



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

**MODELAGEM E SIMULAÇÃO TERMODINÂMICA DE SISTEMA
AQUOSO BIFÁSICO DE FOSFATO DE POTÁSSIO + PEG PARA PRÉ-
PURIFICAÇÃO DE LECTINA RECOMBINANTE rCABO**

Autor: Matheus Firmino Jardim

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

ITAPETINGA
BAHIA- BRASIL
FEVEREIRO DE 2022

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

**MODELAGEM E SIMULAÇÃO TERMODINÂMICA DE SISTEMA AQUOSO
BIFÁSICO DE FOSFATO DE POTÁSSIO + PEG PARA PRÉ-PURIFICAÇÃO DE
LECTINA RECOMBINANTE rCABO**

MATHEUS FIRMINO JARDIM

Projeto de dissertação apresentado à
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
como requisito parcial para obtenção do Título de
Mestre junto ao Programa de Pós- Graduação em
Engenharia e Ciência de Alimentos da
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

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

Coorientadores: Prof. Dr^a. Kyria S. do Nascimento

Prof. Dr^a. Vanessa Santos Sampaio

ITAPETINGA
BAHIA- BRASIL
FEVEREIRO DE 2022

661.807 Jardim, Matheus Firmino.

J42m Modelagem e simulação termodinâmica de sistema aquoso bifásico de fosfato de potássio + peg para pré-purificação de lectinas recombinantes rCABO. / Matheus Firmino Jardim. – Itapetinga-BA: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2022.

66 p.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos. Sob a orientação da Prof^a. D. Sc. Renata Cristina Ferreira Bonomo e coorientação dos Profs. D. Sc. Kyria S. do Nascimento e Vanessa Santos Sampaio.

1. Sistemas aquosos bifásicos (SAB) – Diagrama de fases. 2. Sistemas aquosos bifásicos (SAB) – Modelo UNIFAC. 3. Lectinas – Purificação. 4. Cromatografia de exclusão molecular. 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. Nascimento, Kyria S. do. IV. Sampaio, Vanessa Santos. V. Título.

CDD(21): 661.807

Catálogo na Fonte:

Cláudia Aparecida de Souza – CRB 1014-5^a Região
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para desdobramentos por Assunto:

1. Sistemas aquosos bifásicos (SAB)
2. Diagrama de fases
3. Modelo UNIFAC
4. Lectinas : Purificação
5. Cromatografia de exclusão molecular

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: MODELAGEM E SIMULAÇÃO TERMODINÂMICA DE SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO DE FOSFATO DE POTÁSSIO + PEG PARA PRÉ-PURIFICAÇÃO DE LECTINAS RECOMBINANTES rCABO.

Autor (a): MATHEUS FIRMINO JARDIM

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

Coorientador (a): Prof.^a Dr.^a Vanessa Santos Sampaio

Prof.^a Dr.^a Kyria Santiago do Nascimento

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



Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada
Membro Externo – UFC



Evaldo Cardozo de Souza Júnior
UESB



Renata Cristina Ferreira Bonomo
Orientadora – UESB
Presidente da Banca

Itapetinga-BA, 10 de março de 2022.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.

Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

AGRADECIMENTOS

À Deus por me manter firme em minha jornada, me iluminando e abençoando toda a minha trajetória.

À minha mãe Alaece e meu pai João por não medirem esforços para a realizar meus sonhos, pelos conselhos e pelo amor. Obrigado por acreditarem em mim.

Aos meus irmãos João Pedro, Gabriel, Darley, Hugo e família, pelo amor, incentivo, companheirismo e compreensão.

À minha orientadora professora Dr.^a Renata Bonomo, pela excelente orientação, ensinamentos compartilhados, dedicação, compreensão, confiança e pela paciência durante todo o desenvolvimento deste trabalho. Me sinto orgulhoso de ser orientado por uma pessoa tão incrível.

À minha coorientadora, professora Kyria S. do Nascimento pela ajuda extremamente importante e acompanhamento em todo o trabalho, sempre com paciência e otimismo

À minha coorientadora, professora Vanessa Santos Sampaio sempre disponível para ajudar.

Ao professor Leandro Soares Santos pela ajuda, paciência e pelos ensinamentos no decorrer do projeto.

Àos pesquisadores do BioMol –Lab, da Universidade Federal do Ceará pela ótima parceria e pelo fornecimento da lectina para o trabalho.

À Monique Silveira, pela paciência, carinho e compreensão na qual sem sua ajuda não estaria onde estou hoje.

Aos colegas do LEP, em especial à Jonathan Santos, Jéssica Borges, Annie Nolasco, Emilia Carmen, Lucas Sousa, Mateus Flores e Priscila Amaral, agradeço pelas amizades construídas e carinho durante todo esse tempo.

A todos meus companheiros de pós-graduação pelos momentos de descontrações vividos e ensinamentos.

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

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

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

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

SUMÁRIO

1.	Introdução.....	12
2.	Revisão bibliográfica	14
2.1.	Sistemas aquosos bifásicos	14
2.2.	Tipos de sistemas.....	14
2.3.	Diagrama de Fases.....	15
2.4.	Influências na formação de um SAB.....	17
3.	Modelagem termodinâmica	18
3.1.	Método UNIQuac Functional-group Activity Coefficient (UNIFAC)	21
4.	Lectinas	23
4.1.	Classificação	24
4.2.	Caracterização	26
4.3.	Purificação	28
4.4.	Eletroforese SDS-PAGE.....	28
4.5.	Cromatografia de exclusão molecular	28
4.6.	Purificação de lectinas utilizando SAB	29
5.	Lectinas Recombinantes.....	30
5.1.	<i>Canavalia bonariensis</i> e sua forma recombinante rCaBo	30
6.	Aplicações biotecnológicas	31
7.	Objetivo.....	32
7.1.	Objetivo geral:.....	32
7.2.	Objetivos específicos:.....	32
8.	Metodologia.....	32
8.1.	Local do experimento	32
8.2.	Modelagem termodinâmica	33
8.2.1.	Determinação do efeito salting-out	33

8.2.2. Determinação da Energia de Interação dos grupos dos sistemas	33
8.3. Partição das Lectinas	37
8.3.1. <i>Material</i>	37
8.3.2. <i>Características rCaBo</i>	37
8.3.3. <i>Montagem dos sistemas aquosos bifásicos</i>	38
8.3.4. <i>Cromatografia de Exclusão molecular</i>	39
8.3.5. <i>Partição da lectina</i>	39
8.3.6. <i>Determinação do teor de proteína</i>	39
8.4. Determinação dos parâmetros de partição	40
8.4.1. <i>Coefficiente de partição de proteína</i>	40
8.4.2. <i>Recuperação teórica</i>	40
8.4.3. <i>Avaliação dos parâmetros termodinâmicos de transferência</i>	40
8.4.4. <i>Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS</i>	41
9. Resultados	42
9.1. Linhas de amarração	42
9.2. Modelagem Termodinâmica dos SAB's.....	44
9.3. Efeito salting-out	46
9.4. Eletroforese SDS-PAGE.....	49
9.5. Determinação dos parâmetros de partição	50
10. Considerações Finais.....	54
11. Referencias bibliográfica.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros R_K e Q_K dos grupos de contribuição de cada componente e quantidade de repetições de cada grupo em uma mesma molécula.....	23
Tabela 2. 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, para as temperaturas de 20, 25, 30 e 35°C.....	28
Tabela 3. Dados das linhas de amarração, em unidade de fração mássica, das fases dos SAB PEG 4000 [w_1] + K_2HPO_4/H_3PO_4 [w_2] + H_2O , para 20, 25, 30 e 35 °C, pH 7.0 e $p = 0.1$ MPa.....	32
Tabela 4. Dados das linhas de amarração, em unidade de fração mássica, das fases dos SAB PEG 6000 [w_1] + K_2HPO_4/H_3PO_4 [w_2] + H_2O , para 20, 25, 30 e 35 °C, pH 7.0 e $p = 0.1$ MPa.....	32
Tabela 5. 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 e 6000 + K_2HPO_4/H_3PO_4 + H_2O à 20, 25, 30 e 35°C.....	35
Tabela 6. Parâmetros de ajuste (β e k) do efeito <i>salting-out</i> para os SAB PEG (4000 ou 6000) + K_2HPO_4/H_3PO_4 + H_2O , à 20, 25, 30 e 35°C, pH 7.0 e $p = 0.1$ MPa.....	36
Tabela 7. Desvios nas composições dos sistemas formados por PEG 4000 e PEG 6000 + K_2HPO_4/H_3PO_4 + H_2O , em diferentes temperaturas pelo modelo UNIFAC.....	38
Tabela 8. Coeficientes de partição da Lectina rCaBo em SAB's formados por polietilenoglicol 4000 e 6000 g/mol + K_2HPO_4/H_3PO_4 + água em diferentes temperaturas (20, 25, 30 e 35°C).....	41
Tabela 9. Índice de recuperação teórica em %Y dos sistemas aquosos bifásicos formados por polietilenoglicol 4000 e 6000 g.mol ⁻¹ + fosfato de potássio/ácido fosfórico K_2HPO_4/H_3PO_4 + água em diferentes temperaturas (20, 25, 30 e 35 °C).....	42
Tabela 10. Parâmetros termodinâmicos de transferência da Lectina rCaBo em sistema aquoso bifásico formados por PEG 4000 e 6000 g.mol ⁻¹ + fosfato de potássio /ácido fosfórico K_2HPO_4/H_3PO_4 + água em diferentes temperaturas (20, 25, 30 e 35 °C).....	43

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Diagrama de fases de coordenadas retangulares.....6
- Figura 2.** Classificação estrutural das lectinas15
- Figura 3.** Linhas de amarração obtidas experimentalmente (—) e preditas pelo modelo UNIFAC (- - -) expressas em unidade de fração mássica, PEG 4000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ [w1] + $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ [w2] + água em (A) 20°C, (B) 25°C,(C) 30°C, (D) 35°C e PEG 6000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ [w1] + $\text{K}_2\text{HPO}_4/ \text{H}_3\text{PO}_4$ [w2] + água em (E) 20°C, (F) 25°C,(G) 30°C, (H) 35°C, pH 7.0 e p = 0,1 MPa38
- Figura 4.** Análise SDS-PAGE da lectina recombinante rCaBo em solução tampão, gel de acrilamida em 12%; poço 1: marcador de peso molecular; poço 2: amostra de lectina rCaBo em 1:4; poço 2: amostra de lectina rCaBo em 1:2.39

JARDIM, M. F. **Modelagem e simulação termodinâmica de sistema aquoso bifásico de fosfato de potássio + PEG para pré-purificação de lectinas recombinantes rcabo.** Itapetinga – BA: UESB, 2022. 65 p. Dissertação. (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos; Área de Concentração em Engenharia de Alimentos) *

RESUMO

Visando aperfeiçoar a aplicação dos sistemas aquosos bifásicos (SAB) no processo de purificação é necessário o conhecimento das interações que ocorrem no processo de transferência da proteína nas fases. Os conhecimentos teóricos aliados à modelagem e à simulação podem ajudar a escolher os sistemas que apresentem melhores valores de partição. Diante disto, o objetivo deste trabalho é propor um modelo para predição dos coeficientes de partição de biomoléculas em sistemas aquosos bifásicos, utilizando o modelo UNIFAC (Universal Functional Activity Coefficient). Visto isso, primeiramente foram obtidos dados de equilíbrio de sistemas compostos por polietilenoglicol (PEG 4000 g.mol⁻¹ e PEG 6000 g.mol⁻¹), sal (K₂HPO₄/H₃PO₄) e água em diferentes temperaturas T = (20, 25, 30 e 35) °C, totalizando 20 diagramas de fases, para cada PEG. Posteriormente foi realizada a partição da lectina recombinante obtida a partir de extrato de *Canavalia Bonariensis*. A eletroforese SDS-PAGE foi realizada para acompanhar o estudo de partição dessa proteína. O modelo UNIFAC apresentou um ajuste satisfatório dos sistemas analisados. A Cromatografia de exclusão molecular com uma coluna SRT-C SEC foi utilizada para quantificação de proteína das fases e interface coletada após o processo de partição. A rCaBo migrou preferencialmente para a interface e fase inferior na maioria dos sistemas. A partição da proteína foi entropicamente dirigida até a temperatura de 30°C, passando a ser entalpicamente dirigida de acordo com o aumento da temperatura. O sistema em que foi encontrado maior concentração de lectina em uma das fases foi a interface do ponto global 5, composto por PEG 4000 g.mol⁻¹ + K₂HPO₄/H₃PO₄ a 25°C, obtendo um valor de 86,052 %.

Palavras-chave: Partição; proteínas recombinantes; Unifac; lectinas.

*Orientadora (a): Renata Cristina Ferreira Bonomo, DSc., UESB. Co-orientadores: DSc. Vanessa Santos Sampaio, DSc. Kyria Santiago do Nascimento.

JARDIM, M. F. **Modeling and thermodynamic simulation of a two-phase aqueous potassium phosphate + PEG system for pre-purification of rcaBo recombinant lectins.** Itapetinga – BA: UESB, 2022. 65 p. Dissertation. (Master in Food Engineering and Science; Area of Concentration in Food Engineering) *

SUMMARY

In order to improve the application of aqueous two-phase systems (ATPS) in the purification process, it is necessary to know the interactions that occur in the process of transferring the protein in the phases. Theoretical knowledge combined with modeling and simulation can help to choose the systems that present the best partition values. Therefore, the objective of this work is to propose a model to predict the partition coefficients of biomolecules in two-phase aqueous systems, using the UNIFAC (Universal Functional Activity Coefficient) model. Given this, firstly, equilibrium data were obtained from systems composed of polyethylene glycol (PEG 4000 g.mol⁻¹ and PEG 6000 g.mol⁻¹), salt (K₂HPO₄/H₃PO₄) and water at different temperatures T = (20, 25, 30 and 35) °C, totaling 20 phase diagrams, for each PEG. Subsequently, the partition of the recombinant lectin obtained from *Canavalia Bonariensis* extract was carried out. SDS-PAGE electrophoresis was performed to accompany the partition study of this protein. The UNIFAC model presented a satisfactory fit of the analyzed systems. Molecular exclusion chromatography with an SRT-C SEC column was used for protein quantification of the phases and interface collected after the partitioning process. rCaBo migrated preferentially to the interface and lower phase in most systems. The protein partition was entropically directed until the temperature of 30°C, becoming enthalpically directed with increasing temperature. The system in which the highest concentration of lectin was found in one of the phases was the interface of the global point 5, composed of PEG 4000 g.mol⁻¹ + K₂HPO₄/H₃PO₄ at 25°C, obtaining a value of 86.052%.

Keywords: Partition; recombinant proteins; Unifac; lectins.

*Advisor (a): Renata Cristina Ferreira Bonomo, DSc., UESB. Co-advisors: DSc. Vanessa Santos Sampaio, DSc. Kyria Santiago do Nascimento.

1. Introdução

É denominado de sistema aquoso bifásico, os sistemas que contém duas ou mais fases líquidas em equilíbrio termodinâmico, sendo muito útil para aplicações em extração e/ou purificação de alguns compostos presentes em processos tecnológicos. O potencial dos processos de extração líquido-líquido em sistemas aquosos bifásicos é alto, pois ambas as fases são aquosas devido a predominância de água na sua constituição, e por isso, tornam-se um ambiente favorável para biomoléculas (SILVA, 2020).

A aplicação do SAB para partição de proteínas bem como para partição de biomoléculas no geral é amplamente difundida no meio científico por ser uma tecnologia menos agressiva frente a outras existentes, o que é muito requerido, levando em conta a sensibilidade destas em relação a temperaturas elevadas e solventes orgânicos tóxicos (NASCIMENTO, 2019). São diversos os fatores que afetam o equilíbrio de fases em um SAB, entre estes, por exemplo, temos a temperatura, a composição global, o pH, a massa molar dos constituintes e adição de eletrólitos (JUNQUEIRA, 2019).

O equilíbrio líquido-líquido 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 pré estabelecidas de composição, pH e temperatura 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 (MUNIZ, 2021).

Diversos modelos matemáticos propostos para correlacionar dados de equilíbrio de fase e determinar coeficientes de atividade são encontrados na literatura. Um modelo termodinâmico que tem sido usado para prever dados de equilíbrio líquido-líquido usando métodos de contribuição de grupo é o modelo Universal Functional Activity Coefficient (UNIFAC). Para implementar o modelo UNIFAC, é necessário realizar correlações dos dados de atividade obtidos experimentalmente para obter parâmetros que caracterizem as interações entre pares de grupos estruturais nos sistemas. Posteriormente, esses parâmetros podem ser usados para prever coeficientes de atividades em outros sistemas que não foram estudados experimentalmente, mas que contêm a mesma função dos grupos tradicionais (DO NASCIMENTO, 2018). 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 (MUNIZ, 2021). Visando a predição do

comportamento de partição da lectina em sistemas envolvendo PEG + sal, em que existem muito grupos de contribuição, o modelo matemático proposto pode ser adequado.

As lectinas são denominadas como proteínas ou glicoproteínas que apresenta como característica principal, o reconhecimento e a manutenção de ligações específicas e reversíveis a um mono ou oligossacarídeo e quaisquer outras substâncias que contenham açúcares, mantendo a estrutura covalente desses ligantes glicosídicos. Ainda, possui capacidade de precipitar células, glicoconjugados e polissacarídeos de fontes animais, vegetais, vírus e bactérias. No entanto as lectinas derivadas de plantas, que são empregadas para todos os fins, têm algumas limitações, a começar pela sua heterogeneidade genética da fonte da planta, essas proteínas são misturas de várias isoformas o que limita seu uso em métodos analíticos onde a especificidade é extremamente necessária. Outro fator enfrentado por elas é sua escalabilidade, seu rendimento é baixo e sofre de variações sazonais e de lote a lote substanciais. Esses desafios limitam seu uso, pois o desempenho por lote varia, além de outro problema que é ameaça à extinção que algumas espécies sofrem como a *Canavalia bonariensis* (KEOGH, 2014).

A produção de lectinas por meio da tecnologia de DNA recombinante surge então, como uma ótima alternativa para superar todas essas dificuldades. A expressão dessa proteína partir de uma única sequência e a ausência de modificação pós-tradução permite a expressão de apenas uma única lectina específica com a oportunidade de ampliá-la para a produção industrial (FERNANDEZ-POZA, 2021)

A lectina de sementes de *Canavalia bonariensis* (denominada CaBo) é específica de manose/glicose, é uma espécie nativa da região Sul do país, e é umas das que está em fase de extinção, fato este que dificulta uma melhor avaliação do potencial biotecnológico da mesma na sua forma selvagem. A capacidade de expressar e purificar uma proteína na sua forma recombinante permite a obtenção da proteína homogênea em grande quantidade possibilitando sua caracterização estrutural, caracterização biológica, e também seu uso como possível ferramenta biotecnológica em escala laboratorial ou mesmo industrial (ROSANO; CECCARELLI, 2014). A rCaBo é expressa em *Escherichia coli* e as características de especificidade à carboidrato da CaBo selvagem são preservadas. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo o estudo de equilíbrio de fases de sistemas aquosos formados por polietilenoglicol 4000 ou 6000 g·mol⁻¹ e sal fosfato de potássio K₂HPO₄ e da aplicação destes na pré-purificação da lectina recombinante rCaBo.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Sistemas aquosos bifásicos

A extração líquido-líquido trata-se de uma operação unitária em que um composto presente em uma fase líquida é transferido para um solvente de extração, resultando em duas fases, uma enriquecida com o componente a ser separado e outra pobre. Para obter uma extração eficiente, é preciso avaliar uma série de fatores que influenciam esse processo. Na escolha do solvente é importante considerar alguns aspectos como a seletividade, miscibilidade, densidade, viscosidade, estabilidade térmica e química. Um sistema aquoso bifásico (SAB) é uma extração líquido-líquido, sendo formada quando dois componentes hidrossolúveis são misturados acima de determinadas concentrações críticas, resultando em duas fases imiscíveis em equilíbrio termodinâmico. As variáveis do processo também interferem na partição, e é importante considerar a escolha dos constituintes do sistema e suas concentrações (SILVA, 2020), (MAGALHÃES, 2021).

A aplicação do SAB para partição de proteínas bem como para partição de biomoléculas no geral é amplamente difundida no meio científico por ser uma tecnologia menos agressiva frente a outras existentes, o que é muito requerido, levando em conta sensibilidade destas em relação a temperaturas elevadas e solventes orgânicos tóxicos (NASCIMENTO, 2019). O custo da técnica é relativamente baixo e sua composição é majoritariamente água, tornando a sua utilização mais reportada em estudos e publicações, devido suas inúmeras vantagens expostas. Nascimento (2019) utilizou o SAB para extração de lipases de interesse biológico, Pignatta (2016) particionou a Albumina de Soro Bovino através de SAB (PEG+ Na₂SO₄ + água), Clementino (2019) fez a purificação após a produção integrada de protease fibrinolítica de *Mucor subtilissimus*, também utilizando PEG+ Na₂SO₄ + água.

2.2. Tipos de sistemas

Os sistemas aquosos bifásicos 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 (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).

A aplicabilidade dos sistemas citados são comumente presentes em trabalhos de partição, alguns estudos apresentam modificações e trazem novos sistemas para o processo de extração por SAB, seja com o objetivo de aperfeiçoar o processo ou desenvolver um novo método com potencial de aplicabilidade específico. Junqueira (2019) verificou a formação de

novos SAB's a partir de surfactantes como agentes moduladores da partição, com objetivo de conseguir diagramas de fases de sistemas aquosos bifásicos micelares inéditos, Li (2013) utilizou um sistema aquoso bifásico de *n*-propanol e citrato de potássio com intuito de otimizar a extração de cloranfenicol em carnes, Michel e colaboradores (2015) utilizou líquidos iônicos na partição de proteínas de soro de leite, Souza (2015) utilizou SAB baseado em Tetrahidrofurano na partição de Diuron, Veloso (2018) utilizou novos componentes mais seguros ambientalmente no SAB para determinação de corantes sintéticos em amostras alimentícias. É perceptível que a utilização do processo é abrangente e novas tecnologias vêm sendo estudadas a cada dia para torná-la ainda mais eficiente e usual.

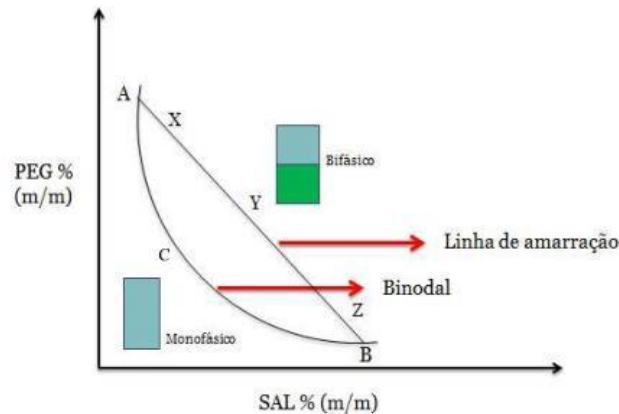
O polietilenoglicol (PEG), polímero de utilização comum nesse tipo de sistema, é um polímero sintético obtido da reação de polimerização de óxido de etileno. Este pode ser encontrado na forma líquida ou na forma sólida, dependendo da sua massa molar. Estes são comumente utilizados por serem facilmente encontrados a baixo custo, possuem elevada capacidade de formação de fases com outros polímeros neutros, bem como sais, principalmente devido aos grupos hidroxila terminais nas cadeias poliméricas que são responsáveis por sua hidrofiliidade. Além disso, soluções de PEG de massa molar menor apresentam baixa viscosidade e tensão interfacial (SILVA, 2020; BLATKIEWICZ et al., 2018).

Blatkiewicz et al. (2018), ainda fala que 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 bem como a utilização desses sistemas em processos de partição de biomoléculas (KHAYATI e GHOLITABAR, 2016; YAN et al., 2018).

2.3. Diagrama de Fases

O diagrama de fases mostra a representação da composição química das duas fases que se encontram em equilíbrio:

Figura 1. Diagrama de fases de coordenadas retangulares



Fonte: PINTO, 2016.

Nos estudos de partição, utiliza-se esta representação gráfica como uma ferramenta primordial para iniciar o processo de extração, pois a partir dele, conseguimos dizer com quais gradientes de concentrações, os sistemas de duas fases são formados. O eixo das abscissas representa a concentração do componente 1 em porcentagem mássica % (m/m), bem como o eixo das ordenadas a concentração do componente 2, também em porcentagem mássica. O diagrama informa em quais composições globais o sistema é homogêneo ou heterogêneo (LEITE, 2010),(LAUGHLIN; MASSALKI, 2021).

A Linha Binodal (LB) separa essas duas regiões, uma monofásica e outra bifásica. Na região abaixo dessa linha o sistema é monofásico já na região acima o sistema é bifásico. Também compõe o diagrama, as linhas de amarração (LA), elas nos mostram a concentração dos solutos nas duas fases em equilíbrio (fase superior e inferior) para uma determinada composição global (A) do sistema.

Recentemente, dois 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. A 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 (PIMENTEL et al., 2017). Alguns estudos confirmam esse fato, mostrando que quanto maior a habilidade *salting-out* do sal sob os dados de equilíbrio, maior a região bifásica para os sistemas estudados (FU et al., 2019; KHAYATI et al., 2016).

O conhecimento dos dados de equilíbrio é fundamental para a utilização do SAB no processo de extração/purificação. Partindo desse fato, para utilização dos SAB em processos de partição, há necessidade do estudo dos diagramas de equilíbrio de fases uma vez que estes são utilizados como ponto inicial para o desenvolvimento de um processo de separação de biomoléculas eficiente (LAUGHLIN; MASSALKI, 2021); (MUNIZ, 2021).

O coeficiente de partição (K_p) é um parâmetro também muito importante a ser avaliado, pois é definido como a razão entre a concentração do componente de interesse na fase superior e inferior, respectivamente, no momento em que o sistema entra em equilíbrio. É sempre desejado em uma separação utilizando SAB, que as fases tenham valores distintos, para que a separação se realize de forma integral ou próximo a isso para uma das duas fases (BARROS, 2016).

2.4. Influências na formação de um SAB

Quando é formado um sistema aquoso bifásico, se inicia um complexo equilíbrio líquido-líquido e o que coordena esse equilíbrio são principalmente os aspectos relacionados aos efeitos entrópicos e entálpicos em relação a hidratação dos componentes que formam o sistema. São diversos os fatores que afetam o equilíbrio de fases em um SAB, entre estes, por exemplo, temos a temperatura, a composição global, o pH, a massa molar dos constituintes e força iônica das soluções salinas (JUNQUEIRA, 2019).

Um fator mais importantes a ser estudado é a temperatura, pois ela pode afetar diretamente a distribuição dos constituintes entre as fases em equilíbrio do sistema, levando até a um deslocamento da curva binodal dependendo do sistema e isso interfere no comprimento da linha de amarração e o tamanho da região bifásica (RENGIFO, 2015).

Outro fator importante é a massa molar do polímero, pois o aumento da mesma promoverá variações na região bifásica. Mais precisamente, quanto maior for a massa molar do polímero no sistema, para uma determinada composição de fases, menor será a concentração necessária, desse mesmo polímero, para que ocorra separação de fases (RENGIFO, 2015), menor será a partição de material biológico para a fase rica em polímero e menor será o volume de solvent disponível, o que implica em uma diminuição de solubilidade das biomoléculas na fase rica em polímero e assim, uma diminuição do coeficiente de partição (DA COSTA, 2010). Estudos de Pinto (2016) e Carvalho (2017) verificaram que a utilização do polietileno glicol (PEG) em massas moleculares menores ($400 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) obtiveram um resultado melhor na purificação de lectina ConBol e extração de ácido monometilarsônico, respectivamente. Em contra partida Carvalho (2004) observou que a adição de um polímero

com maior massa molar levou a um aumento da região bifásica do sistema. Isso indica que o analito, assim como o tipo e concentração de sal tem grande efeito na formação de um sistema aquoso bifásico eficiente.

A adição do sal no equilíbrio líquido-líquido introduz forças iônicas que afetam o equilíbrio. Quando os íons sofrem hidratação, uma parte das moléculas de água torna-se indisponível para realizar outros tipos de interações. Ananthapadmanabhan e Goddard (1987) postularam após seus estudos, que ânions com uma maior valência são melhores agentes salting-out do que ânions com valência mais baixa, porque o ânion torna-se mais hidratado e assim diminui a quantidade disponível para hidratar o PEG. Quando confrontamos íons com diferentes raios e, conseqüentemente diferentes densidades de carga, o íon de menor raio (e maior densidade de carga) irá interagir com o PEG em maior proporção, favorecendo a interação entre PEG/sal, necessitando então de uma maior quantidade de sal para saturação da cadeia do polímero e na diminuição da região bifásica (CARVALHO, 2004).

Em relação ao pH, mudanças neste podem promover uma alteração nas cargas da superfície da proteína e assim, modifica também seu coeficiente de partição, além de sua redução causar um deslocamento da curva de equilíbrio para a direita, resultando na necessidade de concentrações dos componentes mais elevadas para a formação das duas fases líquidas. Também pode acontecer do pH induzir mudanças conformacionais nas estruturas das biomoléculas, provocando a alteração no comportamento de separação da mesma (DA COSTA, 2010).

O mecanismo molecular por trás da separação de fase é governado pelo equilíbrio termodinâmico do sistema, de acordo com o tipo e a natureza química dos componentes formadores de fase. Desta forma, a formação das duas fases dos sistemas aquosos bifásicos dependerá das interações intermoleculares entre os constituintes formadores do sistema. O conhecimento e entendimento da formação das fases é imprescindível para o desenvolvimento de modelos que possam prever o equilíbrio de fases.

3. Modelagem termodinâmica

A separação de fases durante um 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 ($\Delta_{\text{mix}}G$) (LAUGHLIN; LOH, 2006). 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. (1):

$$\hat{f}_i^\alpha = \hat{f}_i^\beta = \dots = \hat{f}_i^\pi \quad (1)$$

Onde: \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. (2).

$$x_i^\alpha \gamma_i^\alpha = x_i^\beta \gamma_i^\beta \quad (2)$$

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

Esse coeficiente de atividade irá dimensionar a quantidade em que uma solução se afasta de um comportamento que seria o ideal. Tal 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. (MUNIZ, 2021). 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 (GE) (SMITH et al., 2007).

$$RT \ln \gamma_i = \left(\frac{\partial G^E}{\partial n^i} \right)_{T,P,n_{j \neq i}} \quad (3)$$

$$\ln \gamma_i = \frac{G^E}{RT} \quad (4)$$

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

Diversas 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 (GE), então, 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 (MUNIZ, 2021).

Esses modelos teóricos que se baseiam no conceito de composição local estudam o comportamento molecular de soluções líquidas. Tal conceito deixa a entender que a composição local seja diferente da composição global da solução devido às forças de interação intermolecular. Ou seja, dentro 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 (GMEHLING et al., 2015). 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. 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). 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; 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.

Os modelo termodinâmicos e sua utilização 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).

3.1. Método UNIquac Functional-group Activity Coefficient (UNIFAC)

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 extendido, sendo aplicável para predizer tanto 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; 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. (5).

$$\ln\gamma_i = \ln\gamma_i^C + \ln\gamma_i^R \quad (5)$$

Em que: $\ln\gamma_i^C$ e $\ln\gamma_i^R$ 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. (6) demonstra como termo combinatorial do modelo UNIFAC é calculado:

$$\ln\gamma_n^C = \frac{G^E}{RT} = \frac{\varphi_i}{x_i} + \frac{z}{2} q_i \ln \frac{\theta_i}{\varphi_i} + li - \frac{\varphi_i}{x_i} \sum_j X_j l_j \quad (6)$$

Em que:

$$\varphi_i = \frac{r_i x_i}{\sum_j r_j x_j} \quad (7)$$

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:

$$r_i = \sum_k V_K^{(i)} R_K \quad (8)$$

$$q_i = \sum_k V_K^{(i)} Q_K \quad (9)$$

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

$$R_K = \frac{V_{wk}}{15.17} \quad (10)$$

$$Q_K = \frac{A_{wk}}{2.5 \times 10^9} \quad (11)$$

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). 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.

$$\ln\gamma_i^R = \frac{G_R^E}{RT} = \sum_K v_k^{(i)} (\ln\Gamma_k - \ln\Gamma_k^{(i)}) \quad (12)$$

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. (13):

$$\ln\Gamma_k = Q_K \left[1 - \ln(\sum_m \theta_m \Psi_{mk}) - \sum_m \frac{\theta_m \Psi_{km}}{\sum_n \theta_n \Psi_{nm}} \right] \quad (13)$$

Em que θ_m é a fração de área do grupo m, que pode ser calculada pela Eq. (14).

$$\theta_m = \frac{Q_m X_m}{\sum_n Q_n X_n} \quad (14)$$

X_m é a fração molar do grupo m na mistura, conforme mostra a Eq. (15).

$$X_m = \frac{\sum_i^M V_m^{(i)} X_i}{\sum_i^M \sum_j^N V_j^{(i)} X_i} \quad (15)$$

Os termos do tipo Ψ_{mk} , que aparecem na Eq. (13) são os parâmetros de interação energética entre os grupos i e j , dados pela Eq. (16).

$$\Psi_{mn} = \exp \left[-\frac{u_{ij} - u_{ji}}{T} \right] = \exp \left(-\frac{a_{ij}}{T} \right) \quad (16)$$

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:

$$\ln \gamma_n = \ln \gamma_n^{D-H} + \ln \gamma_n^C + \ln \gamma_n^R$$

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.

4. Lectinas

As Lectinas são denominadas como proteínas ou glicoproteínas que apresenta como

característica principal, o reconhecimento e a manutenção de ligações específicas e reversíveis a um mono ou oligossacarídeo e quaisquer outras substâncias que contenham açúcares, mantendo a estrutura covalente desses ligantes glicosídicos. Ainda, possui capacidade de precipitar células, glicoconjugados e polissacarídeos de fontes animais, vegetais, vírus e bactérias (GAJBHIYE; GONG, 2013; HE et al., 2015; DA SILVA, 2018). As interações hidrofóbicas, forças de Van der Waals e as ligações de hidrogênio são as forças que fornecem a estabilidade para essas ligações reversíveis, que ocorrerá no domínio de reconhecimento de carboidratos da lectina (BARROS et al., 2020).

A ligação das lectinas com açúcares é atribuída a um Domínio de Reconhecimento de Carboidratos (DRC) dentro de sua estrutura de polipeptídios. Sua interação com determinados carboidratos podem ser tão específica como uma interação entre substrato e enzima ou antígeno e anticorpo. (JUAN et al., 2017; GAJBHIYE; DA SILVA, 2018).

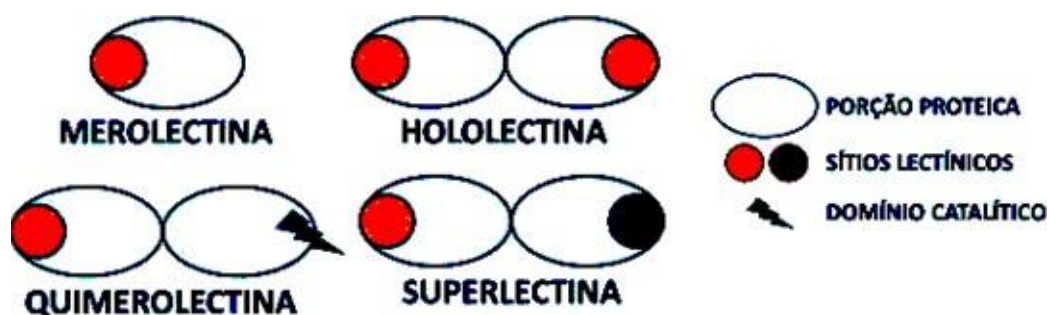
Em estudos iniciais com esse tipo de proteína, foi constatado que apresentavam certo nível de toxicidade, entretanto com o avanço das pesquisas, as lectinas passaram a ser instrumento essencial em diagnósticos de doenças, identificação de cepas de micro-organismos e estudos relacionados a tipos sanguíneos (GONDIM et al., 2017).

4.1. Classificação

Existem diversas maneiras de como esse tipo de proteína pode ser classificada, por exemplo, através do seu tamanho, sua estrutura, sua organização molecular, a similaridade na sequência de aminoácidos e seus sítios de ligações a açúcares, em outras palavras sua especificidade a diferentes tipos de carboidratos (BELLANDE et al., 2017).

A classificação estrutural é uma forma de divisão bastante usual e foi proposta por Van Damme e colaboradores (1998) e ampliada por Monteiro-Moreira (2002). De acordo com essa classificação, esse tipo de proteína é agrupada de acordo com a quantidade e características dos sítios de interação a carboidratos. Grupos que apresentam apenas um sítio de ligação a carboidratos são classificadas como merolectinas; os que apresentam dois ou mais sítios de ligação, recebem o nome de hololectinas; e existem também as quimerolectinas, que além dos domínios de ligação a carboidratos, apresentam domínios não-lectínicos, geralmente catalíticos. Já as superlectinas são um grupo específico que apresenta pelo menos dois domínios distintos de ligação a carboidratos (ITAKURA et al., 2017), (LACERDA, 2015). Uma representação desses grupos está na figura 2.

Figura 2. Classificação estrutural das lectinas



Fonte: Autor próprio, adaptado de Monteiro-Moreira (2002).

Outra forma de classificação conveniente, surgindo da necessidade de identificar e agrupar lectinas pela compreensão dos mecanismos de reconhecimento Lectina-Carboidrato, seria a classificação de acordo com as características topológicas do sítio ligante glicídico. Tal localização torna-se importante, uma vez que os espaços presentes definem a categoria de atividade da lectina, uma vez que a acessibilidade do ligante ao sítio de reconhecimento determina mecanismos de reconhecimentos distintos. Logo, existem dois grupos em que estas proteínas se classificarão (Elgavish e Shaanan, 1997):

Grupo I: As lectinas de transporte, tais como as proteínas transportadoras bacterianas e as enzimas, em que os sítios ligantes glicídicos das mesmas estarão mais internamente alocados e vão apresentar padrões de reconhecimento que são próprios.

Grupo II: As lectinas que apresentam um sítio ligante glicídico mais externo e topologicamente mais perto da superfície. Grande parte das lectinas que são conhecidas, atualmente, está neste grupo, subdivididas em famílias de acordo com sua procedência ou especificidades glicídicas.

De acordo com a classificação quanto à especificidade ao carboidrato, as lectinas podem ser agrupadas nos seguintes grupos (LACERDA, 2015):

- Ligantes de Fucose;
- Ligantes de Galactose/N-acetilgalactosamina (Ex: Soybean agglutinin);
- Ligantes de N-acetil-D-glicosamina (Ex: Wheat germ agglutinin);
- Ligantes de Manose (Ex: Concanavalin A);
- Ligantes de Ácido Siálico (Ex: Lectina de *Limax flavus*);
- Ligantes de Glicanos Complexos (Ex: *Phaseolus Vulgaris*) I.

As lectinas estão presentes em todos os seres como vírus, bactérias, protozoários, fungos, plantas e animais onde esse tipo de proteína desempenha atividades e funções vitais

para os mesmos.

4.2. Caracterização

Quando se trata de proteínas que existem diversos tipos e classes e cada variante com uma especificidade única como as lectinas, torna-se fundamental as técnicas de caracterização das mesmas, visando levantar o maior número de características possíveis daquela em estudo, seja de sua estrutura, funcionalidade ou especificidade a carboidrato.

Algumas propriedades físico-químicas são avaliadas para a caracterização de lectinas puras, são elas o ensaio de hemaglutinação, utilizado para a detecção é útil para caracterizá-las quanto à especificidade dentro do sistema ABO ou entre eritrócitos de animais. Testes de atividade hemaglutinante (AH) e inibição, fazendo uso de monossacarídeos simples ou complexos, glicoproteínas, glicoconjugados e polissacarídeos são frequentes na caracterização de lectinas, pois é um critério eficiente para classificar as lectinas em grupos de acordo com sua estrutura, a exemplo da fácil identificação de merolectinas, que não são capazes de aglutinar células, pois esse grupo possui apenas um sítio de ligação a carboidratos (MOURA, 2020). Esta interação das lectinas contribui para a escolha da matriz de afinidade ideal para a purificação das mesmas.

A avaliação da AH de lectinas em diferentes temperaturas, para a determinação da estabilidade é outra etapa na caracterização. Algumas lectinas são termossensíveis, outras termoestáveis, isso significa que tais proteínas têm sua atividade otimizada em determinadas temperaturas e atividade ausente ou minimizada em temperaturas desfavoráveis à manutenção da estrutura nativa. Algumas lectinas permanecem ativas até 55 - 65 °C e a partir de então, com a elevação da temperatura, a AH decai até tender a zero (CARRILLO et al., 2017).

Assim como a temperatura, o pH é um fator bastante influente na atividade das lectinas. Testes de hemaglutinação com a lectina de *Momordica charantia* (MCJ) no trabalho de Singh e Saxena (2013) mostraram que ela é ativa em valores de pH entre 3 e

11. A atividade hemaglutinante da MCJ aumenta com o aumento do pH e a atividade se torna máxima na faixa de pH de 5 a 8. Com o aumento do pH, a atividade hemaglutinante da MCJ diminuiu, mantendo menos de 50% de atividade de aglutinação em pH entre 10 e 11. Conclui-se que valores extremos de pH alteram a carga líquida da proteína, consequentemente, provocando a repulsão eletrostática e rompimento de algumas ligações de hidrogênio (SINGH; SAXENA 2013), estudos como o de Sun (2020) e Zhao (2019) comprovam esse fato, os baixos valores de pH utilizado em seus estudos indicaram mudanças estruturais em lectinas de feijão preto (*Phaseolus vulgaris L.*) além de diminuição da sua atividade, comprovada pelos baixos valores de AH encontrados.

Muitos outros métodos e ensaios, tais como a imunodifusão, a difusão dupla, a eletroforese bidimensional, a análise de aminoácidos, o sequenciamento de aminoácidos, os estudos de fluorescência, o dicroísmo circular a cristalização e a ressonância plasmonal de superfície também são metodologias importantes para a caracterização das lectinas, que podem ser realizadas a depender do interesse tecnológico em tais informações que essas análises nos trazem, assim como outras análises importantes que são reportadas com maior frequência, como a determinação de atividade antioxidante, hemolítica, antitumoral, gas troprotetora e a hemaglutinante já citada anteriormente.

Por causa da amplitude de propriedades e aplicações em diversas áreas, bem como, em pesquisa química e biológica, lectinas têm sido purificadas por métodos convencionais como cromatografias ou por eletroforese que se baseiam nos aspectos gerais das proteínas que são carga elétrica, tamanho e solubilidade, propriedades exibidas pelas mesmas, que variam de uma proteína para outra (COSTA, 2018). Além dos métodos convencionais existentes, encontram-se na literatura atualmente, diversas outras tecnologias de purificação, adaptações ou até combinações de métodos sempre visando à eficiência da purificação, seja no tempo, rendimento, custo ou aplicação biotecnológica posterior ao processo.

Estudos como o de Bellande (2020) comprovam este fato, onde o mesmo produziu lectinas recombinantes de *Arabidopsis thaliana* a partir de folhas de *Nicotiana benthamiana* com uma posterior purificação simples com base em uma precipitação diferencial com sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e após a precipitação foram combinadas três etapas cromatográficas sendo a terceira etapa realizada por cromatografia de íon metálico imobilizado com a finalidade de facilitar a caracterização bioquímica desse tipo de lectina. Já Golotin (2019) purificou uma nova lectina também recombinante de *Mytilus trossulus* em coluna de cromatografia por afinidade em condição semi- desnaturante, e utilizou a eletroforese SDS-PAGE para acompanhar o processo de purificação. Parthiban (2020) purificou a lectina larvicida do mosquito de *Annona muricata* e verificou seu efeito ecotóxico. Essa lectina foi purificada por cromatografia de troca aniônica usando uma resina de Dietilaminoetil celulose. com uma coluna do tipo CL-4B, a purificação também foi acompanhada por eletroforese SDS-PAGE, neste trabalho também foram feitas análises de Dicroísmo Circular (CD) para averiguar se houve alteração na estrutura e no enovelamento da proteína pós processo de purificação. Singh (2020) além de utilizar a cromatografia de troca aniônica em Q-Sefarose para seus estudos, também utilizou a cromatografia de exclusão em gel Sephadex G-100, onde verificou um purificado de 84,21%. Rathnasamy (2021) fez uma quantificação de cromatografia acoplada por microextração de fase líquida dispersiva assistida por ar para

purificação de lectina terapêutica de *Aloe vera* verificando seu potencial estimulador da imunidade para COVID-19, em seus estudos, obteve um índice de purificação de cerca de 85%, porcentagem que foi quantificada posteriormente através de cromatografia de exclusão por tamanho.

4.3.Purificação

A purificação de proteínas é fundamentada para os estudos das características físico-químicas, estruturais e propriedades biológicas, sendo estimulada pela sua potencial utilização em diversas áreas como a medicina clínica, pesquisa química, bioquímica e biológica (DA SILVA, 2018). As lectinas podem ser purificadas através de métodos convencionais como precipitação com sal ou ácido, extração por sistema aquoso e separações cromatográficas, como por exemplo, troca iônica e exclusão molecular ou por afinidade (HE et al., 2015).

4.4.Eletroforese SDS-PAGE

A eletroforese em gel de poli(acrilamida) (PAGE) pode ser realizada usando um gel contendo dodecilsulfato de sódio (SDS) ou B-mercaptoetanol, que sob condições redutoras revela o grau de pureza, a composição e a massa molecular de subunidades (MURUGESAN; GUNASAGARAN, 2021). A PAGE em condições nativas pode ser utilizada para caracterizar a proteína em relação a carga líquida. Os géis podem ser corados com comassie brilliant blue que detectam bandas polipeptídicas, ou com colorações específicas para glicoproteínas, como a coloração de Schiff (MURUGESAN; GUNASAGARAN, 2021).

4.5.Cromatografia de exclusão molecular

A cromatografia de exclusão molecular é uma técnica de cromatografia líquida na qual os analitos são separados de acordo com seu volume hidrodinâmico. A técnica foi inventada no início dos anos 1960 e, desde então, provou ser uma técnica ponderosa para análise e purificação de analitos de grande massa molar (PORATH, 1961). Uma vez que o tamanho das macromoléculas fornece informações sobre as características químicas, físicas, estruturais e biológicas das macromoléculas naturais e sintéticas, a SEC é uma técnica de rotina na indústria, análises clínicas e pesquisas acadêmicas com aplicações nas seguintes áreas: Polímeros sintéticos: representam um grupo muito amplo de materiais como plásticos, tecidos, revestimentos, aditivos e diversos produtos utilizados na indústria e no meio acadêmico (LUBOMIRSKY, 2021)

A cromatografia por exclusão é comumente usada como uma etapa de fracionamento

para remover proteínas e outros materiais que são menores ou maiores do que a proteína alvo. Uma amostra de proteína, contendo a proteína alvo a ser purificada, é aplicada ao topo da coluna e, em seguida, uma solução tampão flui lentamente. À medida que uma mistura de proteínas desce na coluna, os componentes da amostra se movem para baixo na coluna em tempos diferentes, dependendo de seu tamanho. A razão para a mobilidade diferente, é que moléculas de diferentes tamanhos têm habilidades diferentes para se difundir nos poros e, assim, moléculas de menor tamanho passam mais tempo na coluna, pois precisam percorrer todos os poros da coluna cromatográfica. Por outro lado, se uma proteína muito grande não possuir diâmetro suficiente para adentrar nos poros da coluna, será "excluída" e assim gastar um tempo menor para percorrer, pois ela eluirá apenas no que é chamado de volume vazio (V_0), cerca de um terço do volume total da coluna (BURGUESS, 2018).

4.6.Purificação de lectinas utilizando SAB

Alguns trabalhos são encontrados na literatura que utilizam o SAB para purificação ou extração de lectinas, Rashmi (2019) realizou extração seletiva de uma lectina específica de um cultivar indiano de sementes de *Pisum sativum*, onde utilizou sistemas de Polietilenoglicol/citrato, avaliando os fatores dos tipos e concentrações do sal, massa molar e concentração do polímero, pH e outros, verificando que a lectina foi extraída com alto rendimento para a fase rica em polímero. Soares (2011) purificou uma lectina de *Canavalia ensiformis* utilizando sistemas de PEG 8000/citrato, onde a purificação se direcionou para a fase rica em sal, com um fator de purificação de 11,5 e sua pureza confirmada por análise de SDS-PAGE. Nascimento (2010) fez a partição e recuperação da lectina de *Canavalia brasiliensis* por sistemas bifásicos aquosos usando metodologia de planejamento de experimentos onde utilizou um delineamento composto central para uma análise aprofundada dos fatores que influenciam a partição da ConBr nos sistemas bifásicos e condições que maximizam o rendimento de recuperação e o resultado final, encontrou como a condição mais favorável para recuperação sistemas compostos por 16,5% de peg 600 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ e 15% de tampão fosfato de potássio, pH 7,5. Nascimento (2013) separou e purificou lectina do extrato bruto de sementes de *Cratylia mollis* utilizando sistemas aquosos bifásicos e verificou que as lectinas apresentaram maior afinidade pela fase rica em sal. O parâmetro que teve maior efeito sobre o rendimento da atividade e o fator de purificação de lectinas na fase inferior, foi a concentração de sal (citrato de sódio). Os melhores resultados de purificação obtidos foram de 13,28% em um sistema composto por 20% citrato de sódio e 22% de PEG 8000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ a um pH de 5,0.

5. Lectinas Recombinantes

É bem conhecido que a maioria das pesquisas relacionadas à bioprospecção de novas lectinas enfatiza aquelas isoladas de fontes que sejam naturais (CAVADA et al., 2020). Entretanto, na área biomédica e também em outras áreas que envolvem sua aplicabilidade biológica, o uso dessas proteínas vai apresentar uma série de desvantagens, a começar pelo seu baixo rendimento, a necessidade de grande quantidade de biomassa para o trabalho, a presença de isoformas, ou glicofomas e variação lote a lote da lectina de acordo com a fonte, que promove uma heterogeneidade na propriedade de ligação da lectina a carboidratos. (GEMEINER, 2009, OLIVEIRA, 2014). A produção de lectinas por meio da tecnologia do DNA recombinante é, portanto, uma forma eficiente de superar esses obstáculos.

As cepas mais comumente utilizadas para a produção de proteínas recombinantes são as da *Escherichia coli*, que tem como vantagens frente a outros sistemas de expressão, as condições mais favoráveis para o crescimento e replicação celular, rápido acúmulo de biomassa, além de apresentar um procedimento simplificado de aumento de escala (CAVADA et al., 2020). Essas características justificam o fato de as células bacterianas serem o sistema de expressão mais comum.

Assim, conforme observado, a produção de lectinas recombinantes poderia preservar de forma eficiente as propriedades biológicas das lectinas do tipo selvagem, garantindo a aplicação dessas proteínas como ferramenta biotecnológica. Diversos estudos constatarem a produção das lectinas recombinantes, Agarwal (2020) realizou a produção de alto rendimento de cianovirina-N recombinante a partir de uma cepa de *Escherichia coli* selecionada e percebeu que a mesma mostrou atividade anti-HIV significativa, Keogh (2014) atuou na geração de novas lectinas procarióticas recombinantes de *Pseudomonas aeruginosa*, onde o foco do estudo foi alterar as propriedades de ligação a carboidratos por meio de mutagenese da proteína PA-IL, Nascimento (2020) realizou a produção heteróloga de cadeia α da lectina *Dioclea sclerocarpha* constatou uma maior versatilidade nas especificidades do açúcar e melhor eficácia em sua atividade nos modelos biológicos avaliados para essa nova lectina produzida, Chan (2018) realizou a clonagem e expressão do gene da lectina do cogumelo *Agrocybe aegeritae* verificou a atividade da lectina recombinante na resistência à infecção pelo vírus da síndrome da mancha branca do camarão, que mostrou atividade antiviral.

5.1. *Canavalia bonariensis* e sua forma recombinante rCaBo

A lectina de sementes de *Canavalia bonariensis* (denominada CaBo) é uma lectina específica de manose/glicose, apresenta uma cadeia denominada ‘ α ’ com massa de 26 kDa e duas bandas correspondentes aos fragmentos de ‘ β ’ e ‘ γ ’ com massa molecular aparente de

14 e 12 kDa, contendo uma sequência de 237 aminoácidos e com ponto isoelétrico (pI) em torno de 5.13 (CAVADA et al., 2018). Segundo o Ministério do Meio Ambiente (DOU 02/08/1999) a *Canavalia bonariensis*, uma espécie nativa da região Sul do país, está em fase de extinção desde 1999, fato este que dificulta uma melhor avaliação do potencial biotecnológico da lectina tipo selvagem. Estudos iniciais observaram que a CaBo constitui-se como uma mistura de cadeias intactas e fragmentos que se combinam entre si para formação das isolectinas (DA SILVA, 2019). A heterogeneidade de moléculas biológicas com a presença de isoformas pode influenciar diretamente no seu potencial biológico. Assim, diante do potencial biotecnológico apresentado pela lectina de *Canavalia bonariensis* e das dificuldades em se trabalhar com a lectina tipo selvagem devido a escassez do material biológico e da obtenção de sementes, existe a necessidade de se produzir uma isoforma da CaBo formada apenas pela proteína no seu estado mais ativo, de modo recombinante e expressa em sistema heterólogo. A capacidade de expressar e purificar uma proteína na sua forma recombinante permite a obtenção da proteína homogênea e em grande quantidade possibilitando sua caracterização estrutural, caracterização biológica, e também como seu uso como possível ferramenta biotecnológica em escala laboratorial ou mesmo industrial (ROSANO; CECCARELLI, 2014). A rCaBo é expressa em *Escherichia coli* e suas características como a especificidade à carboidrato da CaBo selvagem não são alteradas, portanto ela ainda é específica de manose/glicose e outras características como o peso, ponto isoelétrico e sequência de amino-ácidos também não sofrem mudanças após o processo de expressão.

6. Aplicações biotecnológicas

Citando os gêneros mais mencionados em estudos como detentores de um grande potencial biotecnológico, temos a *Canavalia* e a *Dioclea*, que são gêneros da subtribo *Dioclenae*. O gênero *Canavalia* se diferencia dentro da tribo *Diocleinae*, a qual pertence, por diversas características morfológicas e essas características permitem que sua identificação seja obtida de forma mais rápida entre os demais gêneros que fazem parte desta subtribo.

Dentro desse gênero temos a *Canavalia brasiliensis* (ConBr), que é uma lectina com uma afinidade para manose/glicose, sendo isolada a partir de sementes de *C. brasiliensis*, o feijão brasileiro. Estudos dessa lectina mostram que ela pode atuar como potencial inibidor da ativação do receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA) (PEREIRA, 2019), também pode atuar com efeitos neuroprotetores contra a excitotoxicidade do glutamato (JACQUES, 2013). A *Canavalia boliviana*, outra lectina desse gênero, demonstrou efeito antinociceptivo, em alguns estudos como o de Figueiredo (2009), que é o efeito que anula ou

reduz a percepção e transmissão de estímulos que causam dor, porém não se sabe ainda explicar o mecanismo de como isso acontece. Teixeira (2006) mostrou a eficácia da lectina *Canavalia grandiflora* para inibir a adesão dos microrganismos *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mitise* e *Streptococcus oralis*. Farias (2013) verificou que a lectina *Canavalia marítima*, apresenta propriedade anti-inflamatória e analgésica, inibe o crescimento de determinadas cepas de leveduras.

Dentre as inúmeras espécies existentes, temos a *Canavalia bonariensis* Lindl. Que é uma espécie vegetal nativa da região sul do Brasil, presente principalmente no Rio Grande do Sul. É pertencente à família *Leguminosae* (*Fabaceae*), subfamília *Papilionoideae* e tribo *Phaseoleae* e subtribo *Diocleinae*. Segundo o Ministério do Meio Ambiente (DOU 02/08/1999) a *Canavalia bonariensis* é uma espécie nativa da região Sul do país e está em fase de extinção desde 1999. (DA SILVA, 2015). Está presente em estudos na sua forma selvagem, como o de Cavada et al. (2018) que verificou o potencial antiglioma da sua forma selvagem e os resultados sugeriram que a CaBo interage com alvos celulares glicosilados e induz uma notável atividade antiglioma. Entretanto, devido ao processo de extinção que acomete essa espécie, os estudos para essa forma, são cada vez mais escassos. Surge assim a imediata necessidade de produção e caracterização dessas lectinas na sua forma recombinante.

7. Objetivo

7.1. Objetivo geral:

Estudo de equilíbrio de fases de sistemas aquosos formados por polietilenoglicol 4000 ou 6000 g·mol⁻¹ e sal fosfato de potássio K₂HPO₄ e da aplicação destes na pré-purificação da lectina recombinante rCaBo.

7.2. Objetivos específicos:

- a. Predizer parâmetros de interação entre os grupos de contribuição presentes nos sistemas em estudo através do modelo UNIFAC;
- b. Determinar os parâmetros da partição da lectina nos SAB;
- c. Verificar qual polímero e quais concentrações deste e do fosfato de potássio formam um sistema mais estável e melhor para esse tipo de purificação;
- d. Avaliar a eficiência da pré-purificação das lectinas por meio de SAB.

8. Metodologia

8.1. Local do experimento

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

8.2. Modelagem termodinâmica

8.2.1. Determinação do efeito salting-out

O efeito salting-out foi determinado utilizando a equação modificada de Setschenow (Eq. (10)) que correlaciona os dados das linhas de amarração dos sistemas em estudo.

$$\ln\left(\frac{w_1^t}{w_1^b}\right) = \beta + k(w_2^b - w_2^t) \quad (17)$$

Em que: w é a fração mássica para os componentes que formam as fases dos SAB. “1” e “2” referem-se ao PEG 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).

8.2.2. 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 assim simular a formação do SAB a partir dos parâmetros obtidos. A princípio, foi realizado a divisão dos componentes em grupos de contribuição. Na Tabela 1 estão representados os parâmetros de volume (R_K) e área (Q_K) de cada grupo de contribuição.

Tabela 1. 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
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 Debye-Hückel (Eq. (17)). Nessa abordagem o sal é considerado como um grupo formado por cátion e ânion.

$$\ln\gamma_n = \ln\gamma_n^{D-H} + \ln\gamma_n^C + \ln\gamma_n^R \quad (18)$$

Sendo

$$\ln\gamma_i = \frac{G^E}{RT} \quad (19)$$

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 Debye-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. (20) como descrito por Macêdo et al. (1990).

$$\ln\gamma_n^{D-H} = \frac{G_{D-H}^E}{RT} = \frac{2AM_n d_s}{b^3 d_n} \left[1 + b\sqrt{I} - \frac{1}{1 + b\sqrt{I}} - 2\ln(1 + b\sqrt{I}) \right] \quad (20)$$

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. (21):

$$d_s = \frac{M_s}{\sum_n x'_n M_n / d_n} \quad (21)$$

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

Os parâmetros A e b são dados pelas Eqs. (21) e (22) (KIKIC et al., 1991).

$$A = 1.327757 \cdot 10^5 d_s^{1/2} / (\epsilon T)^{3/2} \quad (22)$$

$$b = 6.359696 d_s^{1/2} / (\epsilon T)^{1/2} \quad (23)$$

A parte combinatorial do modelo UNIFAC é calculada por meio da Eq. (24):

$$\ln \gamma_n^C = \frac{G^E}{RT} = \ln \frac{\varphi_i}{x_i} + \frac{z}{2} q_i \ln \frac{\theta_i}{\varphi_i} + l_i - \frac{\varphi_i}{x_i} \sum_j X_j l_j \quad (24)$$

Em que:

$$\varphi_i = \frac{r_i x_i}{\sum_j r_j x_j} \quad (25)$$

$$\theta_i = \frac{q_i x_i}{\sum_j q_j x_j} \quad (26)$$

$$l_i = \frac{z}{2} (r_i - q_i) - r_i + 1 \quad (27)$$

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:

$$r_i = \sum_k V_k^{(i)} R_k \quad (28)$$

$$q_i = \sum_k V_k^{(i)} Q_k \quad (29)$$

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

$$R_k = \frac{V_{wk}}{15,17} \quad (30)$$

$$Q_k = \frac{A_{wk}}{2,5 \times 10^9} \quad (31)$$

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 $2,5 \times 10^9$ foram determinados por Abrams e Prausnitz (1975), correspondendo ao volume e à área superficial externa de uma unidade CH₂ em polietileno.

A contribuição da parte residual é calculada por meio da Eq. (31):

$$\ln \gamma_i^R = \frac{G^E}{RT} = \sum_K v_k^{(i)} (\ln \Gamma_k - \ln \Gamma_k^{(i)}) \quad (31)$$

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. (32):

$$\ln \Gamma_k = Q_k \left[1 - \ln(\sum_m \theta_m \Psi_{mk}) - \sum_m \frac{\theta_m \Psi_{km}}{\sum_n \theta_n \Psi_{nm}} \right] \quad (32)$$

Em que θ_m é a fração de área do grupo m , que pode ser calculada pela Eq. (33).

$$\theta_m = \frac{Q_m X_m}{\sum_n Q_n X_n} \quad (33)$$

X_m é a fração molar do grupo m na mistura, conforme mostra a Eq. (34).

$$X_m = \frac{\sum_i^M V_m^{(i)} X_i}{\sum_i^M \sum_j^N V_j^{(i)} X_i} \quad (34)$$

Os termos do tipo Ψ_{mk} , que aparecem na Eq. (32) são os parâmetros de interação energética entre os grupos i e j , dados pela Eqs. (35) e (36).

$$\tau_{ij} = \exp \left[-\frac{u_{ij} - u_{ji}}{RT} \right] = \exp \left(-\frac{a_{ij}}{T} \right) \quad (35)$$

$$\tau_{ij} = \exp \left[-\frac{u_{ji} - u_{ij}}{RT} \right] = \exp \left(-\frac{a_{ji}}{T} \right) \quad (36)$$

Onde: 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. (37)).

$$S = \sum_k^D \sum_j^M \sum_i^{N-1} \left\{ (x_{ijk}^{I,exp} - x_{ijk}^{I,calc})^2 + (x_{ijk}^{II,exp} - x_{ijk}^{II,calc})^2 \right\} \quad (37)$$

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.

$$\delta x = 100 \sqrt{\frac{\sum_j^M \sum_i^{N-1} \{ (x_{ijk}^{I,exp} - x_{ijk}^{I,calc})^2 + (x_{ijk}^{II,exp} - x_{ijk}^{II,calc})^2 \}}{2MN}} \quad (38)$$

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 da fase líquida.

8.3. Partição das Lectinas

8.3.1. Material

Polietilenoglicol 4000 g·mol⁻¹ (CAS No. 25322-68-3), 6000 g·mol⁻¹ (CAS 25322-68-3) foram adquiridos da Sigma. O fosfato de potássio bibásico (K₂HPO₄) (CAS No. 7558-79-4) e ácido fosfórico (H₃PO₄) (CAS No. 7664-38-2) foram adquiridos da Synth, Brazil. A lectina recombinante rCABO foi adquirida através de uma parceria formada com os pesquisadores do Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (BioMol-Lab) da Universidade Federal do Ceará (UFC), onde as mesmas foram produzidas. 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.

8.3.2. Características rCaBo

A partir da lectina nativa, com todos as suas informações expostas, nos foi enviado através da parceria com pesquisadores do BioMol-Lab, da Universidade Federal do Ceará uma lectina recombinante obtida a partir de uma expressão em *Escherichia coli*, que apresenta uma construção complexa. A chamada rCabo, teve sua construção através de uma ligação com sequência de 6 amino-ácidos de histidina, juntamente com uma proteína chamada NusA.tag (proteína de bactéria expressa em *E. coli*), um sítio de enteroquinase e o gene da cadeia alfa da lectina *Canavalia bonariensis* selvagem. A histidina, também conhecida como “calda de purificação” é utilizada para a purificação da rCaBo em matriz de “Histrap”, contendo níquel em sua composição (ligante).

A proteína de bactéria NusA.tag participa da construção, uma vez que a rCabo, se expressa sozinha na *Escherichia coli*, iria ser formado um agregado hidrofóbico, uma vez que a mesma não detém de muitos amino-ácidos hidrofílicos em sua estrutura. Após a proteína

ser expressa, utiliza-se uma enzima (Enterokinase) para fazer a clivagem das ligações para obtenção da Nusa + histidida e a rCaBo, que logo após é purificada e obtida a proteína recombinante de *Canavalia bonariensis*, Após todo o processo, é originado a lectina do presente estudo, com pI em torno de 4,68 e peso de 81,79kDa.

8.3.3. Montagem dos sistemas aquosos bifásicos

Os SAB's utilizados na partição da lectina rCABO foram formados por PEG(4000 e 6000) + fosfato de potássio + água em diferentes temperaturas (20, 25, 30 e 35) °C, pH 7,0 e pressão atmosférica. Os pontos globais para partição foram selecionados apartir dos estudos de Muniz (2021) e estão representados na Tabela 2.

Tabela 2. Composição global dos sistemas formado por PEG (4000 e 6000) + K₂HPO₄/H₃PO₄ + água e álcool + K₂HPO₄/H₃PO₄ + água, expressas em fração mássica, para as temperaturas de 20, 25, 30 e 35°C.

Ponto global	PEG	Sal
1	0,130	0,090
2	0,130	0,100
3	0,150	0,100
4	0,150	0,110
5	0,170	0,120

Foram pesadas quantidades apropriadas dos componentes até uma massa final de 40 g, em tubos graduados de 50 mL. Foram preparadas soluções estoque do sal (K₂HPO₄/H₃PO₄) 23 % (m/m) e de PEG 50 % (m/m). Os sistemas foram formados com quantidades adequadas de PEG + solução salina + água para uma massa total de 40 g. Todos os componentes foram pesados em balança analítica (Modelo M254A, BEL ENGINEERING, Brasil) com uma precisão de ± 0,0001 g. Os tubos contendo os sistemas foram agitados vigorosamente em vortex (Modelo AP-56, PHOENIX, Brasil) por 10 minutos e então centrifugados (Modelo SP701, SP LABOR, Brasil) a 3500 g por 10 minutos, para acelerar a separação de fases. Os tubos foram mantidos em repouso, durante 24 horas em estufa B.O.D (Modelo LG340 FT220, LONGEN SCIENTIFC, 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.

Após as fases se separarem pela diferença de densidade, foram coletadas com auxílio de seringas estéreis, para posterior formação de novos sistemas com quantidade menor das

soluções estoque, estes já para o processo de partição. O pH da solução salina de fosfato de potássio foi ajustado para 7,0 antes da montagem dos sistemas de partição, com ácido fosfórico e conferido em pHmetro de bancada (Modelo Q400MT, QUIMIS, Brasil).

8.3.4. Cromatografia de Exclusão molecular

Os experimentos cromatográficos foram realizados em um cromatógrafo HPLC, marca Shimadzu (Kyoto, Japan), modelo SPD-20A, equipado com detector UV-DA e de injeção automática. O controle do instrumento, aquisição de dados e análise de dados foram realizados usando o software Shimadzu LCsolution Analysis Report.

A coluna de exclusão utilizada foi SRT-C SEC (5 μ m, 150 Å, SN: 7A13071, LN: BS023) que foi adquirida da Sepax Technologies (Newark, USA). A dimensão da coluna é de 4,6mm x 300mm. Seis proteínas padrão foram escolhidas para este estudo. As seis moléculas foram BSA (MM: 66,4 kDa), Quimosina (MM: 35,6 kDa), β -caseína (MM: 24 kDa), β -Lactoalbumina (MM: 18,4 kDa), Lisozima (MM: 14,8 kDa), α -Lactoalbumina (MM: 14,2 kDa). O comprimento de onda que foram utilizados para detectar a proteína foram de 215 e 280nm. O sistema foi operado em um modo de eluição isocrática de solvente e bomba única, em tampão de fosfato de sódio 0,02M (pH 7) e taxa de fluxo de 0,2 mL / min.

8.3.5. Partição da lectina

Após ter atingido o equilíbrio, as fases foram coletadas com seringas, pesadas e armazenadas em recipientes com tampa sob refrigeração até que todas as análises de determinação de teor de proteína fossem realizadas. Para montagem dos sistemas de partição, foi preparado uma solução da lectina rCaBo em água destilada com uma concentração conhecida de modo que, em cada tubo graduado de 15 mL contivesse 1mg de proteína. Em seguida, adicionou-se 2,0 mL de fase superior e 2,0 mL de fase inferior. Os sistemas foram submetidos à agitação e, então, centrifugados a 3500g 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, sendo a mesma também coletada com seringas se atentando a coletar o mínimo de fases possível, garantindo a retirada de toda a proteína suspensa na região. A interface foi re-suspensa com água destilada para um peso de 1,5g. Então, determinou-se o teor de proteína nas fases e na interface re-suspendida.

8.3.6. Determinação do teor de proteína

A concentração de proteína nas fases e na interface foi determinada por cromatografia de exclusão molecular com uma coluna SRT-C SEC, onde as amostras após a

partição foram coletadas e filtradas em filtros de Seringa (Filtrilo 0,45µm) em Nylon. Após a filtragem, as amostras das fases superior, fase inferior e interface, de todas as linhas de amarração e temperaturas, foram acomodadas em Vials limpos e secos, em seguida submetidos ao banho ultrasônico por um período de 15 minutos a temperatura ambiente. Foi utilizada a lectina em solução tampão fosfato de potássio 0,02M em diferentes concentrações como padrão. Em seguida, os Vials contendo as amostras filtradas e sônicas foram submetidas a cromatografia. A leitura foi realizada a uma faixa de absorvância de 215nm e 280nm. As áreas dos picos no tempo de retenção característico da lectina foram observadas para determinação dos parâmetros de partição.

8.4.Determinação dos parâmetros de partição

8.4.1. 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 (Eq. (39)).

$$K_p = \frac{C_t}{C_b} \quad (39)$$

8.4.2. Recuperação teórica

A recuperação teórica (%Y) é uma variável que avalia a eficiência da partição de acordo com a quantidade de proteína presente na fase preferencial, ou seja, o rendimento da extração utilizando SAB, %Y foi determinada de acordo a (Eq.(40)).

$$\%Y = \frac{1}{1+1/RK_p} \quad (40)$$

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

8.4.3. Avaliação dos parâmetros termodinâmicos de transferência

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 (Eq.(41)):

$$\Delta_{tr}G = -RT\ln K_p \quad (41)$$

Onde: T é a temperatura absoluta de estudo da partição; R é a constante dos gases ideais; K_p é o coeficiente de partição de proteínas totais.

Foi estudada a partição da BSA em quatro temperaturas. A partir dos valores dos

coeficientes de partição de proteínas totais (K_p) 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 $1/T$ através de uma expressão polinomial, representada pela (Eq. (42)):

$$\ln K_p = a + b \cdot \left(\frac{1}{T}\right) + c \cdot \left(\frac{1}{T}\right)^2 + \dots \quad (42)$$

Em que: a , b e c são os parâmetros de ajuste da equação polinomial do gráfico $1/T$ versus $\ln K_p$; e $\ln K_p$ é o valor do logaritmo natural da constante de partição. Assim, é possível determinar a variação de entalpia de transferência ($\Delta_{tr}H$) associada ao processo de partição por meio da (Eq. (43)):

$$\Delta_{tr}H = -R \cdot \left[b + 2c \cdot \left(\frac{1}{T}\right) + \dots \right] \quad (43)$$

A variação da entropia de transferência ($\Delta_{tr}S$) foi determinada por diferença utilizando a Equação geral da energia livre de Gibbs (Eq. (44)):

$$\Delta_{tr}G = \Delta_{tr}H - T\Delta_{tr}S \quad (44)$$

8.4.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS

O comportamento da lectina e a estimativa da massa molecular aparente das subunidades da lectina foram observadas por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE), de acordo com o protocolo estabelecido por Laemmli (1970) com algumas adaptações. O gel de corrida foi montado a uma concentração de 12,0% preparado em tampão Tris-HCl 0,1 mol/L pH 8,8, contendo SDS 1%, persulfato de amônio 0,1%, TEMED 0,04%. O gel superior ou de empilhamento foi preparado a 5% usando acrilamida em tampão Tris-HCl 0,1 mol/L pH 6,8, SDS 1%, persulfato de amônio 0,1% e TEMED 0,04%. O extrato protéico bacteriano total foi solubilizado em solução desnaturante a uma proporção 1:2 e 1:4, de proteína:solução, em tampão de amostra contendo Tris-HCl 1 mol pH 6,8, 5% de glicerol, 1% de azul de bromofenol e 10% de SDS. Foram aplicados 30 μ l da solução de proteína em cada poço. A corrida eletroforética foi realizada em sistema Mini-PROTEAN®vertical (BioRad; Milão, Itália) com a voltagem de 100 V, a 4°C por um tempo de cerca de 240 min. Os marcadores de massa molecular utilizados foram: Miosina (200,0 kDa), 3-galactosidase (116,2 kDa), fosforilase b (97,4 kDa), albumina de soro bovino (66,2 kDa), ovalbumina (45,0 kDa), anidrase carbónica (31,0 kDa), inibidor de tripsina (21,5 kDa), lisozima (14,5 kDa, mas com peso molecular aparente de 15,5 kDa), e aprotinina (6,5 kDa) (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Após a corrida, as proteínas foram coradas usando 0,1% (p/v) de Coomassie Blue G-250 (Vetec) e a retirada do excesso do corante (descoramento) foi

feita com solução descorante de 30% (v / v) de etanol (Vetec) e Ácido acético a 7,5% (v/v) (Vetec) contendo 40% de metanol e 20% de ácido acético.

9. Resultados

9.1. Linhas de amarração

Nas Tabelas 3 e 4 são mostradas as composições de equilíbrio (em fração mássica) dos sistemas compostos por PEG (4000 ou 6000) + K₂HPO₄/H₃PO₄ para as 4 temperaturas de estudo, previstas pelo modelo UNIFAC, que foram obtidas a partir da utilização de dados de entrada, das curvas binodais determinadas experimentalmente por Muniz (2021).

Tabela 3. Dados das linhas de amarração, em unidade de fração mássica, das fases dos SAB PEG 4000 [w1] + K₂HPO₄/H₃PO₄ [w2] + H₂O, para 20, 25, 30 e 35 °C, pH 7.0 e p = 0.1 MPa.

LA	Composição glogal		Fase superior		Fase inferior	
	w ₁	w ₂	w ₁	w ₂	w ₁	w ₂
20°C						
1	0,1300	0,0900	0,2450	0,0417	0,0101	0,1404
2	0,1300	0,1000	0,2884	0,0332	0,0053	0,1526
3	0,1500	0,1000	0,3054	0,0303	0,0024	0,1662
4	0,1500	0,1100	0,3546	0,0231	0,0016	0,1730
5	0,1700	0,1200	0,3951	0,0186	0,0003	0,1964
25°C						
1	0,1300	0,0900	0,2408	0,0438	0,0075	0,1411
2	0,1300	0,1000	0,2736	0,0370	0,0031	0,1556
3	0,1500	0,1000	0,3106	0,0303	0,0017	0,1643
4	0,1500	0,1100	0,3427	0,0254	0,0008	0,1755
5	0,1700	0,1200	0,3668	0,0223	0,0001	0,2044
30°C						
1	0,1300	0,0900	0,2600	0,0348	0,0048	0,1432
2	0,1300	0,1000	0,3033	0,0270	0,0025	0,1537
3	0,1500	0,1000	0,3228	0,0240	0,0012	0,1655
4	0,1500	0,1100	0,3631	0,0187	0,0006	0,1740
5	0,1700	0,1200	0,3969	0,0151	0,0001	0,1986
35°C						
1	0,1300	0,0900	0,26940	0,0312	0,004	0,143

2	0,1300	0,1000	0,3177	0,0242	0,0027	0,1514
3	0,1500	0,1000	0,3252	0,0232	0,0012	0,1652
4	0,1500	0,1100	0,3435	0,0208	0,0005	0,1789
5	0,1700	0,1200	0,3978	0,0146	0,0001	0,1986

Tabela 4. Dados das linhas de amarração, em unidade de fração mássica, das fases dos SAB PEG 6000 [w1] + K₂HPO₄/H₃PO₄ [w2] + H₂O, para 20, 25, 30 e 35 °C, pH 7.0 e p = 0.1 MPa.

LA	Composição glogal		Fase superior		Fase inferior	
	w ₁	w ₂	w ₁	w ₂	w ₁	w ₂
20°C						
1	0,1300	0,0900	0,2563	0,0355	0,0047	0,1440
2	0,1300	0,1000	0,3148	0,0259	0,0031	0,1509
3	0,1500	0,1000	0,3385	0,0228	0,0016	0,1608
4	0,1500	0,1100	0,3481	0,0217	0,0005	0,1767
5	0,1700	0,1200	0,4118	0,0156	0,0001	0,1933
25°C						
1	0,1300	0,0900	0,2715	0,0340	0,0037	0,1398
2	0,1300	0,1000	0,2866	0,0314	0,0010	0,1564
3	0,1500	0,1000	0,3241	0,0256	0,0005	0,1637
4	0,1500	0,1100	0,3361	0,0241	0,0001	0,1792
5	0,1700	0,1200	0,3643	0,0208	0,0000	0,2067
30°C						
1	0,1300	0,0900	0,2811	0,0294	0,0050	0,1401
2	0,1300	0,1000	0,3119	0,0250	0,0025	0,1526
3	0,1500	0,1000	0,3347	0,0219	0,0014	0,1628
4	0,1500	0,1100	0,3726	0,0173	0,0008	0,1721
5	0,1700	0,1200	0,4045	0,0139	0,0002	0,1969
35°C						
1	0,1300	0,0900	0,2839	0,0273	0,0009	0,1426
2	0,1300	0,1000	0,3267	0,0218	0,0004	0,1515
3	0,1500	0,1000	0,3383	0,0205	0,0002	0,1633
4	0,1500	0,1100	0,3624	0,0179	0,0000	0,1750
5	0,1700	0,1200	0,3778	0,0164	0,0000	0,2047

9.2. Modelagem Termodinâmica dos SAB's

Os dados das linhas de amarração foram utilizados para estimar novos parâmetros de interação de grupo pelo modelo UNIFAC modificado por Kikic et al (1991). Para esta estimativa foram necessários parâmetros de volume e área R_k e Q_k , descritos na Tabela 1, utilizados como parâmetros de entrada. Na Tabela 5 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 nas diferentes temperaturas estudadas.

O comportamento dos diagramas de equilíbrio pode ser melhor entendido por meio dos parâmetros e das interações entre os grupos de contribuição dos componentes formadores do sistema. De acordo com os valores de energia de interações obtidos na Tabela 5, pode-se observar que as interações dos grupos de contribuição do sal (K_2HPO_4) com a água foram maiores que as energias de interações dos grupos do PEG (CH_2CH_2O) com a água. Como a energia de interação dos grupos de contribuição do PEG com a água é menor, a água tende a migrar mais facilmente para a fase inferior do sistema, podendo mostrar uma maior afinidade dos íons com a água. Isso ocorre em virtude da maior interação dos ânions que são moléculas polares com a molécula de água que também é uma molécula polar, enquanto que o grupo do PEG que é fracamente polar, apresenta menor interação eletrostática com a molécula de água. Pode-se inferir ainda, que essa maior hidratação dos íons resulta em maiores valores de *salting-out*, o que é mostrado na Tabela 6, facilitando a separação de fases, resultando em menores concentrações de sal para formar o sistema.

A energia de interação entre a molécula de água e o íon K^+ (9382,509; 7098,162; 6441,126; 5192,459) $J.mol^{-1}$ para as temperaturas de 20, 25, 30 e 35°C respectivamente, foi significativamente maior do que as energias provenientes das outras interações.

Conforme esse resultado é possível deduzir que, em todos os sistemas estudados, a habilidade *salting-out* do sal formador dos SAB (K_2HPO_4/H_3PO_4) é devido principalmente à forte interação água-cátion, que resulta na elevada tendência de migração das moléculas de água para a fase inferior. Essa energia sofre pequena redução na medida em que a temperatura aumenta, mostrando sensibilidade da interação frente a variação positiva de temperatura dos sistemas.

Tabela 5. 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 e 6000 + $K_2HPO_4/H_3PO_4 + H_2O$ à 20, 25, 30 e 35 °C.

Grupo i	Grupo j	a_{ij} (K)	a_{ji} (K)	20°C		25°C		30°C		35°C	
				T_{ij} (J.mol ⁻¹ ₁)	T_{ji} (J.mol ⁻¹ ₁)	T_{ij} (J.mol ⁻¹ ₁)	T_{ji} (J.mol ⁻¹ ₁)	T_{ij} (J.mol ⁻¹ ₁)	T_{ji} (J.mol ⁻¹ ₁)	T_{ij} (J.mol ⁻¹ ₁)	T_{ji} (J.mol ⁻¹ ₁)
CH ₂	CH ₂ CH ₂ O	-248.54 ^a	1633.9 ^a	2,453364	0,037097	2,163006	0,009416	2,217870	0,004563	2,214078	0,09048
CH ₂	OH	644.60 ^b	328.20 ^b	0,191028	0,362422	0,151095	0, 233609	0,127193	0,383703	0,12436	0,374405
CH ₂	HPO ₄ ⁻²	-0.1357*	-32.503*	0,839952	1,22E-09	0,983979	2,17E-09	0,949806	1,02E-09	0,899432	3,15E-09
CH ₂	K ⁺	100.47*	2211.3*	0,078846	0,022006	0,015903	0,02600	0,018595	0,002098	0,089887	0,00340
CH ₂	H ₂ O	-159.82*	524.59*	0,180106	0,831010	0,027176	0,331703	0,037128	0,332097	0,047117	0,320794
CH ₂ CH ₂ O	OH	455.40 ^a	191.63 ^a	0, 112513	0,252012	0,270195	0,525855	0,262234	0,153459	0,822127	0,593638
CH ₂ CH ₂ O	HPO ₄ ⁻²	-125.01*	-119.65*	1,183536	0,997678	1,450319	0, 746492	1,433859	0,878687	1,332143	0,616837
CH ₂ CH ₂ O	K ⁺	20040*	2951.1*	3,17E-08	0,015666	6,13E-08	0,670197	6,5E-08	0,960179	8,81E-08	0,011979
CH ₂ CH ₂ O	H ₂ O	1142.1*	-147.74*	0,40870	1,141619	0, 510315	1,21115	0,085391	1,201102	0,605506	1,103821
OH	HPO ₄ ⁻²	-876.42*	1050.7*	27,48200	0,204780	200,8329	0,470253	253,4372	0,02631	277,047	0,01279
OH	K ⁺	68.675*	2335.1*	0,106111	0,070457	0,140071	0,050022	0, 811943	0,500091	0,112234	0,060067
OH	H ₂ O	28.730 ^b	-122.40 ^b	0,964050	1, 851283	0,819036	1,765019	0,99581	1,744945	0,99108	1,467867
HPO ₄ ⁻²	K ⁺	-212.99 ^c	-668.67 ^c	2,079640	9,67829	2,204903	2,901412	2,918974	9,690764	1,909688	8,745784
HPO ₄ ⁻²	H ₂ O	1411.0*	2999.9*	0,042467	0,235143	0,460643	0,05027	0, 904062	0,042662	0,052151	0,052826
K ⁺	H ₂ O	-497.84*	-790.19*	0,137746	9382,509	0,817921	7098,162	0,148072	6441,126	0,198917	5192,459

Parâmetros estimados; a Dados obtidos de Sampaio et al. (2019); b Dados obtidos de Yan et al. (1999); c Dados obtidos de Haghtalab e Mokhtarani (2004).

9.3.Efeito salting-out

Visando um melhor entendimento do comportamento dos sistemas aquosos e de como os componentes afetam o processo de formação de fases, foi avaliado o efeito *salting-out* do sal K_2HPO_4/H_3PO_4 . Os parâmetros de ajuste (β e k) do efeito salting-out (Eq.17) são apresentados na Tabela 6. 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 6. Parâmetros de ajuste (β e k) do efeito *salting-out* para os SAB PEG (4000 ou 6000) + K_2HPO_4/H_3PO_4 + H_2O , à 20, 25, 30 e 35°C, pH 7.0 e $p = 0.1$ MPa.

20°C				
PEG	k	β	R^2	sd^b
4000	49,216	-1,726	0,977	0,375
6000	56,112	-3,197	0,991	0,565
25°C				
4000	56,771	-2,005	0,990	0,393
6000	61,441	-4,4637	0,994	0,337
30°C				
4000	48,953	-1,4912	0,998	0,075
6000	80,985	-2,353	0,994	0,369
35°C				
4000	53,909	-2,401	0,990	0,420
6000	137,31	-11,116	0,983	1,114

Através do cálculo da habilidade *salting-out* dos sistemas conseguimos avaliar a afinidade entre os componentes formadores dos sistemas PEG/sal. (MUNIZ, 2021). Foi observado que estes sistemas apresentaram valores elevados coeficiente *salting-out* (k), em comparação com trabalhos que utilizam outros tipos sais, como o citrato de sódio, de acordo com Nascimento (2018), por exemplo, que estudou o equilíbrio termodinâmico da partição da α -amilase em sistemas aquosos bifásicos.

Esse resultado pode ser associado ao tipo de interações presentes nas moléculas de PEG e do fosfato de potássio K_2HPO_4/H_3PO_4 , uma vez que o efeito *salting-out* desse tipo de sal é bastante significativo. Herbst e Pott (2019) avaliou o efeito salting-out de sais de tártaro de sódio e potássio em sistemas formados por PEG 6000, 8000 e 10000 onde observou que os valores de salting-out (k) aumentam proporcionalmente ao aumento da massa molar do

polímero estudado, pois PEG's com maior massa molecular tendem a apresentar maiores valores de volume efetivo de exclusão, possuindo mais interações polímero-polímero, se tornando menos disponíveis para interagir com as moléculas de água presentes no meio, com isso o efeito *salting-out* aumenta pois a água expulsa pelo PEG fica disponível para realização de mais interações sal-água, e assim a proteína realiza menos interações proteína-sal no sistema. Em relação ao efeito da temperatura na variação do parâmetro, também foram observadas correlações de aumento destes parâmetros na medida em que se aumenta a temperatura. Na medida em que há variação positiva de temperatura, espera-se que haja exatamente o comportamento observado o parâmetro *salting-out*, pois quanto maior a energia do sistema, mais interações íon-água estarão acontecendo e por consequência, maiores valores do parâmetro serão alcançados. A maior hidrofobicidade do PEG 6000 diminui a disponibilidade deste polímero para interações com as moléculas de água

A Figura 3 ilustra as linhas de amarração obtidas por Muniz (2021), confrontadas com as obtidas através dos cálculos pelo modelo UNIFAC. Na Tabela 7 estão presentes os valores de desvios médios de cada sistema, assim como também os desvios médios globais para cara PEG. O modelo UNIFAC apresentou um ajuste satisfatório dos sistemas analisados, fato esse que é mostrado pelas linhas contínuas (determinadas experimentalmente) e pontilhadas (determinadas pelo modelo) e os baixos desvios alcançados tanto para o PEG 4000 quanto para o 6000. Não foi observado diferença nos desvios médios para uma variação de temperatura. Isso indica que os novos parâmetros de interação estimados no presente trabalho podem ser utilizados para prever dados de equilíbrio líquido-líquido confiáveis para sistemas formados PEG 4000 e 6000 + K_2HPO_4 + H_2O para todas as temperaturas estudadas.

Figura 3. Linhas de amarração obtidas experimentalmente (—) e previstas pelo modelo UNIFAC (- - -) expressas em unidade de fração mássica, PEG 4000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ [w1] + $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ [w2] + água em (A) 20°C, (B) 25°C, (C) 30°C, (D) 35°C e PEG 6000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ [w1] + $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ [w2] + água em (E) 20°C, (F) 25°C, (G) 30°C, (H) 35°C, pH 7.0 e $p = 0,1\text{MPa}$.

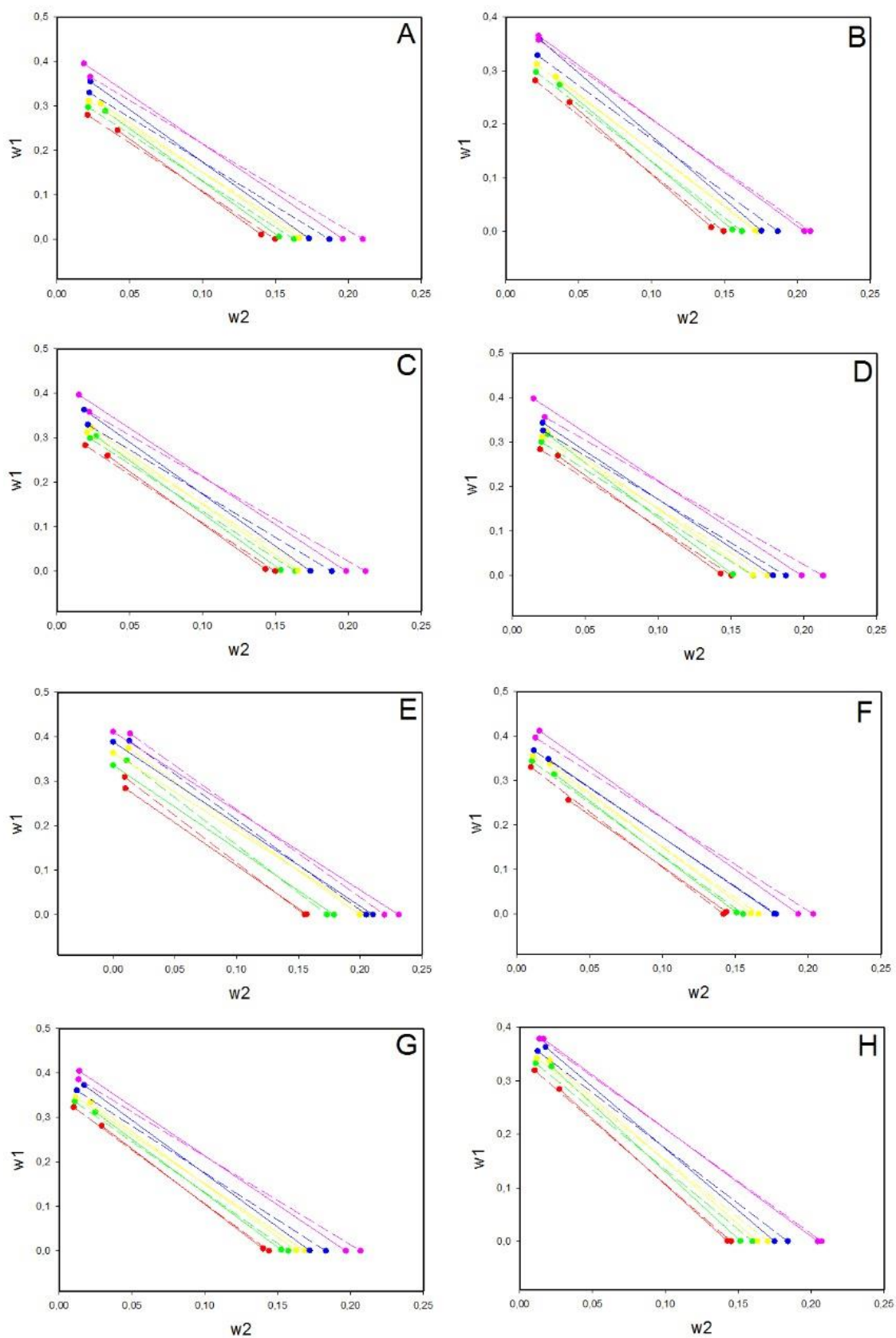
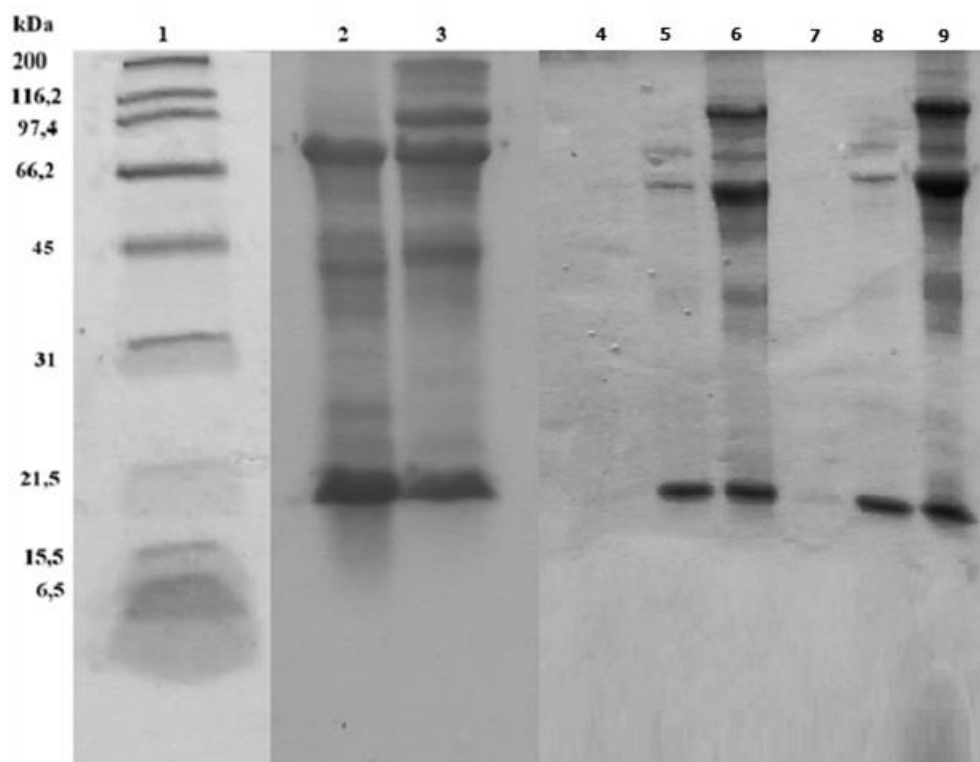


Tabela 7. Desvios nas composições dos sistemas formados por PEG 4000 e PEG 6000 +K₂HPO₄/H₃PO₄+ H₂O, em diferentes temperaturas pelo modelo UNIFAC.

Temperatura	SAB	$\delta x(\%)$
20°C	PEG4000 + K₂HPO₄/H₃PO₄	1,4863
25°C		1,2699
30°C		1,5453
35°C		1,4529
20°C	PEG6000 + K₂HPO₄/H₃PO₄	1,9678
25°C		1,6532
30°C		1,3537
35°C		0,9705
Desvio médio global (%)		1,4875

9.4.Eletroforese SDS-PAGE

Figura 4. Análise SDS-PAGE da lectina recombinante rCaBo em solução tampão, gel de acrilamida em 12%. Poço 1: marcador de peso molecular; poços 2 e 3: amostra do extrato de lectina rCaBo em 1:4 e 1:2 respectivamente; poços 4 e 7: fase superior (PEG 4000 e 6000); poços 5 e 8: fase inferior (K₂HPO₄/H₃PO₄) e poços 6 e 9: interface dos sistemas resuspensa em água.



As imagens SDS-PAGE mostradas na Figura 4 ilustram o comportamento da proteína rCaBo em seu extrato bacteriano e particionada no sistema aquoso bifásico, ao lado do marcador de peso molecular e conseguimos visualizar bandas bem definidas no gel onde se encontra a lectina em extrato e nas bandas onde ela esta presente nas fases inferior, superior e interface, levando a dedução de que essa proteína se encontra em um nível de pureza já considerável. A mesma apresenta uma banda com forte traço entre os marcadores de 97,4 kDa (fosforilase b) e 66,2 kDa (albumina de soro bovino), o que é condizente com as características de peso da lectina rCaBo estudada (81,79 kDa).

Para o acompanhamento do processo de sua partição, foram utilizados nesta eletroforese as fases já citadas, correspondente as bandas 4 (fase superior PEG 4000); 5 (fase inferior K_2HPO_4/H_3PO_4) 6 (Interface do sistema PEG 4000); 7 (fase superior PEG 6000); 8 (fase inferior K_2HPO_4/H_3PO_4) 9 (Interface do sistema PEG 6000). Percebe-se que nas bandas correspondentes as fases inferiores temos duas marcas finas no topo, o que pode corresponder a uma proteína mais pura do que encontrada em seu estado bruto (poços 2 e 3). Essas bandas são características da lectina em estudo, podendo uma ser resíduo da outra, a realização de uma eletroforese em condição nativa seria necessário para obter essa informação. Observando ainda as bandas correspondentes as fases inferiores, é observado que há ainda uma mancha desconhecida, mas bem definida na parte de baixo (cerca de 20 kDa), entretando pensando em um processo posterior à partição por SAB, é uma substancia que pode ser retirada facilmente. Em relação ao rendimento do processo, o resultado observado no gel não foi ainda satisfatório, porém também se observa o nível de purificação que se conseguiu obter com estes sistemas. Percebe-se então o potencial dos mesmos na partição de lectinas deste tipo. Melhores níveis de rendimento e pureza podem ser alcançados através da otimização deste processo com utilização de outros tipos de sistemas e acompanhamento por eletroforese.

9.5.Determinação dos parâmetros de partição

Observando a Tabela 8 e considerando apenas as fases inferiores e superiores de cada sistema, percebe-se que os valores do K_p foram inferiores a 1, indicando que a lectina rCaBo teve maior preferência pela fase inferior do que pela superior na maioria dos sistemas estudados. O comprimento da linha de amarração é alterado na medida em que ocorre um aumento na concentração de sal na fase inferior e um aumento na concentração do polímero na fase superior.

O valor do K_p não seguiu uma tendência de variação na medida em que o CLA ou a

temperatura aumentasse. Comportamento que foi verificado para todas as temperaturas dos sistemas estudados.

Tabela 8. Coeficientes de partição da Lectina rCaBo em SAB's formados por polietilenoglicol 4000 e 6000 g/mol + K₂HPO₄/H₃PO₄ + água em diferentes temperaturas (20 25 30 e 35°C).

LA	Coeficiente de Partição K_p							
	PEG 4000				PEG 6000			
	20°C	25°C	30°C	35°C	20°C	25°C	30°C	35°C
1	0,0321	0,0213	0,0210	0,0607	0,1051	0,2745	0,1814	0,1716
2	0,0609	0,0281	0,0326	0,0617	0,0543	0,0401	0,0137	0,0207
3	0,0144	0,0194	0,0136	0,0099	0,0160	0,0208	0,0204	0,0222
4	0,0011	0,0042	0,0137	0,0051	0,0363	0,0176	0,0097	0,0145
5	0,0203	0,0345	0,0349	0,0239	0,0169	0,0125	0,0104	0,0193

Fonte: Dos autores, 2021.

Legenda: LA: Linha de amarração

Esse comportamento foi diferente do encontrado por Sampaio (2019) que verificou um aumento ou diminuição do valor de K_p a depender da variação de um destes parâmetros. Gandolfi (2020) também percebeu um aumento do coeficiente de partição para quando houvesse um aumento das concentrações das fases de seus sistemas.

Já para partição de proteínas recombinantes, comportamento semelhante foi encontrado em estudos de Celeste (2010), onde se percebeu que o coeficiente K_p não variou em função do aumento de concentração das fases. Em seu trabalho, também foi mostrado que as proteínas recombinantes tendiam a permanecer na interface, chegando a valores de 70% de recuperação.

Tal comportamento pode ser atribuído ao volume livre da fase superior em que se utiliza polímeros com alto peso molecular. Ainda no mesmo estudo, foram utilizados polímeros como PEG 600 e PEG 1000 que obtiveram maior recuperação na fase superior e a partir do PEG 3350, o comportamento foi totalmente direcionado à concentração dessas proteínas na interface dos sistemas. Essa migração para a interface também foi verificada neste trabalho que utilizou PEG's de massa molar de 4000 e 6000 g.mol⁻¹, a Tabela 9 mostra este fato.

Tabela 9. Índice de recuperação teórica em %Y dos sistemas aquosos bifásicos formados por polietilenoglicol 4000 e 6000 g.mol⁻¹ + fosfato de potássio/ácido fosfórico K₂HPO₄/H₃PO₄ + água em diferentes temperaturas (20, 25, 30 e 35 °C).

LA	Fase	PEG 4000				PEG 6000			
		20°C	25°C	30°C	35°C	20°C	25°C	30°C	35°C
L1	FI	27,744	17,827	26,531	26,531	42,731	12,266	15,982	24,452
	FS	0,890	0,379	0,558	0,558	4,491	3,367	2,899	4,197
	INT	70,260	77,391	69,473	69,473	48,395	77,421	74,251	67,965
L2	FI	29,406	41,941	41,455	28,309	18,568	21,273	45,161	39,862
	FS	1,792	1,178	1,353	1,747	1,008	0,854	0,620	0,825
	INT	64,948	55,966	55,633	65,856	77,324	72,260	53,234	57,993
L3	FI	36,166	37,026	45,199	50,096	38,611	22,504	24,781	26,999
	FS	0,519	0,720	0,615	0,496	0,617	0,469	0,506	0,599
	INT	63,158	60,951	48,396	48,564	57,803	75,589	71,471	71,546
L4	FI	48,172	13,610	15,946	30,634	32,582	31,138	36,070	24,191
	FS	0,052	0,057	0,219	0,156	1,183	0,547	0,350	0,350
	INT	50,167	86,052	83,107	67,558	65,911	64,396	63,323	73,918
L5	FI	62,198	24,453	40,308	33,833	23,227	32,582	41,033	20,328
	FS	1,260	0,843	1,406	0,809	0,393	0,408	0,426	0,392
	INT	32,031	73,220	55,631	63,197	74,058	65,536	58,360	71,739

Fonte: Dos autores, 2021.

Legenda: LA: Linha de amarração, FI: Fase Inferior, FS: Fase superior, INT: Interface.

Na tabela 9 é ilustrado o índice de recuperação em cada fase para os sistemas de PEG 4000 e 6000 + fosfato de potássio e observando os dados, na maioria destes sistemas, as lectinas migraram preferencialmente para a interface, tendo ela ausência, ou pouca afinidade pela fase superior e em alguns casos foi notado que houve migração considerável para a fase inferior, com sistemas chegando a 62,198%. Tal comportamento pode estar relacionado com a maior interação da rCaBo com o K₂HPO₄ em comparação com a fase polimérica. O fato da rCaBo apresentar menores valores de %Y na fase superior, pode estar relacionado também ao fato dessa lectina apresentar um alto peso molecular (81,79kDa) o que necessitaria de um volume maior na fase superior para ela se alojar, isso é intensificado quando se utiliza PEG's com alto peso molecular, como é o caso do estudo. Tal fato também é reportado por Celeste (2010) que aplicou os sistemas aquosos bifásicos de PEG 8000/Na₃PO₄ na recuperação de uma proteína recombinante de alfafa e Aguilar (2008) que verificou o potencial dos sistemas aquosos bifásicos na potencial recuperação de proteínas recombinantes

a partir de extratos de soja (*Glycine max*).

Tabela 10. Parâmetros termodinâmicos de transferência da Lectina rCaBo em sistema aquoso bifásico formados por PEG 4000 e 6000 g.mol⁻¹ + fosfato de potássio /ácido fosfórico K₂HPO₄/H₃PO₄ + água em diferentes temperaturas (20, 25, 30 e 35 °C).

LA	$\Delta_{tr}(G/kJ/mol)$	$\Delta_{tr}(H/kJ/mol)$	$T\Delta_{tr}(S/kJ/mol)$	$\Delta_{tr}(G/kJ/mol)$	$\Delta_{tr}(H/kJ/mol)$	$T\Delta_{tr}(S/kJ/mol)$
PEG 4000			PEG 6000			
20°C						
1	8,3832	-146,11	154,49	5,4911	-162,97	168,46
2	6,8195	-94,139	100,95	7,1004	-183,17	190,27
3	10,343	-49,984	60,328	10,083	-53,609	63,693
4	16,670	-347,64	364,31	8,0819	-132,21	140,30
5	9,5032	-142,58	152,09	9,9453	-63,919	73,864
25°C						
1	9,5455	-32,228	41,774	3,2046	-47,794	50,998
2	8,8562	-27,765	36,621	7,9716	-94,410	102,38
3	9,7679	-0,4228	10,190	9,5949	-18,332	27,927
4	13,569	-169,24	182,86	10,019	-80,998	91,017
5	8,3471	-49,405	57,752	10,855	-34,082	44,938
30°C						
1	9,7354	77,900	-68,165	4,3024	63,587	-59,284
2	8,6259	36,419	-27,793	10,810	-8,568	19,379
3	10,830	47,504	-36,673	9,8086	15,781	-5,973
4	10,806	3,2700	7,5365	11,680	-31,466	43,146
5	8,4586	40,704	-32,246	11,515	-5,23083	16,746
35°C						
1	7,180462	184,4558	-177,2753	4,515367	171,3539	-166,8385
2	7,136158	98,52087	-91,3847	9,935467	74,48677	-64,5513
3	11,82513	93,87579	-82,0507	9,755797	48,78866	-39,0329
4	13,52604	170,1848	-156,6588	10,84918	16,45833	-5,6092
5	9,564367	127,8907	-118,3263	10,1133	22,68489	-12,5716

A partição de uma biomolécula qualquer entre as fases de um sistema aquoso bifásico está associado ao processo de transferência e as variações entálpicas e entrópicas que podem ocorrer neste. Deste modo, para um melhor entendimento do processo de

migração da proteína nas fases foram determinadas as contribuições entálpicas e entrópicas de transferência, mostradas na Tabela 10. No caso em estudo a proteína migrou preferencialmente para a interface e em parte considerável para a fase inferior. Isso é confirmado, quando avaliamos os valores da energia livre de Gibbs de transferência $\Delta_{tr}G$ da lectina da fase inferior para a fase superior do sistema, que para todos os casos, o valor do $\Delta_{tr}G$ foi positivo, evidenciando que a partição da proteína alvo para a fase superior (rica em polímero) é termodinamicamente desfavorável.

Observando apenas os valores para a variação de entálpia do processo, a entalpia nesse caso tornava o processo termodinamicamente favorável por apresentar valores negativos para as temperaturas de 20 e 25°C, considerando que processos exotérmicos tendem a ser favoráveis, entretanto acontece um aumento nos valores de entalpia na medida em que a temperatura também cresce (30 e 35°C), com isso colocamos que o aumento na variação de temperatura faz com que o processo não seja energeticamente favorável. Todavia, o valor de $\Delta_{tr}G$ é composto pelas variações entálpica e entrópica do processo de partição, sabendo disso notas-se que a transferência da proteína entre as fases do SAB começa a ser dirigida por forças de natureza entrópica, uma vez que os valores em módulo de $\Delta_{tr}S$ foram maiores, e a partir da temperatura de 30°C o processo começa a ser entálpicamente dirigido. Esse comportamento foi predominante em todas as condições de estudo avaliadas.

Deve-se salientar que para este estudo dos parâmetros de partição não foi considerado o teor de proteína que migrou preferencialmente para a interface.

10. Considerações Finais

A partir dos dados de equilíbrio de sistemas compostos por polietilenoglicol (PEG 4000 g.mol⁻¹ e PEG 6000 g.mol⁻¹) + sal (K₂HPO₄/H₃PO₄) e água em diferentes temperaturas (20, 25, 30 e 35) °C, 5 linhas de amarração para cada sistema foram estudadas, onde o modelo UNIFAC foi utilizado para prever a partição de proteínas em sistemas aquosos bifásicos. O modelo proposto leva em consideração as contribuições entálpicas e entrópicas do processo de transferência de massa da proteína bem como as contribuições combinatorial e residual dos componentes do sistema e das interações de longo alcance. O modelo UNIFAC apresentou baixos desvios entre as composições experimentais e calculadas. A análise SDS-PAGE foi utilizada para acompanhar os processos de purificação da lectina onde se observou um nível de pureza da proteína-alvo nas bandas da fase inferior dos sistemas. Foi verificado que a proteína de estudo, lectina recombinante de *Canavalia Bonariensis* migrou preferencialmente para a interface e fase inferior na maioria dos sistemas, com possíveis

maiores contribuições de natureza entálpica. A partição da proteína foi entropicamente dirigida até a temperatura de 30°C, passando a ser entálpicamente dirigida de acordo com o aumento da temperatura. Mais estudos devem ser realizados para a simulação do coeficiente de partição de proteína em SAB. Entretanto, este trabalho mostra uma perspectiva de utilização do modelo para a predição da partição de proteínas em SAB.

11. Referencias bibliográfica.

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.

AGARWAL, R.; TRIVEDI, J.; MITRA, D. Produção de alto rendimento de *cianovirina-N* recombinante (lectina antiviral) exibindo atividade anti-HIV significativa, a partir de uma cepa de *Escherichia coli* racionalmente selecionada. **Process Biochemistry**, v. 93, p. 1-11, 2020.

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.** Tese (Doutorado em Engenharia Química) Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Faculdade de Engenharia Química, Campinas - SP, 2009.

AGUILAR, O.; RITO-PALOMARES, M. Processing of soybean (*Glycine max*) extracts in aqueous two-phase systems as a first step for the potential recovery of recombinant proteins. **J Chem Technol Biotechnol**.v.83, p.286-293, 2008.

ANANTHAPADMANABHAN, K. P.; GODDARD, E. D. Aqueous biphasic formation in polyethylene oxide-inorganic salt systems. **Langmuir**.v. 3, p. 25-31, 1987.

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, p. 810–816, 2019.

BARROS, A. C. A.; SILVA, T. P.; SANTOS, A. G.; QUEIROZ, S. F.; GOMES, F. S. Lectinas: purificação, mecanismos de ação inseticida e potencial biotecnológico. Editorial Científica Digital, 2020.

BARROS, M. R. Partitioning and recovery of *Canavalia brasiliensis* lectin by aqueous two-phase systems using design of experiments methodology. **Separation and Purification Technology**, v. 75, p. 48-54, 2010.

BELLANDE, K.; BONO, J.; SAVELLI, B.; JAMET, E.; CANUT, H. Plant Lectins and Lectin Receptor-Like Kinases: How Do They Sense the Outside?. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, p.1164, 2017.

BELLANDE, K.; LALO, A.; LIGAT, L.; ROUJOL, D.; JAMET, E.; CANUT, H. Recombinant N-glycosylation isoforms of Legume lectins: Production and purification from *Nicotiana benthamiana* leaves following RuBisCO depletion. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 157, p. 441-452, 2020.

BLATKIEWICZ, M.; ANTECKA, A.; BORUTA, T.; GÓRAK, A.; LEDAKOWICZ, S. Partitioning of Laccases Derived from *Cerrena unicolor* and *Pleurotus sapidus* in 48 Polyethylene Glycol – Phosphate Aqueous Two-Phase Systems. **Process Biochemistry**.v. 67, p. 165–174, 2018.

BRITO, G. M. **Termodinâmica de partição do anion [(Co(NO₂)₆)³⁻ em sistemas aquosos bifásicos**. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, 2007.

BURGUESS, R. R. A brief practical review of size exclusion chromatography: Rules of thumb, limitations, and troubleshooting. **Protein Expression and Purification**. v. 150, p.81-85, 2018.

CALDEIRA, A. C. R.; FRANCA, W. F. L.; CONVERTI, A.; LIMA, W. J. N.; CARRILLO, C.; CORDOBA-DIAZ, D.; CORDOBA-DIAZ, M.; GIRBÉS, T.; CARVALHO, C. **Estudo de Equilíbrio de Fases para Sistemas Aquosos Bifásicos Compostos por Polietileno Glicol, Sais e Água**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, 2004.

CARVALHO, R. A. **Diagramas de Fase de Sistemas Aquosos Bifásicos Compostos por PEO 400 + Sais Inorgânicos + Água e Estudo da Extração de Ácido Monometilarsônico (MMA) Utilizando Sistema Aquoso Bifásico**. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto – MG, 2017.

CAVADA, B. S., JUNIOR, V. R. P.; OSTERNE, V. J. S.; OLIVEIRA, M. V.; LOSSIO, C. F.; SILVA, M. T. L.; BARI, A. U.; LIMA, L. D.; FILHO, C. H. D. S.; NASCIMENTO, K. S. Comprehensive review on Caelsalpinioideae lectins: From purification to biological activities. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 162, p. 333-348, 2020.

CAVADA, B. S.; SILVA, M. T. L.; OSTERNE, V. J. S.; PINTO-JUNIOR, V. R.; NASCIMENTO, A. P. M.; WOLIN, I. A. V.; HEINRICK, I. A.; NOBRE, C. A. S.; MOREIRA, C.G.; NASCIMENTO, K. S.; LEAL, R. B.; *Canavalia bonariensis* lectin: Molecular bases of glycoconjugates interaction and antiglioma potential. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 106, p. 369-378, 2018.

CELESTE, C.; HERRERA, I.; AGUILAR, O.; RITO-PALOMARES, M. Application of an aqueous two-phase systems strategy for the potential recovery of a recombinant protein from alfalfa (*Medicago sativa*). **Separation and Purification Technology**. v. 77, p. 94-98, 2010.

CHANG, Y. S.; CHEN, J. N.; CHANG, K. H.; CHANG, Y. M.; LAI, Y. J.; LIU, W. J. Clonagem e expressão do gene da lectina do cogumelo *Agrocybe aegerita* e as atividades da lectina recombinante na resistência à infecção pelo vírus da síndrome da mancha branca do camarão. **Developmental & Comparative Immunology** , v. 90, p. 1-9, 2019.

CLEMENTINO, E. L.; SALES, A. E.; CUNHA, M. N. C.; PORTO, A. L. F.; PORTO, T. S. Produção e purificação integrada de protease fibrinolítica de *Mucor subtilissimus* UCP 1262. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.71, p.553-562, 2019.

COSTA, R. B. C.; CAMPANA, P. T.; CHAMBERGO, F. S.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M. G.; PEREIRA, H. J. V.; OLIVA, M. L. V.; GOMES, F. S. Purification and characterization of a lectin with refolding ability from *Genipa americana* bark. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 119, p. 517–523, 2018.

DA COSTA, A. R. **Partição de lactoferrina em sistemas aquosos bifásicos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos de Alimentos) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga – BA, 2010.

DA SILVA, J. F. **Otimização da imobilização de carboidratos em matrizes macroporosas para a purificação de lectinas por afinidade.** Dissertação – (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga - BA, 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.

DA SILVA, M. T. L. **Determinação de estrutura primária e avaliação preliminar dos efeitos inflamatórios de uma lectina de *canavalia bonariensis* lindl.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Recursos Naturais). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza – CE, 2015.

DA SILVA, M. T. L. **Estudos estruturais, clonagem e expressão e atividade biológica da lectina de *canavalia bonariensis*.** Tese (Doutorado em Biotecnologia e Recursos Naturais). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza – CE, 2019.

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). **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.

DE BARROS, D. P.C.; CAMPOS, S. R. R.; AZEVEDO, A. M.; BAPTISATA, A. M.; AIRES-BARROS, R. Predicting protein partition coefficients in aqueous two phase system. **Journal of Chromatography A**. v. 1470, p. 50-58, 2016.

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 TwoPhase System Equilibria. **Fluid Phase Equilibria**.v. 512, 112-520, 2020.

DO NASCIMENTO, M. B.; FONTAN, R. C. I.; VELOSO, C. M.; BONOMO, R. C. F.; CASTRO, S. S.; GANDOLFI, O. R. M.; DO NASCIMENTO, D. J. S.; SAMPAIO, V. ELGAVISH S. & SHAANAN B. Lectin-Carbohydrate interactions: different folds, common recognition principles. **Trends in Biochemical Sciences** v. 22, p.462-467, 1997.

ESCUADERO, 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.

FARIAS, D. L. **Isolamento, purificação e atividades biológicas de uma nova lectina de sementes de feijão da praia (*Canavalia maritima*).** Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Centro de Ciências Exatas da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB, 2013.

FERNANDEZ-POZA, S.; PADROS, A.; THOMPSON, R.; BUTLER, L.; ISLAM, M.; MOSELY, J. A.; SCRIVENS, J. H.; REHMAN, M. F.; AKRAM, M. S. Tailor-made recombinant prokaryotic lectins for characterisation of glycoproteins. **Analytica Chimica**

Acta. v. 1155, p. 338-352, 2021.

FIGUEIREDO, J.G.; SILVEIRA, B. F.; BESERRA, I. G.; TEIXEIRA, C. S.; LUZ, P.B.; BEZERRA, E. H.; MOTA, M. R.; ASSREUY, A. M.; QUEIROZ, C. F.; CAVADA, B. S.; ALENCAR, N. M. Antinociceptive activity and toxicology of the lectin from *Canavalia boliviana* seeds in mice. **Naunyn-Schmied Arch Pharmacol**, v. 380, p. 407- 414, 2009.

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.

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.

GAJBHIYE, V; GONG, S. Lectin functionalized nanocarriers for gene delivery. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 5, p. 552-562, 2013.

GANDOLFI, O. R. R. **Modelagem e simulação termodinâmica para predição da partição de biomoléculas em sistemas aquosos bifásicos.** Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga – BA, 2020.

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

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.

GEMEINER, P.; MISLOVICOVÁ, D.; TKÁC, J.; SVITEL, J.; PÄTOPRSTÝ, V.; HRABÁROVÁ, E.; Kogan, G.; Kozár, T. Lectinomics II. A highway to biomedical/clinical diagnostics, **Biotechnol.**v. 27, p. 1-15, 2009.

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.

GOLOTIN, V.; FILSHTEIN, A. P.; CHIKALOVETS, I. V.; YU, K. N.; MOLCHANOVA, V. I.; CHERNOKOV, O. V. Expression and purification of a new lectin from mussel *Mytilus trossulus*. **Protein Expression and Purification**. v. 154, p. 62-65, 2019.

GONDIM, A. C. S.; ROMERO-CANELÓN, I.; SOUSA, E, H. S.; BLINDAUER, C. A.; BUTLER, J. S.; ROMERO, M. J.; SANCHEZ-CANO, C.; SOUSA, B. L.; CHAVES, R. P.; NAGANO, C. S.; CEVADA, B. S.; SADLER, P. J. The potent anti- cancer activity of *Dioclea lasiocarpa* lectin. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 175, p. 179-189, 2017.

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.

HAGHTALAB, A. MOKHTARANI, B. 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.** v.215, p. 151–161, 2004.

HE, S.; SHI, J.; WALID, E.; ZHANG, H.; MA, Y.; XUE, S. J. Reverse micellar extraction of lectin from black turtle bean (*Phaseolus vulgaris*): Optimisation of extraction conditions by response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 166, p. 93-100, 2015.

0

ITAKURA, Y.; NAKAMURA-TSURUTA, S.; KOMINAMI, J.; TATENO, H.; HIRABAYASHI, J. Sugar-binding profiles of chitin-binding lectins from the hevein family: A comprehensive study. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, p. 1160, 2017.

NELDER, A. J.; MEAD, R. A Simplex Method for Function Minimization, **Comput. J.** v.7 p.308–313,1965.

JACQUES, A. V.; RIEGER, D. K.; MAESTRI, M.; LOPES, M. W.; PERES, T. V.; GONÇALVES, F. M.; PEDRO, D. Z.; TASCA, C. I.; LÓPEZ, M. G.; EGEA, J.; NASCIMENTO, K. S.; CAVADA, B. S.; LEAL, R. B. Lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) protects hippocampal slices against glutamate neurotoxicity in a manner dependent of PI3K/Akt pathway. **Neurochemistry International**, v.62, p. 836- 842, 2013.

JIMÉNEZ, P. Effects of temperature, pH and sugar binding on the structures of lectins ebulin f and SELfd. **Food Chemistry**. v. 220, p. 324-330, 2017.

JUAN, L. L.; RECIO, V. G.; LÓPEZ, P. J.; JUAN, T. G; CORDOBA-DIAZ, M.; CORDOBA-DIAZ, D. Pharmaceutical applications of lectins. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 42, p. 126-133, 2017.

JUNQUEIRA , C. M. **Surfactantes como agentes moduladores da partição e formadores de novos sistemas aquosos bifásicos**. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Alfenas – MG, 2019.

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

KEOGH,D.; THOMPSON, R.; LARRAGY, R.; MCMAHON, K.;O'CONNELL, M.;O'CONNOR, B.; CLARKE, P. Generating novel recombinant prokaryotic lectins with altered carbohydrate binding properties through mutagenesis of the PA-IL protein from *P. aeruginosa*. **Biochim. Biophys. Acta Gen.** v. 1840, p. 2091-2104, 2014.

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.

LACERDA, R. R. **Isolamento, caracterização e atividade biológica da lectina de sementes de variedade brasileira de feijão-lima (*phaseolus lunatus* var. cascavel).** Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa - PB, 2015.

LAUGHLIN, D. E.; MASSALKI, T. B. Construction of equilibrium phase diagrams: Some errors to be avoided. **Progress in Materials Science**. v. 120, 2021.

LEITE, O. R. **Termodinâmica de partição do corante natural Carmin de Cochonila em diferentes sistemas aquosos bifásicos.** Dissertação (Mestrado em Agroquímica) Universidade Federal de Viçosa- MG, 2010.

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.

LI, Y.; HAN, J.; WANG, Y.; MA, J.; YAN, Y.; CAO, L. Optimization of Extraction and Determination of Chloramphenicol in Livestock Meat Samples using Aqueous Two-Phase System of n-propanol and Potassium Citrate Coupled with HPLC. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 24, p. 669-674, 2013.

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.

LUBOMIRSKY, E.; KHODABANDEH, A.; PREIS, J.; SUSEWIND, M.; HOFER, T.; HILDER, E. F.; ARRUA, R. D. Polymeric stationary phases for size exclusion chromatography: A review. **Analytica Chimica Acta**. v. 1151, 2021.

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

MAGALHÃES, F. F. TAVARES, A. P.; FREIRE, M. G. Advances in aqueous biphasic systems for biotechnology applications. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**. v. 27, 2021

MICHEL, B.; NEVES, M. T.; DE SOUZA, R. C. S.; CHAGAS, M. M.; MARTINS, B. A.; COIMBRA, J. S. R. Partição de proteínas de soro de leite em sistemas aquosos bifásicos baseados em líquidos iônicos. **Química Nova**. p.1148-1152, 2015.

MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O. **Caracterização estrutural de três lectinas apresentando especificidades por açúcar distintas, isoladas de sementes de fruta- pão (*Artocarpus Incisa L.*).** Tese (Doutorado em Bioquímica), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza – CE, 2002.

MOURA, R. B.; PEREIRA, J. F. N.; SANTOS, G. F. A.; RODRIGUES, A. R. S. Importance of Lectins in Virology - An integrative review. **Research, Society and Development**. v. 9, n. 11, 2020.

MUNIZ, I. C. B. **Estudo experimental e modelagem termodinâmica de sistemas aquosos**

bifásicos para partição de lipase. Dissertação (Mestrado em Engenharia, Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga – MG, 2021.

MURUGESAN, A. K.; GUNASAGARAN, K. S. Purification and characterization of a synergistic bioactive lectin from *Pleurotus flabellatus* (PFL-L) with potent antibacterial and in-vitro radical scavenging activity. **Analytical Biochemistry**, 2021

NASCIMENTO, C. O.; SOARES, P. A. G.; PORTO, T. S.; COSTA, R. M. P. B.; LIMA, C. A.; FILHO, J. L. L.; COELHO, L. C. B. B. Aqueous two-phase systems: new strategies for separation and purification of lectin from crude extract of *Cratylia mollis* seeds. **Separation and Purification Technology**. v. 116, p. 154-161, 2013.

NASCIMENTO, K. S.; ANDRADE, M.L.; Silva, I. B.; DOMINGUES, D.L.; CHICAS, L. S.; SILVA, M.T.; BRINGEL, P. H S.; MARQUES, G. F. O.; MARTINS, M. G. Q.; LÓSSIO, C. F.; NASCIMENTO, A. P. M.; WOLIN, A. V.; LEAL, R. B.; ASSREUY, M. S.; CAVADA, B. S. Produção heteróloga de cadeia α de *Dioclea sclerocarpa* lectina: Aumentando os efeitos biológicos de uma lectina de tipo selvagem. **Jornal internacional de macromoléculas biológicas**, v. 156, p. 1-9. 2020.

NASCIMENTO, P. A. M. **Sistemas de Duas Fases Aquosas: uma ferramenta biocompatível para extração de lipase de interesse biotecnológico.** Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia) – Universidade Estadual Paulista. Araraquara – SP, 2019.

NINNI, L.; CAMARGO, M.S.; MEIRELLES, A.J. A. Water activity in poly (ethylene glycol) aqueous solutions, **Thermochim. Acta**. v.328,p.169–176,1999.

OLIVEIRA, C.; TEIXEIRA, J. A.; Domingues, L. Recombinant production of plant lectins in microbial systems for biomedical application “the frutalin case study.**Frontiers in Plant Science**.v. 5, 2014.

PARTHIBAN, E.; AROKYIARAJ, C.; JANARTHANAN, S.; RAMANIBAI, R. Purification, characterization of mosquito larvicidal lectin from *Annona muricata* and its eco-toxic effect on non-target organismo. **Process Biochemistry**.v. 99, p. 357-366, 2020.

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.

PEREIRA, R.; DA SILVA, A. L. C. Uma revisão do potencial biotecnológico de lectinas do gênero *Canavalia* e *Dioclea*. **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**. v. 15, n. 3, p. 184-205, 2019.

PIGNATTA, M. C.; BONOMO, R. C. F.; VELOSO, C. M.; GANDOLFI, O. R. M.; FONTAN, R. C. I.; OLIVEIRA, M. S. C.; BONOMO, P. Estudo da partição de albumina de soro bovino em sistemas aquosos bifásicos. **B.Ceppa**, Curitiba – PR, v.34, p.53-62, 2016.

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, p. 84-193, 2017.

PINTO, A. C. G. **Estudo dos sistemas aquosos bifásicos formados por polietilenoglicol e sais de tartarato, e purificação da lectina ConBol obtida a partir da *Canavalia boliviana***. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória – ES, 2016.

PINTO, A. C. G. **Estudo dos sistemas aquosos bifásicos formados por polietilenoglicol e sais de tartarato, e purificação da lectina ConBol obtida a partir da *Canavalia boliviana***. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória – ES, 2016.

PORATH, J.; LINDNER, E. B. Separation methods based on molecular sieving and ion exclusion. **Nature**, v. 191, p. 69-70, 1961.

RATHNASAMY, S. S.; BALARAMAN, H. B.; MUNIASAMY, R. Air-assisted dispersive liquid phase microextraction coupled chromatography quantification for purification of therapeutic lectin from aloe vera – A potential COVID-19 immune booster. **Microchemical Journal**. v. 165, 2021.

RENGIFO, A. F. C.; FERREIRA, G. M. D.; FERREIRA, G. M. D.; DA SILVA, M. C. H.; DA SILVA, L. H. M. Phase diagrams, densities and refractive indexes of poly (ethylene oxide) + organic salts+ water aqueous twophase systems: effect of temperature, anion and molar mass. **Fluid Phase Equilibria**. v.406, p. 70-76, 2015.

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.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**. v. 5, p. 1–17, 2014.

S.; VERISSIMO, L. A. A. Equilibrium data and thermodynamic studies of α -amilase partition in aqueous two-phase systems. **Fluid Phase Equilibria**. v. 463, p. 69-79, 2018.

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. **Computer Coupling of Phase Diagrams and Thermochemistry**, v. 34, p. 81–83, 2010.

SAMPAIO, F. C.; FARIA, J. T.; Liquid-liquid equilibria in aqueous two-phase ethanol/salt systems at different temperatures and their application to anthocyanins extraction. **Food Science and Technology**, v.39, 2019.

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, W. O. **Partição de β -galactosidase em sistemas aquosos bifásicos constituídos por polietileno glicol e poliácido acrílico de sódio**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos de Alimentos) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga - BA, 2011.

SILVA, F. I. **Extração e purificação de 2,3-butanodiol utilizando sistemas aquosos bifásicos e processos de separação por membranas**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2020.

SILVA, F. I. **Extração e purificação de 2,3-butanodiol utilizando sistemas aquosos bifásicos e processos de separação por membranas**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Florianópolis- SC, 2020.

SINGH, A. P.; SAXENA, K. D. Effect of Temperature, pH and Denaturing Agents on Biological Activity of MCJ Lectin. **Chemical Science Transactions**, v. 2, p. 1508- 1512, 2013.

SINGH, Ram Sarup; THAKUR, Shivani Rani; KENNEDY, John F. Purification and characterisation of a xylose-specific mitogenic lectin from *Fusarium sambucinum*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 152, p. 393-402, 2020.

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

SOUZA, K. M. D. **Aplicação de novos sistemas aquosos bifásicos baseados em tetrahydrofurano na partição de diuron**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Universidade de Tiradentes, Aracaju - SE, 2015.

SUN, X.; HE, S.; YE, Y.; CAO, X.; LIU, H.; WU, Z.; YUE, J.; JIN, R.; SUN, H. Combined effects of pH and thermal treatments on IgE-binding capacity and conformational structures of lectin from black kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Chemistry**.v. 329, p. 127-183, 2020.

MAGNUSSEN, T.; RASMUSSEN, P.; FREDENSLUND, A. Unifac Parameter Table for Prediction of Liquid-Liquid Equilibria, **Ind. Eng. Chem. Process**, p. 331–339, 1981.

TEIXEIRA, E. H.; NAPIMOGA, M. H.; CARNEIRO, V. A.; OLIVEIRA, T. M.; CUNHA, R. M. S.; HAVT, A.; MARTINS, J. L.; PINTO, V. P. T.; GONCALVES, R. B.; CAVADA, B. S. In vitro inhibition of Streptococcus binding to enamel acquired pellicle by plant lectins. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, p. 111-116, 2006.

VAN DAMME, E. J. M., PEUMANS, W. J. BARRE, A., ROUGÉ, P. Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionarily related proteins with diverse biological role. **Critical Review in Plant Sciences**. v.17, p. 575-692, 1998.

VELOSO, A. C. G. **Novos sistemas aquosos bifásicos aplicados no preparo de amostras alimentícias para a determinação de corantes sintéticos**. Tese (Pós- graduação em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa- MG, 2018.

YAN, W.; TOPPHOFF, M.; ROSE, C.; GMEHLING J. Prediction of vapor-liquid equilibria

in mixed-solvent electrolyte systems using the group contribution concept, **Fluid Phase Equilib.**v. 162 p. 97–113,1999.

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

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.

YAN,L.;SUN,Y.Q.; WANG,X.D.;FU, H.X.;MU, Y.;XIU,Z.L. Partition behavior of monocarboxylic acids in salting-out extraction systems of monohydric alcohols and dipotassium phosphate, **Sep. Purif. Technol.**v. 199, p.351–358, 2018.

ZHAO, J.; HE, S.; TANG, M.; SUN, X.; ZHANG, Z.; YE, Y.; CAO, X.; SUN, H. Low- pH induced structural changes, allergenicity and in vitro digestibility of lectin from black turtle bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Chemistry**. v. 283, p. 183-190, 2019.