adjuvants in polymer-based aqueous biphasic systems using biomolecules as molecular probes, *Sep. Purif. Technol.* 196 (2018) 244–253. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.07.018>.
- [11] A. Chakraborty, K. Sen, Impact of pH and temperature on phase diagrams of different aqueous biphasic systems, *J. Chromatogr. A.* 1433 (2016) 41–55. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.01.016>.
- [12] A. Hamta, M.R. Dehghani, M. Gholami, Novel experimental data on aqueous two-phase system containing PEG–6000 and Na₂CO₃ at T = (293.15, 303.15 and 313.15) K, *J. Mol. Liq.* 241 (2017) 144–149. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.05.149>.
- [13] M. Pemmalsamy, T. Murugesan, Prediction of liquid-liquid equilibria for polyethylene glycol based aqueous two-phase system by ASOG and UNIFAC method, *Brazilian J. Chem. Eng.* 26 (2009) 171–180. <https://doi.org/10.1590/s0104-66322009000100016>.
- [14] J.G. Pimentel, S.F. Bicalho, O.R.R. Gandolfi, L.A.A. Verissimo, S. de S. Castro, E.A. Souza, C.M. Veloso, R. da C.I. Fontan, V.S. Sampaio, R.C.F. Bonomo, Evaluation of *salting-out* effect in the liquid–liquid equilibrium of aqueous two-phase systems composed of 2-propanol and Na₂SO₄/MgSO₄ at different temperatures, *Fluid Phase Equilib.* 450 (2017) 184–193. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2017.08.001>.
- [15] B. Nazer, M. Dehghani, B. Goliaei, E. Morad, Partitioning of pyrimidine single stranded oligonucleotide using polyethylene glycol – sodium sulfate aqueous two-phase systems; experimental and modeling, *Fluid Phase Equilib.* 432 (2017) 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2016.10.014>.
- [16] I. Kikic, M. Fermeglia, P. Rasmussen, Unifac prediction of vapor-liquid equilibria in mixed solvent-salt systems, *Chem. Eng. Sci.* 46 (1991) 2775–2780. [https://doi.org/10.1016/0009-2509\(91\)85146-O](https://doi.org/10.1016/0009-2509(91)85146-O).

- [17] T. Magnussen, J.M. Sørensen, P. Rasmussen, A. Fredenslund, Liquid-liquid equilibrium data: Their retrieval, correlation and prediction Part III: Prediction, *Fluid Phase Equilib.* 4 (1980) 151–163. [https://doi.org/10.1016/0378-3812\(80\)80012-4](https://doi.org/10.1016/0378-3812(80)80012-4).
- [18] M. Blatkiewicz, A. Anteck, T. Boruta, A. Górak, S. Ledakowicz, Partitioning of laccases derived from *Cerrena unicolor* and *Pleurotus sapidus* in polyethylene glycol – phosphate aqueous two-phase systems, *Process Biochem.* 67 (2018) 165–174. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.01.011>.
- [19] A. Haghtalab, B. Mokhtarani, 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 Equilib.* 215 (2004) 151–161. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2003.08.004>.
- [20] C. Sánchez-Trasviña, K. Mayolo-Deloya, J. González-Valdez, M. Rito-Palomares, Refolding of laccase from *Trametes versicolor* using aqueous two phase systems: Effect of different additives, *J. Chromatogr. A.* 1507 (2017) 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.05.023>.
- [21] Y. Akama, A. Tong, M. Ito, S. Tanaka, The study of the partitioning mechanism of methyl orange in an aqueous two-phase system, *Talanta.* 48 (1999) 1133–1137. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(98\)00331-2](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(98)00331-2).
- [22] I.A.O. Reis, S.B. Santos, F.D.S. Pereira, C.R.S. Sobral, M.G. Freire, L.S. Freitas, C.M.F. Soares, Á.S. Lima, Extraction and Recovery of Rutin from Acerola Waste using Alcohol-Salt-Based Aqueous Two-Phase Systems, *Sep. Sci. Technol.* 49 (2014) 656–663. <https://doi.org/10.1080/01496395.2013.860461>.
- [23] G. Khayati, M. Anvari, N. Shahidi, Partitioning of β -galactosidase in aqueous two-phase systems containing polyethyleneglycol and phosphate salts, *Fluid Phase Equilib.* 385 (2015) 147–152. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2014.11.003>.
- [24] G. Khayati, A. Gholitabar, Liquid-Liquid Equilibrium of Hydrophilic Alcohols with Three Different Salts of Chloride: Experiment and Correlation, *J. Chem. Eng. Data.* 61 (2016) 1454–1461. <https://doi.org/10.1021/acs.jced.5b00771>.
- [25] L. Yan, Y.Q. Sun, X.D. Wang, H.X. Fu, Y. Mu, Z.L. Xiu, Partition behavior of monocarboxylic acids in *salting-out* extraction systems of monohydric alcohols and

dipotassium phosphate, *Sep. Purif. Technol.* 199 (2018) 351–358.
<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2018.02.006>.

[26] P.-A. Albertsson, *PARTITION OF CELL PARTICLES AND MACROMOLECULES*, John Wiley. 5 (1986) 233–234.

[27] S.L. Mistry, A. Kaul, J.C. Merchuk, J.A. Asenjo, Mathematical modelling and computer simulation of aqueous two-phase continuous protein extraction, *J. Chromatogr. A.* 741 (1996) 151–163. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(96\)00179-3](https://doi.org/10.1016/0021-9673(96)00179-3).

[28] J.C. Merchuk, B.A. Andrews, J.A. Asenjo, Aqueous two-phase systems for protein separation studies on phase inversion, *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 711 (1998) 285–293. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(97\)00594-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(97)00594-X).

[29] M. Hu, Q. Zhai, Z. Liu, S. Xia, Liquid-Liquid and Solid-Liquid Equilibrium of the Ternary System Ethanol + Cesium Sulfate + Water at (10, 30, and 50) °C, *J. Chem. Eng. Data.* 48 (2003) 1561–1564. <https://doi.org/10.1021/je0301803>.

[30] D. Othmer, P. Tobias, Liquid-Liquid Extraction Data - The Line Correlation, *Ind. Eng. Chem.* 34 (1942) 693–696. <https://doi.org/10.1021/ie50390a600>.

[31] Y. Guan, T.H. Lilley, T.E. Treffry, A New Excluded Volume Theory and Its Application to the Coexistence Curves of Aqueous Polymer Two-Phase Systems, *Macromolecules.* 26 (1993) 3971–3979. <https://doi.org/10.1021/ma00067a037>.

[32] E.A. Macedo, P. Skovborg, P. Rasmussen, Calculation of phase equilibria for solutions of strong electrolytes in solvent-water mixtures, *Chem. Eng. Sci.* 45 (1990) 875–882. [https://doi.org/10.1016/0009-2509\(90\)85009-3](https://doi.org/10.1016/0009-2509(90)85009-3).

[33] A. Bondi, *Physical Properties of Molecular Crystals, Liquids and Glasses*, *J. Polym. Sci.* (1968). <https://doi.org/10.1088/0031-9112/19/12/023>.

[34] D.S. Abrams, J.M. Prausnitz, Statistical thermodynamics of liquid mixtures: A new expression for the excess Gibbs energy of partly or completely miscible systems, *AIChE J.* 21 (1975) 116–128. <https://doi.org/10.1002/aic.690210115>.

[35] M. Aznar, L. Stragevitch, S.G. D'Ávila, Liquid-Liquid Equilibria: A comparison Between Original and Modified UNIFAC, *Lat. Am. Appl. Res.* 28 (1998) 135–138.

[36] J.A. Nelder, R. Mead, A Simplex Method for Function Minimization, *Comput. J.* 7 (1965) 308–313. <https://doi.org/10.1093/comjnl/7.4.308>.

- [37] M. Iqbal, Y. Tao, S. Xie, Y. Zhu, D. Chen, X. Wang, L. Huang, D. Peng, A. Sattar, M.A.B. Shabbir, H.I. Hussain, S. Ahmed, Z. Yuan, Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications, *Biol. Proced. Online.* 18 (2016) 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12575-016-0048-8>.
- [38] X. Yu, L. Wang, M. Li, Q. Huang, Y. Zeng, Z. Lan, Phase equilibria of CsCl-polyethylene glycol (PEG)-H₂O at 298.15 K: Effect of different polymer molar masses (PEG1000/4000/6000), *J. Chem. Thermodyn.* 135 (2019) 45–54. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2019.03.020>.
- [39] A. Barani, M. Pirdashti, Z. Heidari, E.N. Dragoi, Influence of the molecular weight of polymer, temperature and pH on phase diagrams of poly (ethylene glycol) + di-potassium tartrate aqueous two-phase systems, *Fluid Phase Equilib.* 459 (2018) 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2017.11.037>.
- [40] L.H.M. Da Silva, W. Loh, Aqueous two-phase systems: Fundamentals and applications for partitioning/purification of proteins, *Quim. Nova.* 29 (2006) 1345–1351. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000600033>.
- [41] G.F. Murari, J.A. Penido, P.A.L. Machado, L.R. de Lemos, N.H.T. Lemes, L.S. Virtuoso, G.D. Rodrigues, A.B. Mageste, Phase diagrams of aqueous two-phase systems formed by polyethylene glycol+ammonium sulfate+water: Equilibrium data and thermodynamic modeling, *Fluid Phase Equilib.* 406 (2015) 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2015.07.024>.
- [42] V.S. Sampaio, A.N. Alves, E.C. De Souza Júnior, L.A.A. Veríssimo, S. De Souza Castro, R. Da Costa Ilhéu Fontan, C.M. Veloso, S.P.B. Ferrão, R.C.F. Bonomo, Thermodynamic Modeling of Aqueous Two-Phase Systems Composed of Macromolecules and Sulfate Salts at pH 2.0, *J. Chem. Eng. Data.* 65 (2020) 9–18. <https://doi.org/10.1021/acs.jced.9b00557>.
- [43] F.H.B. Sosa, D. de Araujo Sampaio, F.O. Farias, A.B.G. Bonassoli, L. Igarashi-Mafra, M.R. Mafra, 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 Equilib.* 449 (2017) 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2017.06.009>.

- [44] Y. Wang, Y. Yan, S. Hu, J. Han, X. Xu, Phase diagrams of ammonium sulfate + ethanol/1-propanol/2-propanol + water aqueous two-phase systems at 298.15 K and correlation, *J. Chem. Eng. Data.* 55 (2010) 876–881. <https://doi.org/10.1021/je900504e>.
- [45] W. Guo, J. Ma, Y. Wang, J. Han, Y. Li, S. Song, *Thermochimica Acta* Liquid – liquid equilibrium of aqueous two-phase systems composed of (303 . 15 and 313 . 15) K and correlation, 546 (2012) 8–15.
- [46] Y. Wang, Y. Mao, J. Han, Y. Liu, Y. Yan, Liquid - Liquid equilibrium of potassium phosphate/potassium citrate/sodium citrate + ethanol aqueous two-phase systems at (298.15 and 313.15) K and correlation, *J. Chem. Eng. Data.* 55 (2010) 5621–5626. <https://doi.org/10.1021/je100501f>.
- [47] B.A. Morris, *Commonly Used Resins and Substrates in Flexible Packaging*, 2017. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-24273-8.00004-6>.
- [48] Y. Wang, J. Wang, J. Han, S. Hu, Y. Yan, Liquid-liquid equilibrium of novel aqueous two-phase systems and evaluation of *salting-out* abilities of salts, *Cent. Eur. J. Chem.* 8 (2010) 886–891. <https://doi.org/10.2478/s11532-010-0053-8>.
- [49] T. Magnussen, P. Rasmussen, A. Fredenslund, Unifac Parameter Table for Prediction of Liquid-Liquid Equilibria, *Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev.* 20 (1981) 331–339. <https://doi.org/10.1021/i200013a024>.
- [50] L. Danielski, L. Stragevitch, *Classical models part 2*, Elsevier Inc., 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811556-5.00004-1>.
- [51] C. Dai, Y. Hu, Y. Wu, M. Zhao, T. Yue, Effects of structural properties of alcohol molecules on decomposition of natural gas hydrates: A molecular dynamics study, *Fuel.* 268 (2020) 117322. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.117322>.
- [52] L. Ninni, M.S. Camargo, A.J.A. Meirelles, Water activity in poly (ethylene glycol) aqueous solutions, *Thermochim. Acta.* 328 (1999) 169–176. [https://doi.org/10.1016/s0040-6031\(98\)00638-8](https://doi.org/10.1016/s0040-6031(98)00638-8).
- [53] W. Yan, M. Topphoff, C. Rose, J. Gmehling, Prediction of vapor-liquid equilibria in mixed-solvent electrolyte systems using the group contribution concept, *Fluid Phase Equilib.* 162 (1999) 97–113. [https://doi.org/10.1016/S0378-3812\(99\)00201-0](https://doi.org/10.1016/S0378-3812(99)00201-0).

ARTIGO 2

Estudo termodinâmico da partição da lipase pancreática de porco em sistemas aquosos bifásicos formados por PEG (4000 e 6000) + K_2HPO_4/H_3PO_4 + água e 2-propanol + K_2HPO_4/H_3PO_4 + água em diferentes temperaturas

RESUMO

Foi realizado um estudo dos parâmetros termodinâmicos associados ao comportamento de partição da lipase pancreática de porco (LPP) comercial em sistemas aquosos bifásicos formados por PEG (4000 e 6000) + K_2HPO_4/H_3PO_4 + água e 2-propanol + K_2HPO_4/H_3PO_4 + água em pH 7,0 e nas temperaturas (20, 25, 30 e 35 °C). Para avaliar a eficiência dos sistemas no processo de separação, foram determinados os parâmetros coeficientes de partição de proteínas (K_p) e de atividade enzimática (K_e), índice de recuperação teórica (%Y), fator de purificação (FP) e seletividade (S). Além disso, para auxiliar o entendimento das forças motrizes envolvidas na partição, determinaram-se os parâmetros termodinâmicos de transferência ($\Delta_{tr}G$, $\Delta_{tr}H$ e $\Delta_{tr}S$). A equação de Van't Hoff foi utilizada para calcular a variação de entalpia em função da temperatura. Os valores de K_p indicaram que as proteínas migraram preferencialmente para a fase superior dos sistemas (rica em PEG ou álcool), enquanto a enzima se concentrou na fase inferior, na maioria dos sistemas, apresentando maior atividade lipolítica na fase salina ($K_e < 1$). Verificou-se uma tendência de acréscimo no valor de K_p e redução dos valores de K_e à medida que o comprimento da linha de amarração (CLA) aumentou. A variação da energia livre de transferência ($\Delta_{tr}G$) das proteínas apresentou valores negativos em todas as condições de estudo avaliadas e o aumento no CLA resultou na redução no valor de $\Delta_{tr}G$ (devido ao aumento de K_p). Em relação a transferência da lipase, os valores positivos de $\Delta_{tr}G$ nos SAB formados por PEG 4000/sal e 2-propanol/sal, evidencia que a partição da lipase para a fase inferior é termodinamicamente desfavorável. No SAB formado por PEG 6000/sal, $\Delta_{tr}G$ assumiu valores negativos mesmo em menores valores de CLA. Na maioria dos sistemas estudados, a transferência da lipase foi movida por contribuições entálpicas. O melhor sistema para a partição da lipase pancreática de porco é o SAB formado por 13% de PEG 4000 e 9% de K_2HPO_4/H_3PO_4 (LA 1) na temperatura de 25 °C, o qual apresentou $K_e = 0,056$, %Y = 94,655% e FP = 4,357.

PALAVRAS-CHAVE: Parâmetros termodinâmicos de transferência; comprimento da linha de amarração; energia livre de transferência; contribuições entálpicas.

1. INTRODUÇÃO

Enzimas são biomoléculas que desempenham importantes papéis nos mais variados setores industriais e por isso possuem forte apelo biotecnológico. As lipases (triacilglicerol acilhidrolases E.C.3.1.1.3) são enzimas hidrolíticas que devido as suas propriedades versáteis, estão entre as enzimas mais utilizadas industrialmente (JAVED et al., 2018). A alta estabilidade a condições operacionais diversas, bem como a capacidade de reconhecer uma ampla variedade de substratos e apresentar elevada especificidade são características que fazem com que estas enzimas se destaquem perante outras, colocando-as no ranking entre as enzimas mais comercializadas no mundo, com aplicação em diversos segmentos, como na formulação de detergentes, processamento de alimentos, na indústria farmacêutica, produção de biodiesel, na síntese de biossurfactantes, síntese de ésteres aromáticos, no tratamento de efluentes, dentre outras (BHARATHI e RAJALAKSHMI, 2019; CASTIGLIONI et al., 2018; RIOS et al., 2018; JAVED et al., 2018). A aquisição dessas enzimas com um elevado grau de pureza e a um custo relativamente baixo é interessante para o mercado, por este motivo, é necessária a continuidade de estudos e aprimoramento de técnicas de extração e/ou purificação de lipases.

Dentre as técnicas mais empregadas para obtenção de lipases, pode-se citar precipitação utilizando sulfato de amônio, acetona ou etanol, filtração em gel, extração líquido-líquido e algumas técnicas cromatográficas como a cromatografia de afinidade e cromatografia de troca iônica (BHARATHI e RAJALAKSHMI, 2019; JAVED et al., 2018; RIOS et al., 2018; RAMAKRISHNAN et al., 2016; SHOW et al., 2015). As técnicas de precipitação, na maioria das vezes, necessitam de outras etapas para se obter um produto final com alta pureza, aumentando assim o tempo de processo. As técnicas cromatográficas, por sua vez, podem produzir altos rendimentos em um processo de uma etapa devido à sua alta seletividade. Entretanto, devido ao alto custo associado a essa técnica de extração, as demais técnicas são preferíveis (RAMAKRISHNAN et al., 2016; SHOW et al., 2015). Técnicas alternativas de purificação têm sido estudadas com o intuito de aumentar a viabilidade da produção de lipases, visando a obtenção dessas enzimas em um processo rápido, econômico e eficaz. Os sistemas aquosos bifásicos (SAB), técnica de extração líquido-líquido, vêm se destacando dentre as técnicas de purificação como alternativa viável aos métodos convencionais de separação e recuperação de biocompostos por apresentar vantagens como elevada biocompatibilidade com materiais

biológicos, baixa tensão interfacial, rápida separação de fases, baixo custo, poucos impactos ambientais e facilidade de reprodução em larga escala (PENIDO et al., 2019; SOUSA et al., 2017; SHOW et al., 2015).

Os SAB têm sido empregados com sucesso em processos de separação e purificação de lipases de fontes convencionais e não convencionais (ZHOU et al., 2013; ANVARI 2015; DUARTE et al. 2015; ALHELLI et al. 2016; RAMAKRISHNAN et al. 2016; CARVALHO et al. 2017; DOBREVA et al. 2019), devido, principalmente, a grande quantidade de água presente nas fases que promovem a separação do composto de interesse em condições amenas, de forma que ocorra a manutenção da estabilidade e retenção da atividade biológica (NADAR et al., 2017).

Embora já exista na literatura trabalhos reportando a utilização de SAB em etapas de extração/purificação de lipase, a continuidade de estudos relacionados às forças motrizes que governam a distribuição da biomolécula nas fases possibilita uma melhor compreensão a respeito do processo de transferência. O estudo dos parâmetros termodinâmicos de transferência (variação da energia livre ($\Delta_{tr}G$), entalpia ($\Delta_{tr}H$) e entropia ($\Delta_{tr}S$) possibilita maior compreensão do processo de partição da molécula-alvo entre as fases. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho consiste em realizar uma análise termodinâmica da partição da lipase pancreática de porco em sistemas aquosos bifásicos formados por polímeros (PEG (4000 ou 6000 g·mol⁻¹)) + fosfato de potássio e álcool 2-propanol + fosfato de potássio e água em pH 7,0.

2. MATERIAL E METÓDOS

2.1. Local do experimento

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Engenharia de Processos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), campus Juvino Oliveira - Itapetinga.

2.2. Material

Polietilenoglicol 4000 (CAS No. 25322-68-3), 6000 g·mol⁻¹ (CAS 25322-68-3) e a lipase pancreática de porco foram adquiridos da Sigma. 2-propanol (CAS No. 67-63-0), fosfato de potássio bibásico (K₂HPO₄) (CAS No. 7558-79-4) e ácido fosfórico (H₃PO₄) (CAS No. 7664-38-2) foram adquiridos da Synth, Brasil. Todos os reagentes utilizados no presente trabalho foram de grau analítico e não foram submetidos a nenhum

método de tratamento ou purificação prévio. Utilizou-se água destilada em todo o experimento.

2.3. Montagem dos sistemas aquosos bifásicos

Os SAB utilizados na partição da lipase pancreática de porco foram formados por PEG (4000 e 6000) + fosfato de potássio + água e álcool 2-propanol + fosfato de potássio + água em diferentes temperaturas (20, 25, 30 e 35) °C, pH 7,0 e pressão atmosférica. Os pontos globais selecionados para partição estão representados na Tabela 1.

Para o preparo dos sistemas foram utilizados álcool 2-propanol ou soluções aquosas de polietilenoglicol (4000 ou 6000 g·mol⁻¹ [50% m/m]), solução salina de fosfato de potássio (K₂HPO₄/H₃PO₄) [25%] e água destilada. O pH da solução salina foi ajustado para 7,0 com ácido fosfórico e conferido em pHmetro de bancada (Quimis, modelo Q400MT, Brasil). Foram pesadas quantidades apropriadas dos componentes até uma massa final de 40 g em tubos graduados de 50 mL em balança analítica M254A (Bel Engineering, Piracicaba, Brasil) com uma precisão de ± 0,0001 g. Os tubos contendo os sistemas foram agitados vigorosamente em vortex (Phoenix, modelo AP-56) por 2 minutos e então centrifugados (SP Labor, modelo Sp-701, Brasil) a 2000 g por 10 minutos, para acelerar a separação de fases. Os tubos foram mantidos em repouso, durante 24 horas em estufa B.O.D (Longen Scientific, modelo LG340 FT220, Brasil) nas respectivas temperaturas de estudo para se assegurar o equilíbrio das fases fosse atingido e que houvesse a formação de 2 fases bem definidas. Em seguida, as fases foram separadas e pesadas.

Tabela 1. Composição global dos sistemas formado por PEG (4000 e 6000) + K_2HPO_4/H_3PO_4 + água e álcool + K_2HPO_4/H_3PO_4 + água, expressas em fração mássica.

Ponto Global	PEG	sal	2-PROPANOL	sal
20 °C				
1	0,130	0,090	0,240	0,100
2	0,130	0,100	0,250	0,105
3	0,150	0,100	0,260	0,110
4	0,150	0,110	0,270	0,115
5	0,170	0,120	0,280	0,120
25 °C				
1	0,130	0,090	0,240	0,100
2	0,130	0,100	0,250	0,105
3	0,150	0,100	0,260	0,110
4	0,150	0,110	0,270	0,115
5	0,170	0,120	0,280	0,120
30 °C				
1	0,130	0,090	0,280	0,110
2	0,130	0,100	0,290	0,115
3	0,150	0,100	0,300	0,120
4	0,150	0,110	0,310	0,125
5	0,170	0,120	0,320	0,130
35 °C				
1	0,130	0,090	0,300	0,115
2	0,130	0,100	0,310	0,120
3	0,150	0,100	0,320	0,125
4	0,150	0,110	0,330	0,130
5	0,170	0,120	0,340	0,135

As concentrações de cada componente nas fases coletadas foram estimadas pela regra da alavanca (Equações (1 - 4)), que utiliza a relação entre a composição em massa da fase superior e a composição total do sistema (MERCHANT et al., 1998). Todos os sistemas foram preparados em triplicata.

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

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

$$\frac{[w_1]_t - [w_1]}{[w_1] - [w_1]_b} = \frac{m_b}{m_t} \quad (3)$$

$$\frac{[w_2] - [w_2]_t}{[w_2]_b - [w_2]} = \frac{m_b}{m_t} \quad (4)$$

O comprimento das linhas de amarração (*CLA*) foram determinados utilizando a Equação 5:

$$CLA = [(w_1^t - w_1^b)^2 + (w_2^t - w_2^b)^2]^{0.5} \quad (5)$$

Em que: w_1 e w_2 são as composições em fração mássica do PEG/álcool e sal nas fases, e os subscritos “t”, “b” e “m” representam as fases superior e inferior e a composição de mistura, respectivamente; m_t e m_b , as massas das fases superior e inferior, respectivamente.

Tabela 2. Comprimento das linhas de amarração (CLA) dos SAB formados por PEG (4000 e 6000) + K₂HPO₄/H₃PO₄ + água e álcool + K₂HPO₄/H₃PO₄ + água.

LA	PEG 4000	PEG 6000	2-PROPANOL
20 °C			
1	0,255	0,277	0,337
2	0,307	0,329	0,382
3	0,335	0,362	0,424
4	0,377	0,382	0,460
5	0,435	0,442	0,494
25 °C			
1	0,253	0,288	0,304
2	0,295	0,312	0,351
3	0,318	0,352	0,402
4	0,387	0,370	0,443
5	0,408	0,409	0,482
30 °C			
1	0,294	0,298	0,361
2	0,326	0,335	0,427
3	0,350	0,366	0,482
4	0,391	0,395	0,522
5	0,437	0,444	0,565
35 °C			
1	0,289	0,306	0,381
2	0,340	0,351	0,461
3	0,356	0,370	0,522
4	0,378	0,394	0,573
5	0,438	0,422	0,617

2.4. Partição da lipase

As fases coletadas com seringas e pesadas foram armazenadas em recipientes com tampa sob refrigeração até que todas as análises de determinação de teor de proteína e atividade enzimática fossem realizadas. Para montagem dos sistemas de partição, pesou-

se 30 mg da lipase em tubos graduados de 15 mL. Em seguida, adicionou-se 3.0 mL de fase superior e 3,0 mL de fase inferior. Os sistemas foram submetidos à agitação e, então, centrifugados a $2000 \times g$ por 10 minutos. Os tubos foram mantidos em repouso, em estufa B.O.D. por aproximadamente 24 horas nas temperaturas de estudo pré-determinadas. Posteriormente, as fases foram coletadas com seringas, deixando uma camada de fina espessura acima e abaixo da interface e o teor de proteína e da atividade lipolítica em cada fase foram determinados. Os ensaios de partição foram realizados em triplicata.

2.4.1. Determinação do teor de proteína

A concentração de proteína nas fases foi determinada pelo método de Bradford (1976) a 595 nm, em espectrofotômetro (Modelo 570 Libra BIOCHROM, Biochrom Ltda., Cambridge, UK). Foi utilizada albumina sérica bovina como padrão. Para evitar interferência dos componentes da fase, as amostras foram analisadas em branco contendo a mesma composição de fase, mas sem a proteína.

2.4.2. Determinação da atividade enzimática

A atividade hidrolítica da enzima foi determinada pelo método de hidrólise da emulsão de azeite de oliva conforme metodologia adaptada de Soares et al. (1999). Em frascos Erlenmeyer de 125 mL foram adicionados 5 ml de substrato, o qual consiste em uma emulsão formada por 25 g de azeite de oliva e 75 g de solução de goma arábica [3% m/m], em 5 mL de tampão fosfato de sódio ($0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 8,0) e 1 mL da fase. Os frascos foram incubados a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10 min em mesa agitadora à 150 rpm. Após o período de incubação a reação foi paralisada pela adição de 10 mL de uma solução de etanol a 92,5% (v/v). Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de NaOH $30 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ até pH 11. O cálculo da atividade hidrolítica foi realizado de acordo com a Equação 6. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera $1 \mu\text{mol}$ de ácido graxo por minuto de reação, nas condições do ensaio ($37 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 8,0 e 150 rpm). Em paralelo, foi realizado um controle (branco) utilizando as fases sem enzima nas mesmas condições.

$$U (\mu\text{mol}/\text{min}) = \frac{(V_a - V_b) \times M \times 10^3}{t} \quad (6)$$

Em que: V_a e V_b representam o volume (mL) de NaOH gasto na titulação da amostra e do branco, respectivamente; M é a concentração molar ($\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$) da solução de NaOH e t é o tempo de reação (min);

2.5. Determinação dos parâmetros de partição

2.5.1. Determinação do coeficiente de partição de proteína

O coeficiente de partição das proteínas (K_p) é a razão de entre a concentração de equilíbrio ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) na fase superior (C_t) e inferior (C_b) e foi determinado como descrito pela Equação 7.

$$K_p = \frac{C_t}{C_b} \quad (7)$$

2.5.2. Determinação do coeficiente de atividade enzimática

O coeficiente de partição de atividade enzimática (K_e), definido como a atividade enzimática (U/mL) nas fases superior (A_t) e inferior (A_b) do sistema, foi determinado conforme descrito pela Equação 8.

$$K_e = \frac{A_t}{A_b} \quad (8)$$

2.5.3. Recuperação teórica

A recuperação teórica (%Y) é uma variável que avalia a eficiência da partição de acordo com a quantidade de enzima presente na fase preferencial, ou seja, o rendimento da extração utilizando SAB, %Y foi determinada de acordo a Equação 9.

$$\%Y = \frac{1}{1 + 1/RK_e} \quad (9)$$

Em que: R corresponde à razão entre os volumes da fase superior e inferior e K_e ao coeficiente de partição de atividade da lipase.

2.5.4. Fator de purificação da enzima

O fator de purificação (FP) foi calculado por meio da razão entre a atividade enzimática específica (A_E) na fase na qual a lipase migrou preferencialmente e no extrato

enzimático (Equação 5):

$$FP = \frac{[A_E]_{fase}}{[A_E]_{ext}} \quad (10)$$

Em que: A_E é definido como sendo a atividade enzimática (A) por teor de proteína total (C) e dada é em (μ_{mol}/mg).

Para calcular (A_E) na fase e no extrato de lipase em tampão fosfato pH 7,0 [5 mg/mL), utilizou-se a Equação 11.

$$A_E = \frac{A}{C} \quad (11)$$

2.5.5. Seletividade dos SAB

A seletividade (S) foi determinada por meio da razão entre o coeficiente de partição da atividade lipolítica (K_e) e o coeficiente de partição da proteína total (K_p), como mostra a Equação 12.

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

2.6. Avaliação dos parâmetros termodinâmicos de transferência

2.6.1. Determinação da energia livre de Gibbs de transferência ($\Delta_{tr}G$)

A variação da energia livre de Gibbs de transferência, definida como a mudança de energia livre de Gibbs molar associada ao processo de transferência da biomolécula entre as fases do SAB, foi calculada de acordo com a Equações (13) e (14).

$$\Delta_{tr}G = -RT \ln K_p \quad (13)$$

$$\Delta_{tr}G = -RT \ln K_e \quad (14)$$

Onde: T é a temperatura absoluta (K) de estudo da partição; R é a constante dos gases ideais ($J \cdot K^{-1} \cdot mol^{-1}$); K_p é o coeficiente de partição de proteínas totais e K_e , o coeficiente de partição da lipase.

2.6.2. Determinação da entalpia de transferência ($\Delta_{tr}H$)

Foi estudada a partição da lipase em quatro temperaturas. A partir dos valores dos coeficientes de partição de proteínas totais (K_p) e da lipase (K_e) obtidos para cada linha de amarração nas diferentes temperaturas, foi aplicada uma aproximação da equação de Van't Hoff, a qual relaciona o $\ln K_p$ com $1/T$ por meio de uma expressão polinomial, representada pela Equações (15) e (16):

$$\ln K_p = a + b \cdot \left(\frac{1}{T}\right) + c \cdot \left(\frac{1}{T}\right)^2 \quad (15)$$

$$\ln K_e = a + b \cdot \left(\frac{1}{T}\right) + c \cdot \left(\frac{1}{T}\right)^2 \quad (16)$$

Em que: a , b e c são os parâmetros de ajuste da equação polinomial do gráfico $1/T$ versus $\ln K$; e $\ln K$ é o valor da constante. Assim, é possível determinar a variação de entalpia de transferência ($\Delta_{tr}H$) associada ao processo de partição por meio da Equação 17:

$$\Delta_{tr}H = -R \cdot \left[b + 2c \cdot \left(\frac{1}{T}\right) \right] \quad (17)$$

2.6.3. Determinação da entropia de transferência ($\Delta_{tr}S$)

A variação da entropia de transferência ($\Delta_{tr}S$) foi determinada por diferença utilizando a Equação geral da energia livre de Gibbs (Equação 18):

$$\Delta_{tr}G = \Delta_{tr}H - T\Delta_{tr}S \quad (18)$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Influência do comprimento da linha de amarração (CLA) no comportamento de partição da lipase LPP

Foram realizados experimentos de partição da lipase pancreática de porco comercial em sistemas aquosos bifásicos compostos por PEG (4000 ou 6000 g·mol⁻¹) + fosfato de potássio + água e 2-propanol + fosfato de potássio + água, com 5 linhas de amarração e diferentes temperaturas (20, 25, 30 e 35) °C. A lipase pancreática de porco (LPP) da Sigma contém de 8–20% (m/m) de proteína e apresenta outras enzimas contaminantes em sua composição, como proteases (tripsina, quimiotripsina e carboxipeptidase B), amilases e outros (Informações técnicas da Sigma-Aldrich). As Figuras 1 (A, B e C) e 2 (A, B e C) apresentam o comportamento de distribuição das proteínas totais (K_p) e da atividade lipolítica (K_e) entre as fases, em função do comprimento da linha de amarração.

Figura 1. Coeficiente de partição de proteína (K_p) em função do comprimento da linha de amarração (CLA) dos SAB formados por PEG (4000 (A) e 6000 (B)) + K_2HPO_4/H_3PO_4 + água e 2-propanol + K_2HPO_4/H_3PO_4 + água (C) em diferentes temperaturas $T= 20\text{ }^\circ\text{C}$ (x), $25\text{ }^\circ\text{C}$ (▲), $30\text{ }^\circ\text{C}$ (●) e $35\text{ }^\circ\text{C}$ (◆).

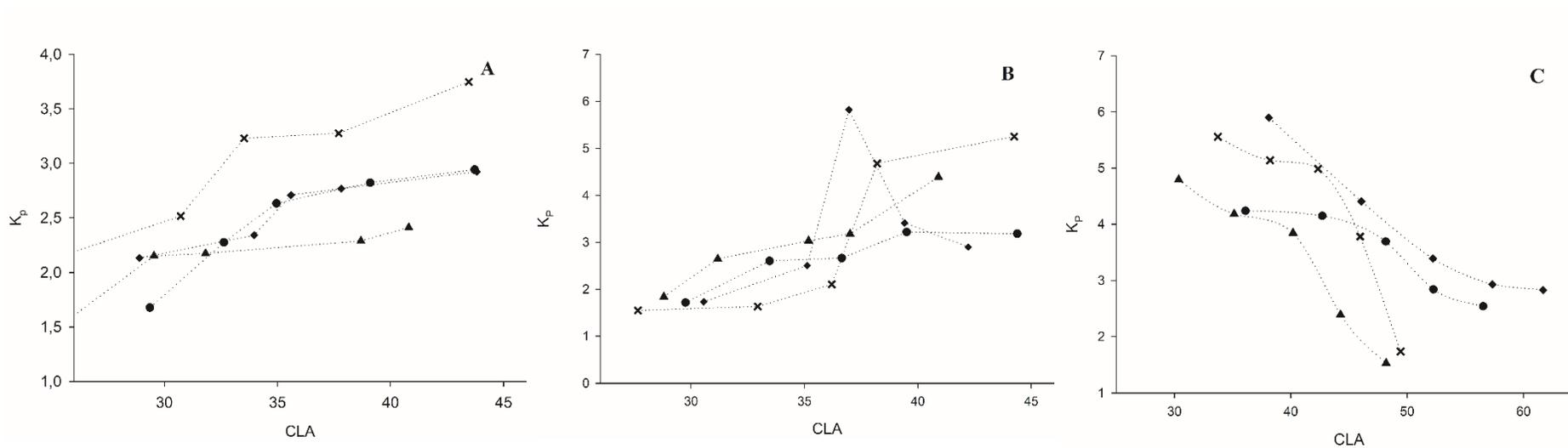
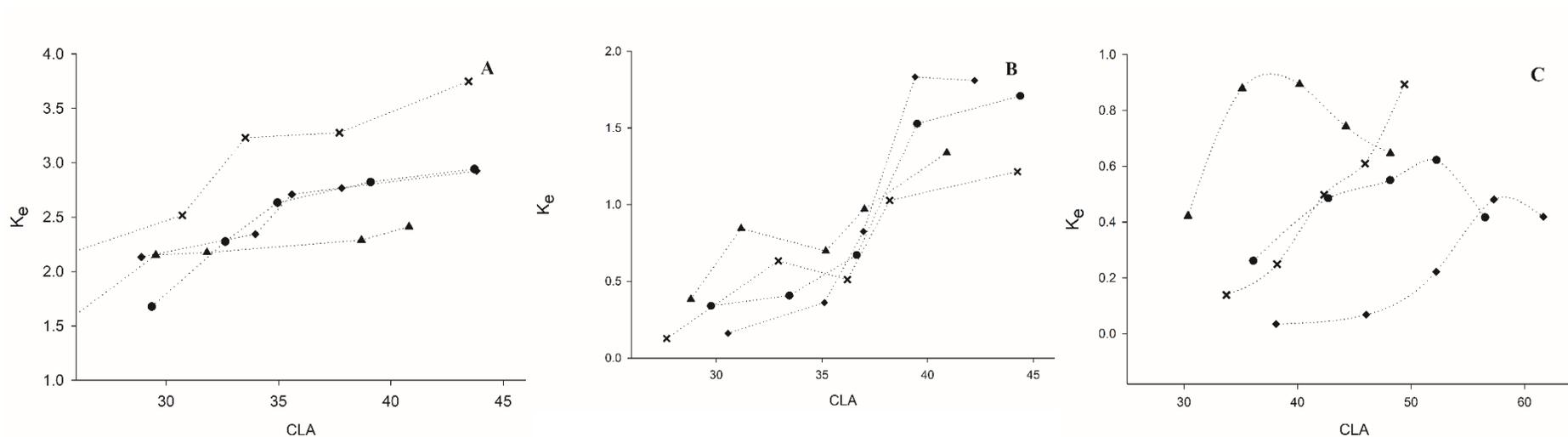


Figura 2. Coeficiente de atividade enzimática (K_e) em função do comprimento da linha de amarração (CLA) dos SAB formados por PEG (4000 (A) e 6000 (B)) + K_2HPO_4/H_3PO_4 + água e 2-propanol + K_2HPO_4/H_3PO_4 + água (C) em diferentes temperaturas $T= 20\text{ }^\circ\text{C}$ (x), $25\text{ }^\circ\text{C}$ (▲), $30\text{ }^\circ\text{C}$ (●) e $35\text{ }^\circ\text{C}$ (◆).



Na Figura 1 é possível verificar que para todos os sistemas avaliados, obtiveram-se valores de $K_p > 1,0$, indicando que as proteínas se concentraram preferencialmente na fase superior dos sistemas, rica em PEG ou álcool. Nos SAB formados por PEG/sal (Figuras 1A e 1B), observa-se uma tendência de acréscimo no valor de K_p à medida que o valor de CLA aumenta. O comprimento da linha de amarração (CLA) é um parâmetro termodinâmico que relaciona a diferença de composição, em termos de concentração mássica dos componentes 1 e 2, nas fases superior e inferior, em uma condição fixa de temperatura e pressão. O aumento do CLA indica um aumento na diferença de concentração dos componentes nas fases e conseqüentemente, aumenta-se a diferença entre as propriedades termodinâmicas intensivas de cada fase (DA SILVA; LOH, 2006; PEI et al., 2009). Assim, o comportamento supracitado sugere interações favoráveis entre o polímero e a proteína. Observa-se ainda que os maiores valores de K_p ocorreram nos sistemas formados pelo polímero de maior massa molar (SAB PEG 6000/sal). Esses resultados podem estar associados a combinação de dois fatores: a habilidade *salting-out* do sal K_2HPO_4/H_3PO_4 , que possivelmente foi aumentada com o aumento da concentração de sal no sistema (Tabela 1), resultando em forte interação dos íons salinos com as moléculas de água no sistema e expulsão de maior quantidade de moléculas de proteína da fase salina (inferior) para a fase oposta (Apêndices A e B). Segundo Goja et al. (2013) em SAB constituídos por PEG de baixa massa molar e sal, o aumento do CLA potencializa a habilidade *salting-out* da fase salina, devido ao aumento da concentração de sal, direcionando a transferência da proteína para a fase superior rica em PEG. Além disso, de acordo com Asenjo e Andrews (2011), o fato de as proteínas a serem particionadas no SAB possuírem tamanho (peso molecular e diâmetro hidrodinâmico) e geometria (conformação tridimensional) definidos, deixa-as expostas aos efeitos estéricos impostos pelos constituintes do sistema. Tais efeitos estéricos estão tipicamente relacionados ao volume disponível para os solutos serem fracionados em uma fase particular e são geralmente conhecidos como efeito de volume livre. Possivelmente, o aumento da hidrofobicidade do PEG (PEG 6000 > PEG 4000) pode ter promovido o aumento da exclusão das moléculas de água na fase polimérica, resultando no aumento da quantidade de espaços vazios disponíveis para o alojamento das proteínas.

Em relação aos sistemas formados por 2-propanol/sal, verifica-se na Figura 1C, que o aumento da concentração dos componentes (sal e álcool) no sistema promoveu a redução da preferência da proteína pela fase rica em álcool. Isto é, o aumento no valor de

CLA resultou na redução do valor de K_p , sendo esse comportamento mais pronunciado na linha de amarração de maior comprimento, nas temperaturas de 20 e 25 °C, nas quais os valores de coeficiente de partição são muito próximos de 1,0. Sendo a distribuição de biomoléculas entre as fases de um SAB, o resultado de um balanço delicado e complexo de interações entre as proteínas e os componentes formadores (macromoléculas ou solventes, eletrólitos e água) das duas fases que coexistem em equilíbrio (LUECHAU et al., 2010), entende-se que o *CLA* é uma variável importante a ser considerada no processo de partição. Possivelmente, o aumento da concentração do 2-propanol na fase superior, resultou em um aumento na energia de auto-interação do álcool, resultando em maior interação álcool-álcool e expulsão de maior quantidade de proteína para a fase oposta, onde essas conseguiriam interagir com o sal por meio de interações eletrostáticas.

A Figura 2 mostra que, embora os valores de K_p indiquem uma maior migração das proteínas para a fase superior, a maior atividade lipolítica ocorreu na fase salina, indicando que a LPP permaneceu em maior concentração na fase inferior ($K_e < 1$) da maior parte dos sistemas estudados, exceto para as linhas de amarração 4 e 5 do SAB PEG 6000/sal, em todas as temperaturas e a de maior comprimento na temperatura de 35 °C do SAB PEG 4000/sal. Segundo Mendes et al. (2012) soluções salinas de sais inorgânicos, a exemplo dos sais de potássio, constituem um ambiente ameno para manutenção da atividade enzimática da lipase, por interagirem com a biomolécula por ligações mais fracas (interações eletrostáticas). Por esse motivo sais de potássio são preferíveis na partição da lipase frente aos sais de sódio e de amônio (Goja et al., 2013). Sendo assim, verifica-se que os SAB formados por PEG/sal e 2-propanol/sal apresentam elevado potencial na separação da lipase dentre essas proteínas.

Comportamento similar foi reportado por Zhou e colaboradores (2013) ao estudar a partição da lipase LPP em SAB formados por PEG (1000, 1500 e 4000 g·mol⁻¹) e fosfato de potássio pH 7,0 a 25°C. Os autores encontraram valores de coeficiente de partição de proteína (K_p) > 1,0 e coeficiente de partição de atividade enzimática (K_e) < 1,0 em linhas de amarração formadas a partir de concentrações globais de sal e PEG muito próximas das utilizadas no presente trabalho.

É possível observar uma tendência de aumento dos valores de K_e com o aumento da *CLA*. Tal resultado pode ser novamente explicado pelo efeito *salting-out* do K_2HPO_4/H_3PO_4 . À medida que a concentração de sal aumenta nas fases, ocorre uma maior interação íon-água, reduzindo as interações íon-enzima e promovendo migração da

biomolécula para fase oposta. Tal resultado indica que o aumento da composição global do sistema ocasiona a redução da seletividade do SAB e a distribuição se torna menos desigual. Dessa forma, é preferível a utilização de menores concentrações de PEG/sal ou álcool/sal para a separação da LPP.

3.2. Estudo dos parâmetros termodinâmicos de transferência

A distribuição de uma biomolécula entre as fases de um sistema aquoso bifásico está associada a variações entálpicas e entrópicas associadas ao processo de transferência. Foi verificado que, apesar de as proteínas contaminantes presentes na LPP apresentarem maior afinidade com a fase superior, rica em polímero, a lipase particionou preferencialmente para fase salina. Essa tendência de comportamento foi predominante em todas as condições de estudo avaliadas. A partição da LPP e das outras proteínas contaminantes pode ser melhor compreendida por meio do estudo dos parâmetros termodinâmicos de transferência ($\Delta_{tr}G$, $\Delta_{tr}H$ e $\Delta_{tr}S$), os quais estão apresentados nas Tabelas 3- 5.

A distribuição preferencial de uma biomolécula em um SAB deve ser compreendida em termos das interações intermoleculares que ocorrem entre os componentes formadores do sistema entre si e com a molécula-alvo no processo de transferência, bem como das possibilidades de distribuição do soluto de interesse nas fases. Essas contribuições são expressas no parâmetro denominado energia livre de Gibbs de transferência ($\Delta_{tr}G$) representa a variação da energia livre de Gibbs do sistema quando um mol de lipase é transferido da fase superior para a fase inferior do sistema.

Nas Tabelas 3 e 4, observa-se $\Delta_{tr}G$ é negativo em todas as condições de estudo avaliadas, indicando que a concentração preferencial das proteínas nas fases superior contribui para a minimização da energia livre do SAB. Esse comportamento sugere que as interações existentes entre as proteínas e os componentes da fase superior e íons-água são mais favoráveis do que as interações existentes entre essas com fase a salina. O aumento no *CLA* resulta na redução no valor de $\Delta_{tr}G$ (devido ao aumento de K_p) uma vez que, acréscimos nos valores de *CLA* é consequência do aumento da composição global do sistema e, logo, do componente com o qual as proteínas interagem mais favoravelmente (polímero ou álcool na fase superior) (CASTRILLON et al., 2020).

Tabela 3. Parâmetros termodinâmicos de transferência das proteínas totais nos SAB formados por PEG (4000 ou 6000) + K₂HPO₄/H₃PO₄ + água em diferentes temperaturas (20, 25, 30 e 35) °C.

LA	$\Delta_{tr}G/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta_{tr}H/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$T\Delta_{tr}S/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta_{tr}G/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta_{tr}H/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$T\Delta_{tr}S/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
PEG 4000			PEG 6000			
20 °C						
1	-1,873	-67,814	-65,941	-1,068	22,331	23,399
2	-2,249	-23,470	-21,221	-1,196	77,442	78,638
3	-2,858	-53,438	-50,581	-1,817	-3,892	-2,074
4	-2,892	-43,386	-40,494	-3,761	-63,828	-60,068
5	-3,220	-57,790	-54,570	-4,042	-39,325	-35,283
25 °C						
1	-0,977	-20,337	-19,360	-1,487	9,745	11,232
2	-1,868	-8,974	-7,106	-2,372	37,284	39,656
3	-1,894	-20,163	-18,269	-2,706	28,920	31,626
4	-2,018	-16,606	-14,588	-2,819	-29,605	-26,786
5	-2,146	-23,703	-21,557	-3,606	-34,009	-30,402
30 °C						
1	-1,261	25,574	26,836	-1,315	-2,426	-1,110
2	-2,004	5,045	7,049	-2,332	-1,549	0,783
3	-2,361	12,015	14,376	-2,388	60,649	63,037
4	-2,529	9,291	11,820	-2,850	3,489	6,340
5	-2,630	9,259	11,889	-2,821	-28,868	-26,047
35 °C						
1	-1,846	69,996	71,841	-1,343	-14,201	-12,859
2	-2,075	18,608	20,683	-2,238	-39,122	-36,884
3	-2,429	43,149	45,578	-4,294	91,348	95,642
4	-2,481	34,347	36,828	-2,990	35,510	38,500
5	-2,615	41,151	43,766	-2,595	-23,893	-21,298

Tabela 4. Parâmetros termodinâmicos de transferência das proteínas totais nos SAB formados por 2-propanol + K₂HPO₄/H₃PO₄ + água em diferentes temperaturas (20, 25, 30 e 35) °C.

LA	$\Delta_{tr}G/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta_{tr}H/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$T\Delta_{tr}S/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta_{tr}G/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta_{tr}H/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$T\Delta_{tr}S/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
	20 °C			25 °C		
1	-4,180	-52,610	-48,431	-3,821	-15,869	-12,048
2	-3,990	-36,978	-32,988	-3,488	-16,409	-12,921
3	-3,916	-36,988	-33,072	-3,283	-23,928	-20,645
4	-3,243	-64,623	-61,380	-2,124	-26,305	-24,181
5	-1,347	0,228	1,575	-1,034	20,456	21,490
	30 °C			35 °C		
1	-3,520	19,661	23,181	-4,325	54,038	58,362
2	-3,468	3,482	6,949	-3,615	22,727	26,342
3	-3,185	-11,299	-8,114	-2,976	0,920	3,896
4	-2,546	10,749	13,295	-2,622	46,601	49,223
5	-2,272	40,016	42,288	-2,537	58,942	61,479

Sabendo que o valor de ($\Delta_{tr}G$) é composto pelas variações de entalpia e entropia associadas ao processo de distribuição da biomolécula nas fases, a análise das contribuições entálpica ($\Delta_{tr}H$) e entrópica ($\Delta_{tr}S$) é necessária para entender as forças que governam a distribuição da biomolécula nas fases de um SAB. Em todos os sistemas estudados, é possível observar que os termos $\Delta_{tr}H$ e $\Delta_{tr}S$ possuem a mesma magnitude e possuem valor absoluto relativamente próximos, o que explica os baixos valores de $\Delta_{tr}G$.

Nos SAB formados por PEG 4000/sal a 20 e 25°C, verifica-se que a partição das proteínas contaminantes para a fase superior dos sistemas é entalpicamente dirigida ($\Delta_{tr}H$ e $\Delta_{tr}S < 0$), entretanto, com o aumento da temperatura (30 e 35 °C), o processo de transferência passa a ser favorecido por contribuições de natureza entrópica, possivelmente devido ao aumento da quantidade de moléculas de água na fase salina (maior densidade numérica), o que implica em um maior número de possibilidades de organização configuracional. No SAB formado por PEG 6000/sal, verifica-se que nas temperaturas mais baixas (20 e 25 °C) a partição das proteínas para a fase polimérica é entropicamente dirigida nos menores valores de *CLA*, e à medida que a composição dos sistemas aumenta, torna-se entalpicamente dirigida. Enquanto que nas temperaturas mais elevadas (30 e 35 °C), o termo entrópico é dominante no processo de partição apenas nas linhas de amarração 3 e 4 (valores intermediários de concentração dos componentes).

Nos SAB formados por 2-propanol/sal, verifica-se que nas temperaturas mais baixas (20 e 25 °C), a partição das proteínas foi entalpicamente dirigida, excepto na última linha de amarração. E, nas maiores temperaturas, entropicamente dirigida. Esse comportamento foi constante em todas as linhas de amarração dos SAB em 30 e 35 °C. O aumento da concentração de álcool na fase superior pode ter ocasionado um aumento nas forças intra e intermoleculares do solvente (auto-energia) na fase. Assim, a maior interação álcool-álcool, resulta no aumento da migração de moléculas de proteína para fase salina ($\Delta_{tr}G < 0$), onde existe maior possibilidade destas se distribuírem, devido a maior quantidade de água. Logo, ocorre um aumento de entropia no sistema.

Tabela 5. Parâmetros termodinâmicos de transferência da lipase em SAB formados por PEG (4000 ou 6000) + K₂HPO₄/H₃PO₄ + água em diferentes temperaturas (20, 25, 30 e 35) °C.

LA	$\Delta_{tr}G/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta_{tr}H/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$T\Delta_{tr}S/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta_{tr}G/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta_{tr}H/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$T\Delta_{tr}S/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
PEG 4000			PEG 6000			
20 °C						
1	6,765	-3,224	-9,989	5,030	217,805	212,775
2	5,411	54,512	49,101	1,113	13,100	11,987
3	3,701	44,285	40,584	1,629	31,998	30,369
4	2,342	40,748	38,406	-0,067	3,371	3,438
5	1,131	22,193	21,062	-0,473	24,769	25,242
25 °C						
1	7,005	77,925	70,801	2,374	74,336	71,962
2	5,886	93,126	87,139	0,420	-20,819	-21,239
3	3,496	61,992	58,436	0,894	24,274	23,381
4	1,959	40,619	38,627	0,074	23,634	23,560
5	0,687	29,200	28,502	-0,723	22,618	23,342
30 °C						
1	3,901	156,398	152,496	2,722	-64,400	-67,123
2	1,487	130,467	128,980	2,268	-53,619	-55,887
3	1,341	79,115	77,774	1,007	16,805	15,798
4	0,869	40,495	39,626	-1,067	43,228	44,296
5	0,185	35,976	35,791	-1,350	20,538	21,888
35 °C						
1	1,717	232,323	230,606	4,664	-198,635	-203,299
2	0,955	166,596	165,641	2,606	-85,354	-87,961
3	0,679	95,683	95,003	0,498	9,579	9,080
4	0,547	40,374	39,827	-1,550	62,187	63,737
5	-0,474	42,532	43,006	-1,519	18,525	20,044

Tabela 6. Parâmetros termodinâmicos de transferência da lipase em SAB formados por 2-propanol + K₂HPO₄/H₃PO₄ + água em diferentes temperaturas (20, 25, 30 e 35) °C.

LA	$\Delta_{tr}G/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta_{tr}H/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$T\Delta_{tr}S/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta_{tr}G/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta_{tr}H/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$T\Delta_{tr}S/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
	20 °C			25 °C		
1	4,812	287,000	282,188	3,382	41,877	39,739
2	3,385	299,941	296,556	1,822	47,569	47,249
3	1,702	127,846	126,144	1,507	9,923	9,644
4	1,205	38,936	37,731	1,197	2,968	2,231
5	0,276	-75,145	-75,421	2,207	-51,441	-52,523
	30 °C			35 °C		
1	3,382	-195,159	-198,542	8,602	41,877	33,275
2	1,822	-196,478	-198,301	6,868	47,569	40,701
3	1,507	-104,111	-105,618	3,858	9,923	6,065
4	1,197	-31,813	-33,009	1,876	2,968	1,092
5	2,207	-28,520	-30,726	2,227	-51,441	-53,669

Nas Tabelas 5 e 6, é possível observar que nos SAB formados por PEG 4000/sal e 2-propanol/sal, o valor de $\Delta_{tr}G$ é positivo, evidenciando que, nesses sistemas, a partição da lipase para a fase inferior é termodinamicamente favorável e ocorre devido à ausência de afinidade dessa enzima com a fase superior, rica em polímero ou álcool, exceto na linha de amarração 5 SAB formado por PEG 4000 na temperatura de 35°C, em que $\Delta_{tr}G < 0$ e $Ke \approx 1,0$ (Figura 1A). Em ambos os sistemas (PEG 4000/sal e 2-propanol/sal), verifica-se que o valor de $\Delta_{tr}G$ se torna menor com o aumento do *CLA*, indicando que o aumento da composição global dos sistemas contribui para minimização da energia livre de transferência da lipase. Tal comportamento, entretanto, divergiu na linha de amarração 5 dos SAB formados por álcool nas temperaturas de 25, 30 e 35°C, condições nas quais houve novamente aumento da concentração de atividade lipolítica na fase salina, porque a elevada concentração de álcool na fase superior ocasionou a redução da atividade enzimática na fase.

No SAB formado por PEG 6000/sal, observa-se que o $\Delta_{tr}G$ assume valores negativos nos maiores valores de *CLA*. Tal comportamento pode ser consequência do aumento da afinidade da lipase pela fase formada pelo polímero de maior hidrofobicidade e fortalecimento das interações íons-água (efeito *salting-out*) acarretando na migração espontânea da lipase para fase superior rica em PEG 6000.

Em relação aos termos que contribuem para minimização de $\Delta_{tr}G$ verifica-se que nos sistemas formados por PEG/sal, ambos os parâmetros ($\Delta_{tr}H$ e $\Delta_{tr}S$) assumiram predominantemente valores positivos, exceto em algumas linhas de amarração pontuais e $\Delta_{tr}H > \Delta_{tr}S$, sugerindo assim que o processo de transferência da LPP da fase superior para a fase salina tende a ser entalpicamente dirigido, isto é, movido pelas interações componente-componente (SAB), componente-proteína e proteína-proteína. No SAB formado por 2-propanol/sal, o comportamento de transferência foi semelhante ao observado nos sistemas formados por PEG, exceto nos sistemas formados na temperatura de 30 °C, onde a partição da enzima foi entropicamente dirigida.

Sendo a partição da lipase e as forças motrizes que governam a sua transferência, no foco principal do presente estudo, realizou-se uma análise mais detalhada a respeito de como os termos $\Delta_{tr}H$ e $\Delta_{tr}S$ são influenciados pela composição dos sistemas. A variação de entalpia existente no processo de transferência de um mol do soluto de interesse entre as fases do SAB representa o somatório resultante das interações intermoleculares destruídas e formadas durante a sua distribuição nas fases e envolve as interações do

soluto com cada componente formador do sistema, totalizando quatro pares de interação (MAGESTE et al., 2012; ALCÂNTARA et al., 2014). Portanto, a variação da entalpia associada ao processo de transferência da lipase pode ser representada conforme mostra a Equação 13:

$$\Delta_{tr}H = \Delta H_{PR-S} + \Delta H_{A-S} + \Delta H_{PR-P} + \Delta H_{A-P} \quad (13)$$

Em que ΔH_{i-j} representa a entalpia de interação entre os componentes i e j . Esses componentes são água (A), PEG ou 2-propanol (P), sal (S) e proteína (PR). No processo de transferência da lipase da fase superior (rica em PEG ou álcool) para a fase inferior (rica em sal), formam-se interações água-PEG ou água-álcool (ΔH_{PR-S}) e proteína-sal (ΔH_{A-P}) promovendo liberação de energia, dessa forma os termos ΔH_{PR-S} e ΔH_{A-P} contribuem para redução da entalpia total do sistema. Enquanto que os termos ΔH_{PR-P} e ΔH_{A-S} , que representam as interações desfeitas entre proteína-PEG ou proteína-álcool e água-sal, contribuem para o aumento da entalpia do sistema. Baseado nos valores positivos de $\Delta_{tr}H$, é possível se obter a seguinte relação para os termos representantes da interação do par ij :

$$|\Delta H_{A-S} + \Delta H_{PR-P}| > |\Delta H_{PR-S} + \Delta H_{A-P}| \quad (14)$$

Na maioria dos sistemas formados por PEG/sal, foi verificado uma tendência de redução do valor de $\Delta_{tr}H$ com o aumento de CLA , tornando o processo de transferência da lipase, da fase polimérica para a fase salina, mais espontâneo. Uma vez que a variação de entalpia do processo depende tanto da interação molecular proteína-componentes quanto da auto-energia das fases, pode-se inferir que o aumento da concentração de sal na fase inferior promove o aumento no número de interações moleculares proteína-sal, resultando em maior liberação de energia, em outras palavras, o termo ΔH_{PR-S} diminui. Além disso, ocorre também o aumento da auto-energia da fase salina devido ao aumento da concentração de sal nessa fase e de PEG na fase inferior, que ocasiona a migração de maior quantidade de moléculas de água para a fase salina devido ao aumento tanto da habilidade *salting-out* do K_2HPO_4/H_3PO_4 na fase inferior, quanto da hidrofobicidade da fase superior. Consequentemente ΔH_{A-S} diminui, já que mais energia é liberada na formação das novas interações água-sal, e ΔH_{A-P} , aumenta, devido à quebra das ligações água-PEG, favorecendo assim, a partição da lipase para a fase inferior rica em sal.

A contribuição entrópica ($\Delta_{tr}S$) se refere às possibilidades de rearranjo dos componentes presentes no sistema que ocorre devido à transferência de moléculas da lipase da fase superior para a fase inferior. A Equação (15) expressa a variação total de entropia do sistema causado pelo processo de transferência de cada componente presente no SAB.

$$\Delta_{tr}S = \Delta S_p + \Delta S_{Comp} \quad (15)$$

Em que: ΔS_p representa a variação da entropia devido a transferência das moléculas de lipase de uma fase para outra e ΔS_{Comp} , a variação da entropia devido a transferência dos componentes (PEG ou álcool, sal e água) que se deslocam simultaneamente entre as fases durante o processo de transferência da enzima.

Na maioria dos sistemas estudados, verifica-se uma tendência de redução nos valores de ($T\Delta_{tr}S$) mediante ao aumento do *CLA*, exceto nos sistemas formados por 2-propanol/sal (30°C), onde foi verificado que o valor de $T\Delta_{tr}S$ tornou menos negativo com o aumento da concentração dos constituintes, isto é, um aumento na variação de entropia. Segundo Johansson e colaboradores (1998), durante o processo de partição, a entropia do sistema é aumentada quando a proteína migra de uma fase com menor densidade numérica para a fase com maior densidade numérica, sendo o SAB constituído majoritariamente por água, a densidade numérica das fases está associada a quantidade de moléculas de água presentes no meio. Dessa forma, a fase de maior densidade numérica é a fase onde há maior concentração de água. Para os SAB estudados, refere-se a fase salina. Sendo assim, a análise da Equação 15 possibilita afirmar que o termo ΔS_p possui uma contribuição negativa, uma vez que a lipase migrou preferencialmente para a fase inferior dos sistemas, rica em sal. Enquanto que o termo ΔS_{Comp} , contribui positivamente a variação de entropia de transferência, já que as espécies químicas (íons salinos e água), cujas as interações são quebradas na fase inferior devido à chegada da lipase, irão migrar para uma região de menor densidade numérica, diminuindo a entropia configuracional do sistema.

3.3. Avaliação da eficiência de extração da lipase nos SAB

Afim de avaliar a eficiência dos SAB formados por PEG/sal e 2-propanol/sal como uma técnica de purificação da lipase pancreática de porco, determinou-se os parâmetros,

índice de recuperação teórica (% Y), fator de purificação (FP) e seletividade (S), os quais estão representados na Tabela 7.

Tabela 7. Índice de recuperação teórica (%Y), fator de purificação (FP) e Seletividade (S) dos SAB formados por PEG (4000 e 6000) + K₂HPO₄/H₃PO₄ + água e 2-propanol +K₂HPO₄/H₃PO₄ + água em diferentes temperaturas.

LA	%Y	FP	S	%Y	FP	S	%Y	FP	S
	PEG 4000			PEG 6000			2-Propanol		
20 °C									
1	94,134	3,219	0,029	88,732	0,532	0,082	87,805	1,772	0,025
2	90,202	4,391	0,043	61,224	0,159	0,388	80,037	3,705	0,049
3	82,031	1,004	0,068	66,182	1,775	0,242	66,781	1,532	0,100
4	72,326	0,552	0,117	49,315	0,313	0,220	62,115	4,792	0,161
5	61,395	1,950	0,168	45,161	0,742	0,231	52,833	0,522	0,514
25 °C									
1	94,655	4,356	0,038	72,263	0,420	0,209	70,322	1,662	0,088
2	91,797	4,001	0,042	54,229	0,275	0,319	53,221	1,341	0,210
3	80,757	3,125	0,110	58,915	0,330	0,230	52,811	1,208	0,232
4	69,076	1,725	0,196	50,744	1,048	0,305	57,377	1,604	0,311
5	56,998	0,779	0,313	42,755	0,526	0,305	60,739	0,971	0,423
30 °C									
1	82,461	2,157	0,127	74,650	0,798	0,198	79,279	1,689	0,062
2	63,014	1,478	0,258	71,091	0,929	0,156	67,327	0,596	0,117
3	64,416	1,001	0,210	59,857	0,938	0,252	64,516	1,475	0,149
4	59,031	1,527	0,246	39,568	0,396	0,474	61,651	1,047	0,219
5	51,830	0,532	0,316	36,923	0,263	0,537	70,588	0,808	0,164
35 °C									
1	66,156	2,995	0,240	86,061	1,170	0,093	96,635	7,431	0,006
2	59,211	1,141	0,294	73,445	1,713	0,144	93,586	8,339	0,016
3	56,591	0,637	0,283	54,848	0,694	0,141	81,842	11,054	0,065
4	55,322	0,667	0,292	35,319	1,013	0,537	67,528	1,366	0,164
5	45,385	0,754	0,412	35,598	0,469	0,624	70,462	0,732	0,148

Nos sistemas avaliados no presente trabalho, os valores de %Y oscilaram entre 35,32-96,64%. O índice de recuperação (%Y) é um parâmetro que mensura o quanto que a fase cuja a biomolécula migrou preferencialmente foi capaz de concentra-la em relação ao teor total de proteína adicionada inicialmente no SAB. Em outras palavras, %Y corresponde ao rendimento de extração da lipase. Na literatura sobre SAB, os valores de recuperação de enzimas e proteínas varia de 60-90% (JARA E PILOSOFF, 2011; RUIZ-RUIZ ET AL., 2012).

Nos SAB constituídos por PEG/sal, as variáveis CLA, temperatura e massa molar do polímero exerceram influência nos valores de %Y. Observa-se que o aumento do CLA reduziu o rendimento da extração. Além disso, tanto o aumento da temperatura quanto o aumento da massa molar do PEG promoveram redução na eficiência da recuperação da lipase. No entanto, nos sistemas formados por 2-propanol/sal não foi observado efeito marcante da temperatura. Nesses sistemas formados por álcool e sal, verificou-se que a 20°C, Y% foi reduzido com o aumento do CLA. Nas outras temperaturas estudadas, o comportamento divergiu, indicando decréscimos nos valores %Y apenas até a quarta linha de amarração. A análise da Tabela 6 ainda permite verificar que os SAB formados por PEG/sal apresentaram maiores índices de recuperação teórica quando comparados com o SAB 2-propanol/sal. De acordo com de Medeiros e Silva e colaboradores (2013), SAB formados por PEG/sal tendem a apresentar elevados valores de recuperação teórica devido a forma como o PEG interage com as moléculas de proteína/enzima, sem que ocorra alterações na sua conformação que possa ocasionar redução ou inibição da sua atividade. A elevada concentração de álcool na fase superior dos sistemas formados por 2-propanol/sal, resultou em perda parcial da atividade lipolítica (Apêndice C), reduzindo assim o percentual de rendimento de extração da enzima.

Foram verificados valores distintos para o fator de purificação (FP) dos sistemas utilizados e ausência de um comportamento padrão, variando entre os valores 0,263 e 11,054, para as linhas de amarração 5 do sistema PEG 6000/sal a 30 °C e 3 do sistema 2-propanol/sal 35 °C, respectivamente. O FP mensura o quanto foi possível purificar a lipase presente no concentrado enzimático comercial na fase salina. Esse parâmetro é dependente das condições do meio e da afinidade da lipase por uma das fases.

Para que a utilização dos SAB como técnica de extração/purificação da lipase seja considerada interessante, o sistema deve ser capaz de direcionar maior parte da enzima para a fase oposta de onde os contaminantes estão concentrados, essa capacidade de separação pode ser avaliada pelo parâmetro seletividade (S). Quanto mais distante de 1, maior a seletividade do sistema. Foram verificados valores de S menor que a unidade em todas as condições estudadas (0,06-0,624), indicando elevada seletividade dos sistemas. Esses valores reafirmam que a

escolha adequada dos componentes formadores do SAB é determinante para a eficiência do processo de separação. De modo geral, o aumento de CLA acarretou no aumento dos valores de S , o que sugere redução da seletividade dos sistemas.

Em uma análise geral das condições estudadas, pode-se inferir que o melhor sistema para a partição da lipase pancreática de porco é o SAB formado por 13% de PEG 4000 e 9% de K_2HPO_4/H_3PO_4 (LA 1) na temperatura de 25 °C, o qual apresentou $K_e = 0,056$ e $S = 0,038$, indicando elevada capacidade da fase salina concentrar a lipase e 94,655% e 4,357, para a recuperação teórica e o fator de purificação, que foram os maiores valores encontrados para esses parâmetros.

4. CONCLUSÃO

O estudo dos parâmetros termodinâmicos ($\Delta_{tr}G$, $\Delta_{tr}H$ e $\Delta_{tr}S$) é importante para auxiliar o entendimento acerca das forças motrizes envolvidas na partição de biomoléculas em sistemas aquosos bifásicos. verificou-se que os SAB formados por PEG/sal e 2-propanol/sal apresentam elevado potencial na separação da lipase pancreática de porco. O melhor sistema para a partição da LPP foi o SAB formado por 13% de PEG 4000 e 9% de K_2HPO_4/H_3PO_4 (LA 1) na temperatura de 25 °C, o qual apresentou $K_e = 0,056$, indicando elevada capacidade da fase salina concentrar a lipase e 94,655% e 4,357, para a recuperação teórica e o fator de purificação, respectivamente, que foram os maiores valores encontrados para esses parâmetros. Nessas condições, a migração preferencial da lipase para a fase salina foi movida por contribuições entálpicas, isto é, foi resultado da forte interação enzima-sal que foi maior que a interação proteína-PEG.

5. REFERÊNCIAS

- ALCÂNTARA, L. H. M.; AMARAL, I. V.; BONOMO, R. C. F.; DA SILVA, L. H. M.; DA SILVA, M. C. H.; MINIM, V. P. R.; MINIM, L. A. Partitioning of α -lactalbumin and β -lactoglobulin from cheese whey in aqueous two-phase systems containing poly (ethylene glycol) and sodium polyacrylate. **Food and Bioproducts Processing**, v. 92, p. 409-415, 2014.
- ALHELLI, A. M., MANAP, M. Y. A, MOHAMMED, A. S., MIRHOSSEINI, S, H., SHAD, E. S. Z., MOHAMMED, N., K., HUSSIN, A. S. M., Use of Response Surface Methodology for Partitioning, One-Step Purification of Alkaline Extracellular Lipase from *Penicillium candidum* (PCA 1/TT031), **Journal of Chromatography B**, v. 16, p. 31121-31127, 2016.
- ANVARI, M. Extraction of lipase from *Rhizopus microspores* fermentation culture by aqueous two-phase partitioning. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 29, p. 723-731, 2015.
- ASENJO, J. A.; ANDREWS, B. A. Aqueous two-phase systems for protein separation: A perspective. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 8826-8835, 2011.
- BHARATHI, D.; RAJALAKSHMI, G. Microbial lipases: An overview of screening, production and purification. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.22, p. 101368-101404, 2019.
- CARVALHO, T.; FINOTELLI, P. V.; BONOMO, R. C. F.; FRANCO, M.; AMARAL, P. F. F. Evaluating Aqueous Two-Phase Systems for *Yarrowia Lipolytica* Extracellular Lipase Purification. *Process Biochemistry*, v. 53, p. 259–266, 2017.
- CASTIGLIONI, G. L.; COSTA, J. A. V.; ALEGRE, R. M. Estudo da produção de lipase por *Burkholderia cepacia*. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 23, n. 4, p. 637-644, 2018.
- DA SILVA, L. H. M.; LOH, W. Sistemas Aquosos Bifásicos: Fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. **Química Nova**, v. 29, p. 1345- 1351, 2006.
- DE MEDEIROS E SILVA, G. M., MARQUES, D. A. V., PORTO, T. S., LIMA FILHO, J. L., TEXEIRA, J. A. C., PESSOA-JÚNIOR, A., PORTO, A. L. F. Fluid Phase Equilibria Extraction of fibrinolytic proteases from *Streptomyces* sp. DPUA1576 using PEG-phosphate aqueous two-phase systems. **Fluid Phase Equilibria**, v. 339, p. 52–57, 2013.

- DOBREVA, V.; ZHEKOVA, B.; DOBREV, G. Use of Aqueous Two-Phase and Three-Phase Partitioning Systems for Purification of Lipase Obtained in Solid-State Fermentation by *Rhizopus Arhizus*. **The Open Biotechnology Journal**, v. 13 (1), p. 27–36, 2019.
- DUARTE, A. W. F., LOPES, A. M., MOLINO, J. V. D., PESSOA, A., SETTE, L. D. Liquid–liquid extraction of lipase produced by psychrotrophic yeast *Leucosporidium scottii* L117 using aqueous two-phase systems. **Separation and Purification Technology**, v. 156, p. 215-225, 2015.
- GOJA, A. M., YANG, H., CUI, M., LI, C. Aqueous Two-Phase Extraction Advances for Bioseparation. **Journal of Bioprocessing & Biotechniques**, v. 4, p.1-8, 2013.
- JAVED, S.; AZEEM, F.; HUSSAIN, S.; RASUL, I.; SIDDIQUE, M. H.; RIAZ, M.; AFZAL, M.; KOUSER, A.; NADEEM, H. Bacterial lipases: A review on purification and characterization. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 132, p. 23-34, 2018.
- JOHANSSON, H.-O.; KARLSTRÖM, G.; TJERNELD, F.; HAYNES, C. A. Driving forces for phase separation and partitioning in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**, 711, 3-17, 1998.
- LUECHAU, F.; LING, T. C.; LYDDIATT, A. Two-step process for initial capture of plasmid DNA and partial removal of RNA using aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1432-1436, 2010.
- MAGESTE, A. B.; SENRA, T. D. A.; DA SILVA, M. C. H.; BONOMO, R. C. F.; DA SILVA, L. H. M. Thermodynamics and optimization of norbixin transfer processes in aqueous biphasic systems formed by polymers and organic salts. **Separation and Purification Technology**, v. 98, p. 69-77, 2012.
- MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; de CASTRO, F. H.; Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 78, p. 119-134, 2012.
- NADAR, S. S.; PAWAR, R. G.; RATHOD, V. K. Recent Advances in Enzyme Extraction Strategies: A Comprehensive Review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 101, p. 931–957, 2017.

PEI, Y. C.; EANG, J.; WU, K.; XUAN, X.; LU, X. Ionic liquid-based aqueous two-phase extraction of selected proteins. *Separation and Purification Technology*, v. 64, p. 288–295, 2009.

PENIDO, J. A.; MAGESTE, A. B.; MARTINS, P. L.; FERREIRA, G. M. D. Surfactant as Selective Modulator in the Partitioning of Dyes in Aqueous Two-Phase Systems: A Strategy for Separation. ***Journal of Molecular Liquids***, v. 293, p. 1-8, 2019.

RAMAKRISHNAN, V.; GOVEAS, L. C.; SURALIKERIMATH, N.; JAMPANI, C.; HALAMI, P. M.; NARAYAN, B. Extraction and Purification of Lipase from *Enterococcus Faecium* MTCC5695 by PEG/Phosphate Aqueous-Two Phase System (ATPS) and Its Biochemical Characterization. ***Biocatalysis and Agricultural Biotechnology***, v. 6, p. 19–27, 2016.

RIOS, S. N.; PINHEIRO, B. B.; PINHEIRO, M. P.; BEZERRA, R. M.; SANTOS, J. C. S.; GONÇALVES, L. R. B. Biotechnological potential of lipases from *Pseudomonas*: Sources, properties and applications. ***Process Biochemistry***, v. 75, p. 99-120, 2018.

RUIZ-RUIZ, F.; BENAVIDES, J.; AGUILAR, O.; RITO-PALOMARES, M. Aqueous two-phase affinity partitioning systems: Current applications and trends. ***Journal of Chromatography A***, v. 1244, p. 1-13, 2012.

SHOW, P. L., LING, T. C., LAN, J. C. W., TEY, B.T, RAMANAND, R.N., YONG, S.T., OOI, C. W. Review of Microbial Lipase Purification Using Aqueous Two-phase Systems, ***Current Organic Chemistry***, v. 19, p. 19-29, 2015.

SOARES, C. M. F., DE CASTRO, H. F., MORAES, F. F., ZANIN, G. M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica, ***Applied Biochemistry and Biotechnology***, v. 79, p. 745-758, 1999.

SOUSA, R. DE C. S.; PEREIRA, M. M.; FREIRE, M. G.; COUTINHO, J. A. P. Evaluation of the Effect of Ionic Liquids as Adjuvants in Polymer-Based Aqueous Biphasic Systems Using Biomolecules as Molecular Probes. ***Separation and Purification Technology***, v. 196, p. 244–253, 2018.

ZHOU, Y. J.; HU, C. L.; WANG, N.; ZHANG, W. W.; YU, X. Q. Purification of Porcine Pancreatic Lipase by Aqueous Two-Phase Systems of Polyethylene Glycol and Potassium Phosphate. ***Journal of chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences***, v. 926, p. 77–82, 2013.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dados de equilíbrio de fases de sistemas aquosos bifásicos formados por PEG (4000 ou 6000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) + sal fosfato de potássio ou álcool (1-propanol ou 2-propanol) + sal fosfato de potássio e água foram determinados. Os dados experimentais das linhas de amarração foram utilizados para estimar os parâmetros de interação de grupo por meio do modelo UNIquac Functional Group Activity Coefficient (UNIFAC). Por meio da modelagem termodinâmica foi possível concluir que a partir das energias de interação, calculadas por meio dos parâmetros de interação binária dos pares formados entre os vários grupos de contribuição presentes nos SAB, é possível explicar o processo de formação de fase em termos de efeito das variáveis massa molar e tipo de álcool utilizado bem como, os parâmetros volume efetivo de exclusão e efeito *salting-out*. Os baixos valores de desvios entre as composições experimentais e calculadas pelo modelo indicam o bom ajuste do modelo aos dados experimentais. Além disso, também foi realizado um estudo dos parâmetros termodinâmicos associados ao comportamento de partição da lipase pancreática de porco (LPP) comercial em sistemas aquosos bifásicos formados por PEG (4000 e 6000) + $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ + água e 2-propanol + $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ + água em pH 7,0 e diferentes temperaturas (20, 25, 30 e 35 °C). Para avaliar a eficiência dos sistemas no processo de separação, foram determinados os parâmetros coeficientes de partição de proteínas (K_p) e de atividade enzimática (K_p), índice de recuperação teórica (%Y), fator de purificação (FP) e seletividade (S). Além disso, para auxiliar o entendimento das forças motrizes envolvidas na partição, determinou-se os parâmetros termodinâmicos de transferência ($\Delta_{tr}G$, $\Delta_{tr}H$ e $\Delta_{tr}S$). Utilizou-se a equação de Van't Hoff para calcular a variação de entalpia em função da temperatura. Verificou-se que os SAB formados por PEG/sal e 2-propanol/sal apresentam elevado potencial na separação da lipase pancreática de porco. O estudo dos parâmetros termodinâmicos ($\Delta_{tr}G$, $\Delta_{tr}H$ e $\Delta_{tr}S$) possibilitou um maior entendimento acerca das forças motrizes envolvidas na partição da lipase nos SAB utilizados.

APÊNDICE

Apêndice A. Teor de proteínas totais, atividade lipolítica, atividade enzimática específica da lipase pancreática de porco e coeficientes de partição de proteínas totais (Kp) e de atividade enzimática (Ke) nos SAB formados por PEG 4000 +K₂HPO₄/H₃PO₄ + água em diferentes temperaturas.

LA	Fase superior			Fase inferior			Kp	Ke
	Teor de proteínas totais (mg· ml ⁻¹)	Atividade lipolítica (U/mL)	Atividade específica (U/mg)	Teor de proteínas totais (mg· ml ⁻¹)	Atividade lipolítica (U/mL)	Atividade específica(U/mg)		
20 °C								
1	0,643 ± 0,017	4,100 ± 0,600	6,376 ± 0,309	0,298 ± 0,013	66,129 ± 0,098	221,910 ± 0,058	2,157 ± 0,086	0,062 ± 0,009
2	0,715 ± 0,010	3,800 ± 0,800	5,315 ± 0,045	0,284 ± 0,009	34,862 ± 0,426	122,753 ± 0,201	2,517 ± 0,043	0,109 ± 0,078
3	0,747 ± 0,010	3,200 ± 0,300	4,284 ± 0,158	0,232 ± 0,008	14,612 ± 0,093	63,017 ± 0,047	3,230 ± 0,064	0,219 ± 0,019
4	0,701 ± 0,037	4,350 ± 0,935	6,205 ± 0,458	0,215 ± 0,008	11,358 ± 0,108	52,828 ± 0,063	3,276 ± 0,050	0,383 ± 0,053
5	0,709 ± 0,010	3,900 ± 0,300	5,501 ± 0,166	0,189 ± 0,007	6,200 ± 0,247	32,804 ± 0,136	3,747 ± 0,093	0,629 ± 0,125
25 °C								
1	0,671 ± 0,007	3,713 ± 0,088	5,536 ± 0,048	0,450 ± 0,055	66,300 ± 0,300	147,333 ± 0,158	1,493 ± 0,009	0,056 ± 0,005
2	0,834 ± 0,023	4,539 ± 0,105	5,442 ± 0,069	0,416 ± 0,006	51,000 ± 0,700	122,596 ± 0,356	2,152 ± 0,051	0,089 ± 0,002
3	0,830 ± 0,014	9,603 ± 0,207	11,570 ± 0,110	0,382 ± 0,009	40,352 ± 0,950	105,633 ± 0,589	2,175 ± 0,016	0,238 ± 0,005
4	0,863 ± 0,023	10,369 ± 0,321	12,015 ± 0,178	0,413 ± 0,009	23,145 ± 1,067	56,041 ± 0,378	2,288 ± 0,075	0,448 ± 0,009
5	0,784 ± 0,026	7,125 ± 0,069	9,088 ± 0,048	0,355 ± 0,010	9,450 ± 0,450	26,620 ± 0,208	2,412 ± 0,039	0,754 ± 0,003

30 °C								
1	0,450 ± 0,005	4,314 ± 0,107	9,587 ± 0,178	0,269 ± 0,019	20,254 ± 0,051	75,294 ± 0,146	1,678 ± 0,093	0,213 ± 0,041
2	0,551 ± 0,010	7,135 ± 0,092	12,949 ± 0,287	0,242 ± 0,005	12,155 ± 0,150	50,227 ± 0,587	2,276 ± 0,033	0,587 ± 0,187
3	0,618 ± 0,070	4,152 ± 0,057	6,718 ± 0,100	0,203 ± 0,015	7,523 ± 0,904	37,059 ± 0,201	2,634 ± 0,147	0,552 ± 0,500
4	0,558 ± 0,024	6,975 ± 0,075	12,500 ± 0,325	0,178 ± 0,004	10,051 ± 0,601	56,466 ± 0,168	2,823 ± 0,082	0,694 ± 0,472
5	0,652 ± 0,011	3,630 ± 0,083	5,567 ± 0,087	0,170 ± 0,003	3,908 ± 0,090	22,988 ± 0,077	2,942 ± 0,007	0,929 ± 0,483
35 °C								
1	0,366 ± 0,007	9,068 ± 0,078	24,776 ± 0,093	0,166 ± 0,015	17,711 ± 0,010	106,693 ± 0,985	2,132 ± 0,139	0,512 ± 0,020
2	0,464 ± 0,012	5,388 ± 0,096	11,612 ± 0,115	0,198 ± 0,013	7,820 ± 0,205	39,495 ± 0,745	2,343 ± 0,091	0,689 ± 0,020
3	0,566 ± 0,035	5,540 ± 0,147	9,788 ± 0,095	0,211 ± 0,026	7,223 ± 0,145	34,232 ± 0,478	2,709 ± 0,185	0,767 ± 0,042
4	0,730 ± 0,032	4,970 ± 0,087	6,808 ± 0,487	0,264 ± 0,006	6,151 ± 0,097	23,299 ± 0,384	2,768 ± 0,172	0,808 ± 0,094
5	0,476 ± 0,045	4,516 ± 0,099	9,487 ± 0,512	0,146 ± 0,010	3,754 ± 0,458	25,712 ± 0,195	2,923 ± 0,398	1,203 ± 0,228

Apêndice B. Teor de proteínas totais, atividade lipolítica, atividade enzimática específica da lipase pancreática de porco e coeficientes de partição de proteínas totais (Kp) e de atividade enzimática (Ke) nos SAB formados por PEG 6000 +K₂HPO₄/H₃PO₄ + água em diferentes temperaturas.

LA	Fase superior			Fase inferior			Kp	Ke
	Teor de proteínas totais (mg· ml ⁻¹)	Atividade lipolítica (U/mL)	Atividade específica (U/mg)	Teor de proteínas totais (mg· ml ⁻¹)	Atividade lipolítica (U/mL)	Atividade específica (U/mg)		
20 °C								
1	0,496 ± 0,016	0,743 ± 0,254	1,498 ± 0,058	0,320 ± 0,004	5,850 ± 0,045	18,281 ± 0,083	1,550 ± 0,089	0,127 ± 0,016
2	0,478 ± 0,009	1,518 ± 0,468	3,176 ± 0,036	0,293 ± 0,020	2,398 ± 0,060	8,184 ± 0,091	1,633 ± 0,083	0,633 ± 0,033
3	0,516 ± 0,005	7,360 ± 0,310	14,264 ± 0,125	0,245 ± 0,003	14,404 ± 0,359	58,792 ± 0,072	2,107 ± 0,088	0,511 ± 0,031
4	0,748 ± 0,011	2,315 ± 0,098	3,095 ± 0,080	0,160 ± 0,005	2,252 ± 0,045	14,075 ± 0,100	4,678 ± 0,200	1,028 ± 0,139
5	0,714 ± 0,028	4,557 ± 0,156	6,382 ± 0,043	0,136 ± 0,013	3,754 ± 0,089	27,603 ± 0,045	5,250 ± 0,314	1,214 ± 0,135
25 °C								
1	0,422 ± 0,023	1,423 ± 0,048	3,372 ± 0,108	0,229 ± 0,008	3,706 ± 0,001	16,183 ± 0,210	1,841 ± 0,017	0,384 ± 0,047
2	0,616 ± 0,018	1,902 ± 0,089	3,088 ± 0,110	0,233 ± 0,006	2,253 ± 0,015	10,103 ± 0,180	2,646 ± 0,040	0,844 ± 0,029
3	0,762 ± 0,010	1,985 ± 0,093	2,605 ± 0,053	0,251 ± 0,003	2,848 ± 0,014	11,347 ± 0, 010	3,035 ± 0,142	0,697 ± 0,065
4	0,823 ± 0,012	8,347 ± 0,257	10,142 ± 0,128	0,259 ± 0,018	8,597 ± 0,067	33,193 ± 0,044	3,179 ± 0,087	0,971 ± 0,094
5	1,203 ± 0,018	6,629 ± 0,133	5,510 ± 0,077	0,274 ± 0,007	4,951 ± 0,045	18,069 ± 0,030	4,391 ± 0,183	1,339 ± 0,061
30 °C								

1	$0,433 \pm 0,004$	$2,907 \pm 0,088$	$6,714 \pm 0,046$	$0,253 \pm 0,007$	$8,550 \pm 0,075$	$33,794 \pm 0,344$	$1,715 \pm 0,017$	$0,340 \pm 0,011$
2	$0,562 \pm 0,008$	$2,896 \pm 0,053$	$5,153 \pm 0,040$	$0,216 \pm 0,005$	$7,050 \pm 0,135$	$32,639 \pm 0,285$	$2,604 \pm 0,040$	$0,407 \pm 0,067$
3	$0,600 \pm 0,011$	$4,630 \pm 0,124$	$7,717 \pm 0,065$	$0,225 \pm 0,003$	$6,900 \pm 0,150$	$30,667 \pm 0,093$	$2,663 \pm 0,086$	$0,671 \pm 0,167$
4	$0,869 \pm 0,004$	$5,955 \pm 0,278$	$6,853 \pm 0,141$	$0,270 \pm 0,028$	$3,900 \pm 0,060$	$14,444 \pm 0,108$	$3,220 \pm 0,221$	$1,527 \pm 0,073$
5	$0,458 \pm 0,005$	$2,306 \pm 0,048$	$5,035 \pm 0,027$	$0,144 \pm 0,005$	$1,350 \pm 0,015$	$9,375 \pm 0,088$	$3,181 \pm 0,150$	$1,708 \pm 0,042$
35 °C								
1	$0,411 \pm 0,005$	$1,541 \pm 0,055$	$3,749 \pm 0,030$	$0,237 \pm 0,008$	$9,512 \pm 0,053$	$40,135 \pm 0,065$	$1,735 \pm 0,072$	$0,162 \pm 0,010$
2	$0,503 \pm 0,013$	$4,505 \pm 0,223$	$8,956 \pm 0,118$	$0,228 \pm 0,002$	$12,446 \pm 0,300$	$54,588 \pm 0,055$	$2,505 \pm 0,151$	$0,362 \pm 0,053$
3	$0,827 \pm 0,013$	$2,842 \pm 0,093$	$3,437 \pm 0,058$	$0,142 \pm 0,009$	$3,453 \pm 0,150$	$24,317 \pm 0,033$	$5,823 \pm 0,104$	$0,823 \pm 0,125$
4	$0,529 \pm 0,010$	$15,395 \pm 0,367$	$29,102 \pm 0,194$	$0,155 \pm 0,014$	$8,408 \pm 0,006$	$54,245 \pm 0,070$	$3,410 \pm 0,104$	$1,831 \pm 0,224$
5	$0,577 \pm 0,010$	$5,962 \pm 0,250$	$10,333 \pm 0,067$	$0,199 \pm 0,008$	$3,296 \pm 0,060$	$16,563 \pm 0,068$	$2,900 \pm 0,366$	$1,809 \pm 0,180$

Apêndice C. Teor de proteínas totais, atividade lipolítica, atividade enzimática específica da lipase pancreática de porco e coeficientes de partição de proteínas totais (Kp) e de atividade enzimática (Ke) nos SAB formados por 2-propanol +K₂HPO₄/H₃PO₄ + água em diferentes temperaturas.

LA	Fase superior			Fase inferior			Kp	Ke
	Teor de proteínas totais (mg· ml ⁻¹)	Atividade lipolítica (U/mL)	Atividade específica (U/mg)	Teor de proteínas totais (mg· ml ⁻¹)	Atividade lipolítica (U/mL)	Atividade específica (U/mg)		
20 °C								
1	0,467± 0,009	0,709 ± 0,050	1,518 ± 0,027	0,084 ± 0,001	5,100 ± 0,300	60,714 ± 0,011	5,556 ± 0,140	0,139 ± 0,018
2	0,386 ± 0,011	2,316 ± 0,090	6,000 ± 0,055	0,075 ± 0,004	9,300 ± 0,267	124 ± 0,250	5,141 ± 0,260	0,249 ± 0,021
3	0,373 ± 0,018	2,038 ± 0,145	5,463 ± 0,087	0,075 ± 0,001	4,100 ± 0,180	54,667 ± 0,101	4,986 ± 0,083	0,497 ± 0,036
4	0,371 ± 0,010	2,064 ± 0,123	5,563 ± 0,058	0,098 ± 0,001	3,385 ± 0,060	34,541 ± 0,031	3,783 ± 0,172	0,610 ± 0,026
5	0,406 ± 0,025	3,181 ± 0,185	7,835 ± 0,110	0,234 ± 0,012	3,562 ± 0,027	15,222 ± 0,020	1,738 ± 0,165	0,893 ± 0,082
25 °C								
1	0,412 ± 0,010	2,259 ± 0,100	5,483 ± 0,089	0,086 ± 0,003	5,353 ± 0,150	62,244 ± 0,120	4,795 ± 0,112	0,422 ± 0,015
2	0,409 ± 0,011	4,480 ± 0,145	10,953 ± 0,128	0,098 ± 0,008	5,097 ± 0,300	52,010 ± 0,265	4,182 ± 0,271	0,879 ± 0,033
3	0,481 ± 0,011	4,425 ± 0,126	9,200 ± 0,209	0,125 ± 0,009	4,950 ± 0,150	39,6 ± 0,089	3,846 ± 0,070	0,894 ± 0,071
4	0,442 ± 0,020	7,949 ± 0,185	17,984 ± 0,315	0,185 ± 0,008	10,698 ± 0,267	57,827 ± 0,232	2,391 ± 0,081	0,743 ± 0,029
5	0,362 ± 0,009	5,331 ± 0,098	14,727 ± 0,299	0,237 ± 0,009	8,252 ± 0,150	34,819 ± 0,099	1,528 ± 0,125	0,646 ± 0,013

30 °C								
1	0,364 ± 0,010	2,580 ± 0,157	7,088 ± 0,150	0,086 ± 0,004	9,886 ± 0,327	114,953± 0,010	4,239 ± 0,180	0,261 ± 0,011
2	0,725 ± 0,014	2,690 ± 0,144	1,950 ± 0,130	0,176 ± 0,012	5,547 ± 0,208	31,517 ± 0,102	4,148 ± 0,252	0,485 ± 0,015
3	0,609 ± 0,028	2,888 ± 0,172	4,729 ± 0,095	0,165 ± 0,005	5,250 ± 0,089	31,818 ± 0,045	3,694 ± 0,020	0,550 ± 0,050
4	0,452 ± 0,010	3,177± 0,200	7,029 ± 0,111	0,159 ± 0,007	5,108 ± 0,158	32,126 ± 0,088	2,842 ± 0,065	0,622 ± 0,003
5	0,424 ± 0,018	1,311 ± 0,085	3,092 ± 0,55	0,167 ± 0,008	3,145 ± 0,183	18,832 ± 0,092	2,540 ± 0,207	0,417 ± 0,018
35 °C								
1	0,790 ± 0,007	1,155 ± 0,053	1,462 ± 0,063	0,134 ± 0,011	33,000 ± 0,120	246,269± 0,480	5,896 ± 0,075	0,035 ± 0,003
2	0,348 ± 0,015	1,801 ± 0,050	5,175 ± 0,055	0,079 ± 0,001	26,100 ± 0,150	330,380± 0,367	4,407 ± 0,599	0,069 ± 0,008
3	0,302 ± 0,029	5,428 ± 0,185	17,973 ± 0,358	0,089 ± 0,002	24,450 ± 0,165	274,719± 0,244	3,390 ± 0,456	0,222 ± 0,015
4	0,276 ± 0,010	2,092 ± 0,101	7,580 ± 0,295	0,094 ± 0,003	4,350 ± 0,145	46,277 ± 0,073	2,932 ± 0,217	0,481 ± 0,038
5	0,459 ± 0,033	1,697 ± 0,060	3,697 ± 0,095	0,162 ± 0,007	4,050 ± 0,160	25,000 ± 0,084	2,832 ± 0,060	0,419 ± 0,023