



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**

Fabiane Moreira Vieira

**Partição de Ácidos Húmicos em Sistemas Bifásicos  
constituídos de NaOH + Álcoois + Água**

**Campinas**

**2019**

Fabiane Moreira Vieira

**Partição de Ácidos Húmicos em Sistemas Bifásicos  
constituídos de NaOH + Álcoois + Água**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestra em Engenharia Química

Orientadora: Prof. Dr.<sup>a</sup> Maria Helena Andrade Santana

Coorientador: Prof. Dr. Álvaro Silva Lima

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À  
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO  
DEFENDIDA PELA ALUNA FABIANE  
MOREIRA VIEIRA, E ORIENTADA PELA  
PROF. DR.<sup>a</sup> MARIA HELENA ANDRADE  
SANTANA.

**Campinas  
2019**

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** CAPES, 1669391

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura  
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

V673p Vieira, Fabiane Moreira, 1995-  
Partição de ácidos húmicos em sistemas bifásicos constituídos de NaOH +  
álcoois + água. / Fabiane Moreira Vieira. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Maria Helena Andrade Santana.  
Coorientador: Álvaro Silva Lima.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade  
de Engenharia Química.

1. Ácidos húmicos. 2. Sistemas aquosos bifásicos. 3. Álcool. 4. Hidróxido de  
sódio. I. Santana, Maria Helena Andrade, 1951-. II. Lima, Álvaro Silva. III.  
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV.  
Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Partition of humic acids in biphasic systems consisting of NaOH +  
alcohols + water.

**Palavras-chave em inglês:**

Humic acids

Aqueous two-phase systems

Alcohol

Sodium hydroxide

**Área de concentração:** Engenharia Química

**Titulação:** Mestra em Engenharia Química

**Banca examinadora:**

Maria Helena Andrade Santana [Orientador]

Guilherme José Maximo

Reinaldo Gaspar Bastos

**Data de defesa:** 15-02-2019

**Programa de Pós-Graduação:** Engenharia Química

Folha de Aprovação da Dissertação de Mestrado defendida por Fabiane Moreira Vieira e aprovada em 15 de fevereiro de 2019 pela banca examinadora constituída pelos seguintes doutores:

Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana  
FEQ / UNICAMP

Prof. Dr. Guilherme José Maximo  
FEA / UNICAMP

Dr. Reinaldo Gaspar Bastos  
Universidade Federal de São Carlos

\*A ATA da Defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to understand more, so that we may fear less.”

*Marie Curie*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por ter me guiado para que fosse possível ingressar e continuar o mestrado, superando as dificuldades encontradas pelo caminho.

Aos meus pais, Dayse Aparecida e Alessandro Túlio, por sempre terem me proporcionado total apoio em todas as épocas da minha vida e terem me ensinado tudo que levo comigo até hoje. Amo vocês.

À minha irmã, por ter sido a pessoa que me fez seguir em frente em todos os momentos de dificuldade na vida, por toda a amizade e por ser toda ouvidos sempre. Te amo!

Às minhas amigas de faculdade e de vida, Brenda, Camila, Glaucia e Paula, que foram de extrema importância para minha formação pessoal e profissional, sendo que ainda são, mesmo de longe, pessoas extremamente importantes de quem eu sinto falta todos os dias. Obrigada por estarem perto mesmo de longe, amo vocês.

Aos meus amigos, Caio Henrique e Eduardo Nakamura, por serem umas das melhores pessoas que conheci aqui em Campinas e por estarem comigo sempre que eu precisei, além de me aguentarem nos piores e melhores momentos, obrigada por tudo que passamos, continuaremos juntos de longe, amo vocês.

Aos meus amigos de casa, Cynthia, Natália, Raul e Thatyana que, além de me aguentarem todos os dias durante todas as alterações de humor, conseguiram me auxiliar nas dificuldades apresentadas em relação aos conteúdos estudados durante o mestrado. Obrigada pela companhia, pelo carinho e por suportarem tudo comigo, amo vocês.

À minha orientadora, Prof. Dr<sup>a</sup> Maria Helena Andrade Santana pela ideia do trabalho e o suporte necessário para que esse trabalho fosse conduzido.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Álvaro Silva Lima que, além de me ensinar cuidadosamente durante o período que estive em Aracaju, se fez disponível a todo momento para que eu retirasse qualquer dúvida, mesmo que durante uma ligação em um sábado à noite. Obrigada pela paciência em me orientar e por todo o carinho.

Ao Instituto de Pesquisa e Tecnologia da Universidade Tiradentes por me permitir utilizar o laboratório durante o tempo em que estive em Aracaju, inclusive nos finais de semana em que gostaria de estar na praia.

Às minhas amigas de Aracaju, Giselle, Kênia, Lídia, Milena e Paula, por terem me apresentado a cidade, a cultura e a culinária e por me fazerem sentir muito acolhida no laboratório, me ajudando sempre que necessário. Espero que possamos nos reencontrar sempre.

Ao Filipe, doutorando que me ajudou muito durante o tempo que fiquei em Aracaju, além de sempre ter sido um suporte quando eu me encontrava em dificuldades, mesmo à distância.

À Universidade Estadual de Campinas por me acolher durante o mestrado e por toda a estrutura oferecida para condução dos meus experimentos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil – Código de Financiamento 001.

## RESUMO

Os ácidos húmicos (AHs) são substâncias obtidas a partir das substâncias húmicas derivadas da degradação da matéria orgânica. Atualmente os AHs são principalmente aplicados na agricultura, com grandes benefícios para vários cultivos. Além disso, a presença de grupos funcionais com propriedades anti-inflamatórias, estrógenas e antivirais, torna-os promissores para aplicações farmacêuticas, que ainda são muito pouco exploradas. Os AHs comerciais são obtidos de fontes não renováveis (geralmente solo ou água do mar), a partir de extração alcalina que, além de ser agressiva ao meio ambiente, pode levar à modificação de sua estrutura. Os estudos da produção renovável dos AHs por fermentação ainda são escassos, e utilizam linhagens de fungo do gênero *Trichoderma*, tendo como substrato o material lignocelulósico dos cachos vazios do fruto da palma. Os trabalhos reportados na literatura, foram realizados pelo nosso grupo LDPB/UNICAMP. Devido à identificação de um meio renovável de produção de AHs, faz-se necessária a procura por métodos de recuperação desse composto que não sejam agressivos à biomolécula. Nesse contexto, surgem os sistemas aquosos bifásicos, uma alternativa para extração de biomoléculas, por possuir em sua composição elevada quantidade de água. Neste trabalho de mestrado, foi estudada a partição dos AHs comerciais em SABs constituídos de NaOH, álcoois (metanol, etanol, n-propanol e isopropanol) e água. Além da construção das curvas binodais que regem os respectivos sistemas, com suas respectivas linhas de amarração. Os melhores resultados de recuperação e coeficiente de partição foram observados nos sistemas constituídos de NaOH + n-propanol sendo esses, 99,69% e 0,0038; e NaOH + isopropanol, sendo esses 99,91% e 0,0019.

**Palavras-chave:** Ácidos húmicos; sistemas aquosos bifásicos; álcool; hidróxido de sódio.



## ABSTRACT

Humic acids (HAs) are substances obtained from humic mass, which are derived from organic matter degradation. Currently HAs are mainly applied in agriculture for its great benefits on several cultivation. However, the presence of functional groups with anti-inflammatory, estrogen and antiviral properties, makes them a promise for pharmaceutical applications, which are still very poorly explored. Commercial HAs are obtained from non-renewable sources (usually soil or sea water), from alkaline extraction, which despite of being aggressive to the environment, can lead to the modification of its structure. Studies of the renewable production of HA by fermentation are still scarce. They rely on the use of fungi strains of the genus *Trichoderma*, with the lignocellulosic material of the empty fruit bunch (EFB) as a substrate. The work reported in the literature was carried out by our group (LDPB/UNICAMP), which utilized *Trichoderma reesei* and *viride* strains, and empty branches from different soils, with or without residual lipids from the separation of the palm fruit and conducted fermentations in submerged or solid state. Due to the identification of a renewable source of HAs, it is important to discover new method of recovering the HAs that are not aggressive to the biomolecule. In this scenario, aqueous two-phase systems (ATPS) are presented as an alternative for the extraction of HAs, due to the large amount of water in its composition. The present work presents the partitioning of the commercial HAs in ATPS consisting of NaOH, alcohols (methanol, ethanol, n-propanol and isopropanol) and water. The best partition coefficient and recovery were observed in n-propanol (99,69% and 0,0038, respectively) and isopropanol (99,91% and 0,0019, respectively) based ATPS.

**Key-words:** humic acids; aqueous two-phase systems; alcohol; sodium hydroxide.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Modelo estrutural dos ácidos húmicos (Fonte: Adaptado de Stevenson, 1982). .....	17
Figura 2: Modelo estrutural dos ácidos fúlvicos (Buffle, 1977). .....	17
Figura 3: Representação esquemática de um diagrama de fases. Concentrações acima da curva binodal formam o SAB. ....	26
Figura 4: Fórmula química estrutural dos álcoois de cadeia curta utilizados para constituir os SABs apresentados nesse trabalho. ....	31
Figura 5: Diagramas de fases formados por NaOH + álcoois (etanol, n-propanol e isopropanol) + água à 25 °C. ....	40
Figura 6: Diagrama de fases do SAB constituído de NaOH + etanol (a); n-propanol (b); isopropanol (c) + água à 25 °C e à pressão atmosférica. ....	42
Figura 7: Recuperação e coeficientes de partição para os sistemas constituídos de NaOH + álcoois + água em diferentes temperaturas, separados de acordo com o TLL ( $\approx 55$ , $\approx 65$ e $\approx 75$ ). ....	44
Figura 8: Recuperação e coeficientes de partição para os sistemas constituídos de NaOH + isopropanol + água, nas temperaturas de 15 °C, em diferentes concentrações dos componentes. ....	46

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Aplicações dos AHs.....	21
Tabela 2: Exemplos de grupos de SAB e seus constituintes .....	30
Tabela 3: Pontos utilizados para construção da curva binodal, onde $w_1$ se refere ao NaOH e $w_2$ se refere ao álcool. ....	39
Tabela 4: Os parâmetros obtidos a partir da regressão da equação de Merchuk ajustada para os sistemas ternários compostos de NaOH + álcoois + água à 25 °C e pressão atmosférica. ....	40
Tabela 5: Composições das frações em peso das linhas de amarração, na fase superior (T) e na fase inferior (F), composição da mistura (M), e respectivos comprimentos de linhas de amarração (TLL) para os sistemas compostos por álcoois e NaOH à 25 °C e à pressão atmosférica.....	41
Tabela 6: Pontos críticos calculados a partir da extrapolação das linhas de amarração.....	43
Tabela 7: Valores de pH das fases de topo e fundo dos SABs e seus respectivos álcoois.....	43

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>15</b>
2.1. <i>SUBSTÂNCIAS HÚMICAS</i> .....	15
2.2. <i>ÁCIDOS HÚMICOS</i> .....	18
2.3. <i>APLICAÇÕES DOS ÁCIDOS HÚMICOS</i> .....	19
2.4. <i>EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS</i> .....	22
2.5. <i>EXTRAÇÃO LÍQUIDO – LÍQUIDO</i> .....	22
2.6. <i>SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO</i> .....	23
2.6.1. <i>O diagrama de fases de um SAB</i> .....	25
2.6.2. <i>Fatores que influenciam a partição de um SAB</i> .....	27
2.7. <i>APLICAÇÃO DE SAB NA EXTRAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS</i> .....	28
2.8. <i>COMPOSIÇÃO DOS SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS</i> .....	30
2.8.1. <i>HIDRÓXIDO DE SÓDIO</i> .....	31
2.8.2. <i>ÁLCOOL</i> .....	31
I. <i>METANOL</i> .....	31
II. <i>ETANOL</i> .....	32
III. <i>N - PROPANOL</i> .....	32
IV. <i>ISOPROPANOL</i> .....	32
<b>3. OBJETIVO E METAS.....</b>	<b>34</b>
3.1. <i>OBJETIVO GERAL</i> .....	34
3.2. <i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i> .....	34
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>35</b>
4.1. <i>MATERIAIS</i> .....	35
4.2. <i>DIAGRAMAS DE FASES</i> .....	35
4.3. <i>DETERMINAÇÃO DAS LINHAS DE AMARRAÇÃO</i> .....	35
4.4. <i>PARTIÇÃO DOS ÁCIDOS HÚMICOS NOS SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS</i> .....	37
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>38</b>
5.1. <i>DIAGRAMAS DE FASES</i> .....	38
5.2. <i>OBTENÇÃO DAS LINHAS DE AMARRAÇÃO</i> .....	41
5.3. <i>PARTIÇÃO DOS ÁCIDOS HÚMICOS NOS SABS</i> .....	43
<b>6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>48</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>49</b>

## 1. Introdução

As substâncias húmicas são materiais resultantes da decomposição de organismos e vegetais que sofreram intempéries físicos, químicos e biológicos. Estas substâncias ocorrem naturalmente no solo sendo, portanto, importantes para o ambiente em que estão inseridas. Estes compostos apresentam estrutura aromática e heterocíclica com alta massa molar. De acordo com a solubilidade as substâncias húmicas podem ser divididas em três grupos: os ácidos húmicos (AHs), os ácidos fúlvicos (AFs) e as huminas (Hs) (Cooper, 1999).

Os AHs consistem na porção solúvel e quimicamente ativa em pH neutro ou alcalino das substâncias húmicas obtidas de fontes de carbono não renováveis como a turfa, o carvão mineral, a leonardita, dentre outras (Vašková et al., 2011).

Estas moléculas são de grande interesse econômico, apresentando propriedades como ligação a metais catiônicos, caráter anfifílico que propicia a solubilização de moléculas apolares, solubilidade e dependência do pH, sendo também capazes de solubilizar alguns compostos hidrofóbicos. Tais propriedades já têm sido exploradas na medicina, estética e na agricultura (de Melo, Motta e Santana, 2016).

Para obtenção dos AHs a partir de substâncias húmicas, utiliza-se geralmente uma extração baseada na solubilidade, visto que as três porções das substâncias húmicas precipitam em diferentes faixas de pH. Contudo, apesar de efetivas, as extrações assim realizadas podem levar à alteração na estrutura molecular das substâncias húmicas (Saito e Seckle, 2014), além de comprometer o meio ambiente, provocando a redução da biodiversidade no local em que sua extração ocorre e conseqüentemente gerando um dano ambiental (Alexander, Nevison e Williams, 2010).

Nesse contexto, como uma alternativa promissora para a extração e purificação dos AHs, os sistemas aquosos bifásicos tornam-se promissores, por serem uma alternativa de baixo custo, que podem resultar em bons níveis de pureza e rendimento. Essas vantagens, associadas à facilidade na ampliação de escala, têm sido descritas na literatura para várias biomoléculas (Iqbal et al., 2016).

Os sistemas aquosos bifásicos podem ser empregados para separar biomoléculas de material celular ou de outros compostos presentes no meio. Por apresentar elevada quantidade de água no sistema, raramente é observado dano à molécula que se deseja particionar. Além disso, a baixa tensão interfacial dos sistemas pode ser capaz de proteger a molécula (Asenjo e Andrews, 2011).

Neste sentido, este trabalho visou estudar o particionamento de AHs comerciais em sistemas aquosos bifásicos alcalinos formados por álcoois de diferentes cadeias e NaOH. Acredita-se que a aplicação desse método de particionamento em trabalhos futuros seria interessante para a purificação dos AHs produzidos por fermentação já demonstrados por nosso grupo de pesquisa.

## 2. Fundamentação teórica

### 2.1. Substâncias húmicas

Por muitos anos o potencial do solo tem sido estudado em relação à capacidade de troca iônica, atividade microbiana e retenção de nutrientes. A matéria orgânica presente no mesmo é responsável por uma grande parcela das características desse, levando a um grande interesse de parte de alguns estudiosos. Sendo assim, diversas pesquisas têm sido destinadas a estudar e avaliar a presença de substâncias húmicas no solo, visto que essas apresentam papel importante na nutrição vegetal (Tate, 1987; Cooper, 1999; Borsari, 2013; Busato et al., 2010).

Substâncias húmicas são substâncias orgânicas de ocorrência natural, advindas da decomposição de resíduos de plantas e animais, que resultam em estruturas complexas, de massa molar relativamente alto, formada a partir de reações de síntese secundária. O termo substâncias húmicas é utilizado para descrever o material colorido encontrado no solo, de acordo com a sua solubilidade (Tate, 1987).

A formação das substâncias húmicas, chamada de humificação, dá-se pelo acúmulo de resíduos de matéria orgânica que, sob ação de intempéries físicos, biológicos e químicos, associam-se em estruturas mais estáveis, culminando na formação de moléculas de maior estrutura (Baldotto et al., 2010).

Apesar de não serem completamente elucidados os processos bioquímicos que resultam na formação das substâncias húmicas, sabe-se que elas são mantidas agregadas por meio de forças de interações fracas, como ligações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio. Substâncias húmicas são compostos quimicamente complexos, ácidos, sendo predominantemente aromáticos, hidrofílicos e de variável massa molar (Schnitzer, 1978; Baldotto, 2014).

Existem quatro hipóteses descritas por Felbeck (1971) sobre a formação das substâncias húmicas:

1. A hipótese de alteração da vegetação: os tecidos vegetais, resistentes à degradação microbiana, se acumulariam e seriam superficialmente alterados para formação das substâncias húmicas. A composição dessas substâncias húmicas seria fortemente influenciada pela natureza das plantas que as originaram;

2. A hipótese da polimerização química: neste caso, acredita-se que as plantas seriam degradadas pela microbiota que as utilizaria como fonte de carbono e energia. A síntese microbiana de fenóis e aminoácidos, que são liberados no meio ambiente, seria responsável

pela formação das substâncias húmicas, pois os produtos do metabolismo microbiano seriam oxidados e polimerizados até a formação das substâncias húmicas;

3. A hipótese da autólise celular: na qual a morte celular natural da planta resultaria na formação de substâncias húmicas como produtos, pois os fragmentos celulares seriam condensados e polimerizados pela ação de radicais livres;

4. A hipótese da síntese microbiana: as substâncias húmicas seriam formadas a partir dos tecidos celulares das plantas, que os micro-organismos utilizam como fonte de energia e carbono, para formação de substâncias húmicas intracelulares de alto massa molar, sendo essas liberadas no ambiente após a morte microbiana. Em seguida, essas substâncias são quebradas em porções menores, resultando em grupos de diferente classificação.

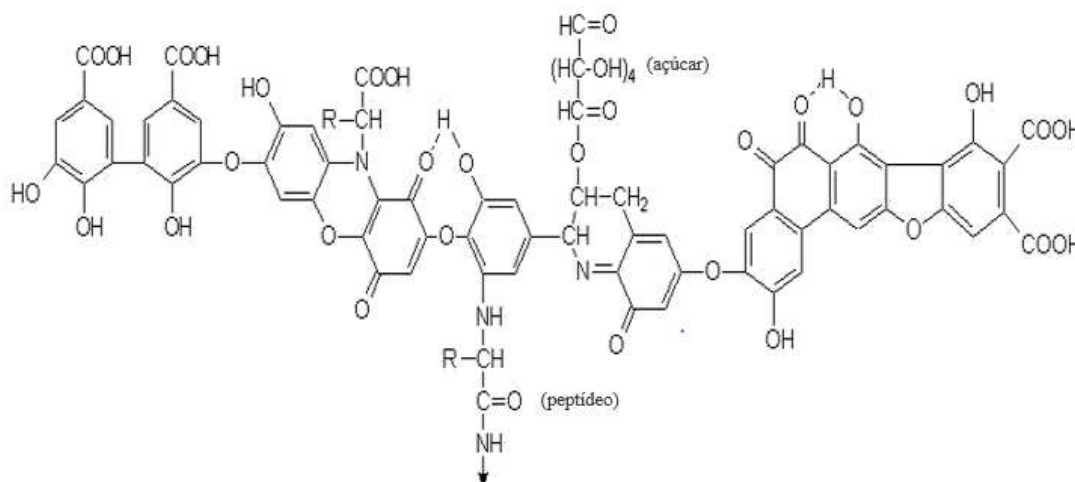
Apesar das hipóteses serem diferentes, é comum que a formação de um complexo de alto massa molar ocorra primeiro, sendo esse posteriormente degradado a complexos de menor massa molar. É provável que todos os processos de humificação ocorram simultaneamente, sendo um deles predominante em determinadas condições ambientais.

As substâncias húmicas podem ser divididas em três grupos de acordo com sua solubilidade em soluções ácidas ou básicas, sendo esses: ácidos húmicos (AHs), ácidos fúlvicos (AFs) e huminas. Em estudos conduzidos por Schnitzer e Khan (1972), observou-se que os três grupos das substâncias húmicas apresentam semelhança, contudo diferem em sua massa molar e na razão Carbono/Nitrogênio das moléculas (Aiken et al., 1985).

- Ácidos húmicos: são compostos complexos formados por polímeros aromáticos e alifáticos (Figura 1), de elevada massa molar e alta capacidade de troca iônica. Esses compostos consistem-se na fração solúvel em meio alcalino e insolúvel em meio ácido quando o pH é menor que 2. Sua coloração varia de marrom escuro a cinza (Canellas e Santos, 2005; Santos et al., 2008).

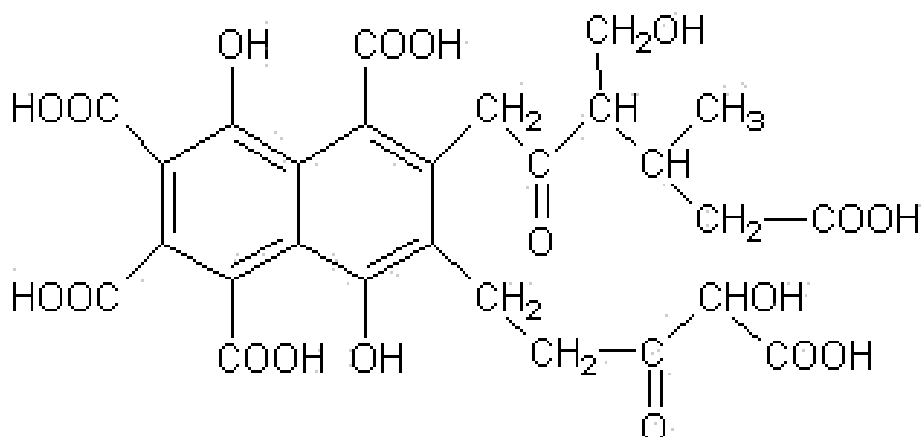


**Figura 1:** Modelo estrutural dos ácidos húmicos (Fonte: Adaptado de Stevenson, 1982).



- **Ácidos fúlvicos:** representam a fração solúvel em uma ampla faixa de pH, solubilizando-se em meios ácidos e alcalinos. São formados por aminoácidos, compostos fenólicos e polissacarídeos, como mostra a Figura 2. Possuem baixa massa molar (em relação aos AH) e apresentam alta quantidade de grupos carboxílicos, apresentando-se muitas vezes associados à íons presentes no solo, como Fe, Ca e Cu. Sua coloração se encontra na faixa de amarelo a amarelo escuro.

**Figura 2:** Modelo estrutural dos ácidos fúlvicos (Buffle, 1977).



- **Huminas:** são as substâncias que não podem ser extraídas do solo por estarem fortemente ligadas aos minerais. Assim, as huminas consistem na fração insolúvel das substâncias húmicas, independente do pH do meio, possuindo baixa capacidade de reação.

Apresentando-se na cor preta, não possuem fórmula química definida (Baldotto e Baldotto, 2014).

## 2.2. Ácidos húmicos

Sendo um dos principais componentes das substâncias húmicas, os ácidos húmicos são compostos amorfos, coloidais e polidispersos de complexa composição e estrutura, vindos de uma associação heterogênea de pequenas subunidades de diferentes naturezas químicas, resultando em variados grupos funcionais que compõem essa molécula, como ácido carboxílico (COOH), álcool (OH), éter, quinona, dentre outros. Devido à sua alta disponibilidade na natureza, assim como sua composição, estrutura e aplicabilidade, esses compostos têm sido alvo de diversos estudos, visto que podem ser aplicados na agricultura, indústria, ambiente e biomedicina (Schnitzer, 1978; Sposito, 1986; Stevenson, 1994; Zahng et al., 2017).

Uma fonte importante de obtenção dos ácidos húmicos é a leonardita, a qual contém 40% desses ácidos e, portanto, supera outras fontes de obtenção como a turfa e o carvão lignite, cujo teor de ácidos húmicos em sua composição é de apenas 10%. Por acontecer a partir de fontes não renováveis de carbono, a extração dos ácidos húmicos tende a ser comprometida no âmbito ambiental, levando à destruição de importantes componentes da biodiversidade (Alexander, Nevison e Williams, 2010).

Por serem moléculas heterogêneas, há dificuldades para determinar precisamente a estrutura dos AHs. Desse modo, faz-se necessário o tratamento das amostras para redução da sua heterogeneidade, por meio de cromatografias e precipitações, para facilitar o estudo de sua estrutura (Zahng et al., 2017). Portanto, ainda não há uma metodologia oficial e previamente determinada para a extração desses ácidos, sendo bastante comum o uso de extratores como o ácido fórmico, solventes orgânicos e o pirofosfato de sódio. A extração mais completa desses compostos utiliza álcalis. Porém, este protocolo propicia riscos de alteração estrutural (Rosa, Rocha e Furlan, 2000).

As propriedades dos ácidos húmicos incluem solubilidade dependente do pH, interação com grupos hidrofóbicos, capacidade anfifílica e presença de diferentes grupos funcionais em cada molécula (de Melo, Motta e Santana, 2015).

Em relação à solubilidade, são solúveis em meio alcali e insolúveis em meio ácido, característica que pode variar de acordo com a composição química e origem dos mesmos. Em meio alcalino, ocorre a desprotonação de grupos carboxílicos e fenólicos, resultando em uma configuração alongada da molécula. Já quando o pH decai, tem-se a protonação dos grupos

funcionais, diminuindo a repulsão entre esses, fazendo com que a molécula se adapte em uma estrutura menor e mais compacta (von Wandruszka, 2000).

A presença de diferentes grupos funcionais confere aos ácidos húmicos a capacidade de se ligar à metais catiônicos, formando complexos que podem ser úteis em diversas aplicações, desde aquelas relacionadas ao meio ambiente quanto nas aplicações biomédicas. A capacidade de ligação das moléculas de ácidos húmicos aos metais varia de acordo com o tamanho da molécula. Christl e colaboradores (2001), verificaram que, quando menor a massa molar do ácido húmico, maior o número de grupos fenólicos e carboxílicos, levando à uma ligação mais eficiente desses aos metais de interesse. Essa capacidade de ligação é interessante no âmbito de remediação ambiental, visto que é possível utilizar os ácidos húmicos para a remoção de metais pesados que contaminaram o solo e a água, sendo essa remediação bastante estudada. Por outro lado, se o ambiente é ácido, o que é comum em águas poluídas com metais pesados, a formação dos complexos de íons – HA está comprometida, visto que a solubilidade é reduzida, assim como a capacidade de ligação dos mesmos (de Melo, Motta e Santana, 2015).

### 2.3. *Aplicações dos ácidos húmicos*

A fração bioativa das substâncias húmicas tem despertado o interesse em pesquisas relacionadas ao sistema agrário, visto que as substâncias húmicas são capazes de interferir diretamente no metabolismo vegetal, influenciando na respiração, no conteúdo de clorofila, na síntese de materiais genéticos e enzimas e no transporte de íons. Não se sabe ao certo como esses ácidos húmicos agem, porém sabe-se, de modo geral, que esses atuam na disponibilidade de micro e macronutrientes (Borsari, 2013).

Quaggiotti e colaboradores (2004) observaram que a aplicação de ácidos húmicos em culturas de milho propicia o aumento da absorção de nitrato pelas raízes. Jannin e colaboradores verificaram também um aumento da absorção de nitrato, juntamente com um aumento da expressão de genes que codificam o transporte desse. Ambas pesquisas ressaltam o potencial dos ácidos húmicos em relação à agricultura (Baldotto e Baldotto, 2014).

Os AH apresentam também efeitos antivirais, havendo trabalhos reportando que polímeros baseados em AH o citomegalovírus e do vírus vaccínia. Na maioria dos casos, a ação do AH ou de um polímero baseado em AH se dá nos estágios iniciais de replicação do vírus, tornando uma vantagem para a utilização como medida profilática, visto que, em casos de

tratamento quando o vírus já se encontra mais desenvolvido, esse uso pode ser comprometido (Klöcking e Helbig, 2005).

Mesroglu e colaboradores (1998) reportaram o efeito de ativação da fibrinólise, mecanismo que impede a formação de fibras em estágios pós cirúrgicos, em ratos que passaram por laparotomia. O AH inibe uma das enzimas de coagulação, suprimindo a formação de monômeros de fibras (Klöcking e Helbig, 2005).

Estudos relacionados à atividade estrogênica em ratos dos ácidos húmicos foram conduzidos no Instituto de Pesquisa do Câncer e demonstraram que os AHs são capazes de penetrar na pele, contribuindo com a atividade estrogênica de alguns compostos. Essa descoberta também pode servir como início de pesquisas na área de dermatologia e cosmética (Klöcking e Helbig, 2005).

No âmbito da medicina veterinária, os AHs são substância utilizadas na profilaxia e como drogas terapêuticas na Europa. Esses são administrados como analgésicos, antimicrobianos e no tratamento de má nutrição e diarreia. Porém, apesar dos estudos demonstrarem que os AH não são tóxicos e nem teratogênicos, acredita-se que esses tem causado o desenvolvimento de doenças como artroses e o crescimento de placas de cartilagem em alguns casos (Vašková et al., 2011).

Na área de medicina humana, Mirza e colaboradores (2011) demonstraram que, quando complexada com AH, a carbamazepina, um fármaco utilizado para tratamento da epilepsia, é capaz de penetrar com maior eficiência nas células cerebrais, tanto *in vitro* quando *in vivo*. Além disso, por terem demonstrado boa atividade antioxidante, os AH poderiam cuidar do estresse oxidativo ocasionado por convulsões relacionadas à doença.

Além dos trabalhos já descritos, a Tabela 1 lista alguns outros trabalhos relatados na literatura para potencial aplicação dos AHs.

**Tabela 1:** Aplicações dos AHs.

<b>Ano</b>	<b>Autores</b>	<b>Estudos</b>
2016	Koocheki e colaboradores.	Investigaram a influência de diferentes taxas de AH no crescimento e rendimento do açafão e encontram que a aplicação de diferentes níveis de ácido húmico apresentou efeito positivo nos parâmetros analisados, quando comparados com o controle.
2015	Nan e colaboradores.	Investigaram o efeito da adição de AHs e gesso de dessulfuração de gases de combustão (FGD) na melhoria do solo costeiro e a influência no rendimento de colza. A associação entre o AH e o FGD resultaram em uma maior tolerância ao sal, aumentando o rendimento da planta colza.
2015a	Wang e colaboradores.	Demonstraram que é possível preparar nanopartículas de cobre para detecção de glicose, utilizando AHs. Foi possível obter nanopartículas de alta estabilidade devido às propriedades redutoras e estabilizantes dos AHs.
2009	Wollina, U.	Relatou diversos estudos das propriedades dos AHs que podem ser aplicadas na dermatologia, como proteção contra raios UV e prevenção da reativação viral após tratamentos químicos.
1995	Zanetti, M.	A atividade antiviral dos AHs foi patenteada contra o vírus da imunodeficiência humana tipo 1 e 2, sendo capaz de inibir a replicação viral impedindo sua ligação à superfície celular.

Diante das diversas aplicações dos AHs, faz-se necessário encontrar métodos de obtenção e extração dessas substâncias que permitam que essas aplicações possam ser mais

desenvolvidas e comercializadas.

#### *2.4. Extração e fracionamento das substâncias húmicas*

Os processos clássicos de recuperação das substâncias húmicas a partir da matéria orgânica envolvem a extração alcalina dos ácidos húmicos e fúlvicos. Uma vez que o extrato alcalino é formado, sua acidificação leva à precipitação dos AH, deixando os AF em solução. Apesar de efetiva, a extração alcalina pode levar à mudança na configuração das substâncias húmicas obtidas (Saito e Seckler, 2014).

No geral, é utilizada a extração com uma solução de NaOH como extrator alcalino. A concentração dessa solução irá afetar o rendimento do material extraído, assim como seu conteúdo de cinzas. Ponomarova e Plotnikova (1968) determinaram que a extração com NaOH 0,1 N é mais eficiente quando comparada à outras concentrações da mesma solução.

Hayes e colaboradores (1975) compararam treze tipos de extrações das substâncias húmicas, incluindo solventes orgânicos, e obtiveram como resultados que a solução de NaOH é mais segura que a etilenodiamina. Embora o rendimento tenha sido similar, verificou-se que a etilenodiamina altera a natureza química e a composição do extrato. O grande problema da extração dos AHs utilizando solventes, reside no fato de que pode haver modificação permanente das substâncias húmicas, mediante adição de carbono e nitrogênio às moléculas, alterando sua composição e propriedades.

Diante dos estudos acima citados, a IHSS (*International Humic Substances Society*) definiu um método para obtenção das substâncias húmicas (AHs e AF) baseado em extração alcalina seguida da precipitação por acidificação do meio (Kuwatsuka et al., 1990).

No que concerne ao fracionamento das substâncias húmicas, tem-se métodos baseados nas diferenças de solubilidade entre os grupos. Um método frequentemente utilizado é a filtração em gel, a partir do qual se torna possível separar as substâncias húmicas com base apenas na sua massa molar, utilizando-se tampões alcalinos contendo cátions de aminoácidos. Outro método amplamente utilizado para purificação do AH é a diálise, porém esse método não remove metais que estejam fortemente aderidos à molécula (Schnitzer, 1978).

#### *2.5. Extração líquido – líquido*

A extração líquido-líquido consiste em uma operação de transferência de massa, onde dois líquidos entram em contato e haverá transferência de matéria de uma fase para a

outra. Essa transferência de matéria acontece devido à diferença de potencial químico dos componentes que serão separados entre as duas fases não miscíveis (Treybal, 1968; Amani et al., 2018).

A extração líquido-líquido pode ser conduzida de forma contínua ou descontínua. A extração líquido-líquido contínua é realizada com auxílio de um equipamento de extração com duas entradas, onde as fases são colocadas em contracorrente para que a extração do material que se deseja separar seja realizada de forma mais eficiente. Já na extração líquido-líquido descontínua, a separação acontece em um sistema fechado (Seader, Henley e Roper, 2011).

No geral, em uma extração líquido-líquido é composta de três componentes: o soluto, o diluente e o solvente. Esse último componente faz-se necessário para que essa extração seja possível em condições amenas de temperatura e pressão, visto que ele influencia na solubilidade da mistura formada pelo diluente e pelo soluto (material que se deseja separar). Sendo o solvente solúvel em apenas um dos outros dois compostos, a solubilidade mútua dos líquidos diminui, resultando no princípio da extração líquido-líquido: o aumento da insolubilidade. A adição de um solvente imiscível que possui afinidade seletiva pelo soluto possibilita a separação das misturas em duas fases, sendo uma rica em diluente e a outra rica em soluto (Seader, Henley e Roper, 2011).

A separação de fases é explicada termodinamicamente pois, quando em temperatura e pressão adequadas, dois líquidos são colocados em contato direto, pode ocorrer a formação de duas fases na busca por uma maior estabilidade, levando ao equilíbrio termodinâmico. A formação de duas fases significa que a energia livre de Gibbs é menor quando os componentes estão separados em duas fases do que quando esses formam uma mistura homogênea (Smith, Van Ness e Abbott, 2000).

Os SABs consistem em um tipo de sistema de extração líquido-líquido, onde o solvente principal é a água. Essa técnica foi desenvolvida visando a extração de biomoléculas sensíveis a outros tipos de extração pois os SABs apresentam elevada quantidade de água, sendo um ambiente propício para biomoléculas (Monteiro Filho, 2010).

### *2.6. Sistema Aquoso Bifásico*

Esse protocolo de extração, particionamento e concentração de moléculas foi descoberto ao caso ao final do século XIX, quando uma mistura aquosa de gelatina e ágar apresentou a formação de duas fases líquidas. O sistema aquoso bifásico (SAB) consiste em um

método de extração líquido-líquido, que acontece quando dois compostos solúveis em água são misturados acima da concentração crítica de cada um, resultando em duas fases imiscíveis. Os primeiros relatos dos componentes capazes de formar os SABs são de polímero – polímero, seguidos de relatos de polímero – sal (Albertsson, 1990; Gupta, Bradoo e Saxena, 1999; Zhao et al., 2014).

O sistema possui baixa tensão superficial, visto que ambas as fases são hidrofílicas, porém em diferentes níveis. Sendo a fase uma região termodinamicamente estável, por apresentar duas fases, os componentes do SAB tenderão a distribuir-se entre ambas, permanecendo na fase onde a afinidade e estabilidade dos componentes é maior. Tal característica faz com que o SAB seja ideal para a purificação de biomoléculas que apresentam sensibilidade aos processos tradicionais, como proteínas e enzimas. Além disso, os SABs tem sido aplicados para extração de compostos fenólicos (Oliveira et al., 2019), alcaloides (Placido et al., 2018), cafeína (Santos et al., 2016), capsaína (Santos et al., 2016), entre outras moléculas. Por apresentarem elevada quantidade de água em ambas as fases, os SAB constituem ambientes favoráveis para a presença de moléculas biológicas (Monteiro Filho, 2010; Ratanapongleka, 2010).

O SAB apresenta como principais vantagens a alta capacidade e alto rendimento, baixo tempo de processamento e energia, minimização de custos, segurança, atoxicidade, biocompatibilidade e facilidade de adaptação para uma purificação em escala industrial. Por outro lado, tem-se também as desvantagens, como a alta viscosidade em sistemas formados por polímeros, a polaridade dos sistemas formados por carboidratos e a recuperação dos constituintes (Chethana, Nayak e Raghavarao, 2007; Lima e Santana, 2017; Zhao et al., 2014).

O coeficiente de partição é o parâmetro adimensional o utilizado para avaliar a extensão das separações das biomoléculas entre as fases do sistema em equilíbrio. Esse coeficiente é influenciado pelo balanço de interações que ocorrem no SAB, considerando as interações eletrostáticas, hidrofóbicas e por pontes de hidrogênio e também as de força iônica. O coeficiente de partição é definido como a razão da concentração da molécula nas fases de topo e fundo (Mageste et al., 2009; Prinz et al., 2014).

A biomolécula se apresentará mais concentrada nas fases em que a condição de menor potencial químico ou maior solubilidade estiver estabelecida, visto que essa rege a partição das biomoléculas entre as fases. As características físico-químicas das biomoléculas e da solução influenciam no valor da constante de partição (Johansson et al., 2008; Lima e Santana, 2017).



A partição das biomoléculas entre as fases também pode ser influenciada pelas características das próprias fases, como pH, a presença de sais orgânicos, a natureza química, a concentração e a presença de ligantes ao longo da cadeia polimérica. Assim sendo, a alteração desse SAB por meio da adição de sais pode aumentar a partição das biomoléculas. Foi reportado que em sistemas PEG-sal, devido à uma maior diferença na densidade entre as fases, ocorre uma separação mais rápida do que aqueles sistemas constituídos por dois polímeros (Chaiwut, Rawdkuen e Benjakul, 2010; Nascimento et al., 2011).

Outros efeitos que podem influenciar no particionamento das biomoléculas são os efeitos de volume de exclusão e o *salting-out*. O volume de exclusão é resultado do aumento da concentração do polímero, que faz com que os espaços livres na fase polimérica diminuam, fazendo com que as moléculas se movam para a outra fase. Já o efeito de *salting-out* ocorre devido à alteração na concentração de sal, sendo que, quando essa é aumentada, a solubilidade das biomoléculas é diminuída, levando à migração da biomolécula para a fase oposta (Lima et al., 2017).

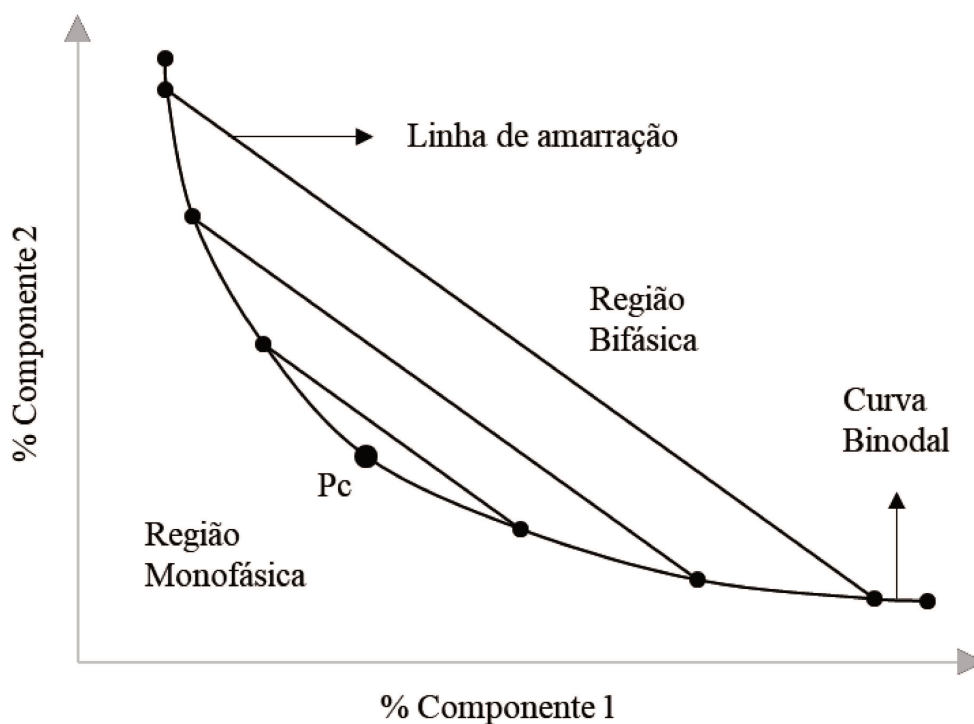
### 2.6.1. O diagrama de fases de um SAB

A composição química de um SAB que se encontra em equilíbrio termodinâmico é, em geral, representada por um diagrama de fases. O diagrama de fases ou equilíbrio consiste em uma representação gráfica para expressar as concentrações de um sistema de fases, podendo esse ser expresso em coordenadas triangulares ou coordenadas cartesianas, visto que é possível suprimir o conteúdo de água, considerando que esse é elevado em ambas as fases. O desenvolvimento de uma representação gráfica de composição de fases do SAB é importante para que seja possível estudar a separação das biomoléculas, sendo essa representação necessária como ponto de partida para um processo de extração. Uma vez que a energia livre de Gibbs é um parâmetro que expressa o equilíbrio molecular, tem-se a sua variação regendo o diagrama, auxiliando a compreensão dos fatores que determinam a partição dos solutos entre as fases de um SAB (da Silva e Loh, 2006; Dreyer et al., 2009; Sousa et al., 2009).

No diagrama de fases, por convenção, o eixo das ordenadas representa a composição em massa da molécula que está em maior concentração na fase de topo e o eixo das abcissas representa a composição em massa dos componentes que estão em maior quantidade na fase de fundo, como pode ser observado na Figura 3. A partir desses diagramas podem ser obtidas as composições globais do sistema (Hatti-Kaul, 2000).

Cada fase do sistema é enriquecida com uma fase aquosa de natureza química e física diferentes. Os diagramas de fases são compostos por um conjunto de dados que em conjunto formam a curva binodal, que consiste em uma curva de equilíbrio. Acima dessa, tem-se concentrações na qual haverá a formação de um sistema de duas fases imiscíveis, e abaixo da curva, tem-se as concentrações que formam sistemas de apenas uma fase. A linha TL é chamada de linha de amarração e conecta dois pontos da curva binodal, essas linhas demonstram que todos os sistemas que se encontram em cima da linha exibem a mesma composição no equilíbrio, de modo que ambos os componentes do sistema estejam presentes na fase líquida (Albertsson, 1986; Wang et al., 2015b). A obtenção de linhas de amarração é importante porque as misturas com composições globais, que são representadas por pontos que pertencem a uma mesma linha de amarração, geram fases superiores que apresentam as mesmas propriedades termodinâmicas intensivas, como volume molar, densidade, entalpia molar, etc; diferindo nas propriedades termodinâmicas extensivas, como massa e volume, por exemplo (Silva e Loh, 2006).

**Figura 3:** Representação esquemática de um diagrama de fases. Concentrações acima da curva binodal formam o SAB.



O ponto representado pela letra  $P_c$  é chamado de ponto crítico, no qual os volumes e as composições das fases de topo e fundo são iguais. Quando apresentam composição próxima ao ponto crítico, os sistemas são pouco estáveis, significando que qualquer alteração, mesmo que mínima no sistema, resulta em mudanças significativas, variando na presença de uma ou duas fases. Próximo ao  $P_c$ , menor é a diferença entre as fases e o coeficiente de partição se aproxima de 1. A obtenção do  $P_c$  dá-se pela intersecção da linha que passa pelo ponto médio das linhas de amarração de uma curva binodal (Rodrigues et al., 2001; Brites, 2005).

Uma redução no pH move a curva de equilíbrio para a direita. Assim sendo, aumenta-se a concentração necessária para a formação de duas fases. Por exemplo, no caso do fosfato, esse efeito é explicado pelo aumento da proporção de  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$  quando o pH é diminuído. Tal aumento deve ocorrer pois o ânion monovalente causa menor efeito no *salting-out* do PEG, sendo assim, uma maior concentração de sal e/ou polímero é necessária para que duas fases possam se formar (Padilha et al., 2011).

Outro fator que pode alterar mover a curva de equilíbrio de um SAB é a utilização de um polímero de elevada massa molar, visto que a solubilidade desse diminui com o aumento da sua massa molar. Assim, ocorre uma extensão da área bifásica, sendo menor a concentração do sal (ou do outro componente do sistema) necessária para que as fases se separem em duas (Voros, Proust e Fredenslund, 1993; Carvalho, 2007).

### 2.6.2. Fatores que influenciam a partição de um SAB

A partição das moléculas entre as duas fases do sistema é resultado das seguintes interações: componente 1 – molécula, componente 2 – molécula, componente 1 – componente 2, componente 1 – água, componente 2 – água e molécula – água. Tais interações são complexas e o balanço entre elas determina por qual fase a molécula terá preferência para particionar (Luechau, Ling e Lyddiatt, 2010).

Portanto, a separação do SAB em duas fases é afetada por diversos fatores, como a concentração dos componentes, hidrofobicidade e temperatura. A maioria dos SAB são otimizados de acordo com as propriedades físico-químicas das biomoléculas a serem purificadas, condições otimizadas por um delineamento de experimentos detalhado e preciso (Goja et al., 2013).

- i. Concentração dos componentes

A partição de uma molécula de interesse no sistema pode ser diretamente influenciada pela concentração dos componentes, que é dada de acordo com o comprimento das linhas de amarração (tie-line length – TLL). A influência ocorre de modo que, um aumento do TLL, acarreta em uma diminuição do volume livre na fase de fundo pois, à medida que o valor do TLL aumenta, a diferença entre a composição das fases torna-se maior, podendo alterar a eficiência na partição da molécula de interesse (Malpiedi et al., 2009; Pei et al., 2012).

#### ii. Hidrofobicidade

O efeito de hidrofobicidade está relacionado com a identidade química dos componentes do sistema e também com suas concentrações. Embora ambas as fases sejam solúveis em água, a fase com maior concentração de solvente orgânico é mais hidrofóbica. Essa característica influencia na separação das moléculas mais hidrofóbicas para essa fase em particular, bem como expulsão das moléculas mais hidrofílicas para a fase oposta (Prinz et al., 2014).

#### iii. Temperatura

No geral, a temperatura é capaz de deslocar o equilíbrio dos SABs. Desse modo, em baixas temperaturas, a curva binodal desloca-se em direção às baixas concentrações dos componentes de formam o sistema, aumentando o TLL. Quando próximos ao  $P_c$ , os sistemas podem sofrer uma maior influência da temperatura devido à sua instabilidade, podendo passar então para a região monofásica (Sarubbo, 2000).

Estudos já reportados na literatura relataram que a temperatura tem pouco ou nenhum efeito em SABs constituídos de álcoois hidrofílicos e sais (Katayama e Miyahara, 2006; Wang et al., 2010a). Em contrapartida, Han e colaboradores (2013) relataram que um aumento na temperatura em sistemas constituídos de álcoois e NaOH, resulta em uma expansão da região bifásica, indicando que a temperatura é um fator que influencia na formação do SAB. Sendo assim, ao comparar os dois estudos, pode-se dizer que a temperatura influencia o sistema dependendo do sal (ou base) utilizado (Han et al., 2013).

### 2.7. *Aplicação de SAB na extração de biomoléculas*

Os SABs têm recebido atenção em relação à extração de corantes (Santos et al. 2018), compostos fenólicos (Oliveira et al., 2019), alcaloides (Placido et al., 2018), dentre outras moléculas, em detrimento dos métodos tradicionais de purificação, visto que esses

podem exigir muitas fases para que a obtenção dessas moléculas aconteça, além da possibilidade de danos à sua estrutura, fazendo com que haja perda de função e, conseqüentemente, aplicação. Diversas pesquisas utilizando SABs para purificação de compostos têm sido conduzidas devido à facilidade da aplicação desse processo em larga escala (Iqbal et al., 2016).

Gu e Glatz (2007) conseguiram extrair com sucesso uma proteína produzida no endosperma e embrião de milho, demonstrando que uma otimização das condições de extração pode levar à uma recuperação elevada.

Berlo e colaboradores (2000) realizaram a partição de diversos aminoácidos em SAB formados de polietilenoglicol (PEG) e carbamato de amônio, observando que nesse sistema não houve influência da massa molar do polímero na partição, fator de influência já observado em outros sistemas.

Suarez Ruiz e colaboradores (2017) estudaram a separação da enzima Rubisco, enzima importante na captação do CO<sub>2</sub> no ciclo de Calvin, em SAB constituído de um líquido iônico (Iolilyte – 2221PG) e citrato de potássio em comparação com um sistema clássico PEG 400 e citrato de potássio. Observou-se que o SAB baseado em líquido iônico apresentou maior eficiência na formação de duas fases e também na separação da enzima Rubisco. Atribuiu-se essa separação ao maior efeito de *salting-out* do citrato de potássio sobre o Iolilyte 221PG e uma maior hidrofobicidade do líquido iônico.

Os SAB também podem ser aplicados para extração de metais pesados de ambientes contaminados, sendo essa uma técnica ambientalmente segura. Hamta e Dehghani (2017) observaram que é possível isolar cobre, zinco e mercúrio a partir do uso de SAB em sistemas compostos por PEG-6000 e carbonato de sódio, sendo necessários mais estudos para otimização da aplicação em escala industrial.

Um ramo que tem recebido atenção recentemente é a fermentação extrativa, que consiste em um processo onde o SAB é integrado com a bioconversão de produtos que apresentem baixo rendimento. A baixa produtividade é um problema de algumas fermentações, visto que alguns produtos podem se apresentar tóxicos ou instáveis. Sendo assim, em uma fermentação extrativa seria possível a obtenção de uma maior quantidade do produto final, devido às características de baixa tensão interfacial, seletividade na separação e biocompatibilidade do SAB. Tal estratégia apresenta-se vantajosa por permitir que a produção e recuperação do bioproduto aconteça simultaneamente, reduzindo o número de etapas necessário para obtenção do mesmo (Iqbal et al., 2016).

## 2.8. Composição dos Sistemas Aquosos Bifásicos

Os SABs podem ser constituídos de diferentes componentes, tais como polímeros (Lucena et al., 2017; Cardoso et al., 2015), açúcares (Cardoso et al., 2013), sais inorgânicos (Reis et al., 2015), solventes orgânicos (Santos et al., 2016; Cienfuegos et al., 2017), e líquidos iônicos (Santos et al., 2015; Santos et al., 2016a). A Tabela 2 exemplifica alguns exemplos de pares constituintes muito utilizados para formação dos SABs.

**Tabela 2:** Exemplos de grupos de SAB e seus constituintes

<b>Grupos dos SAB</b>	<b>Constituintes</b>	<b>Referência</b>
Polímero - polímero	PEG/PVA	Pessoa Junior e Kilikian, 2005
	PEG/Poli ácido acrílico	Saravanan et al., 2008
Polímero - sal inorgânico	PEG/ sulfato (sódio e magnésio)	Oliveira et al., 2009
	Copolímero UCON/Sulfato (amônio, sódio e potássio)	Rico-Castro et al., 2017
	PEG/tartarato de potássio	González-Amado et al., 2017
Solvente Orgânico - Sal Inorgânico	Álcool/ Citrato de sódio	OOI et al., 2009
	Álcool/sulfato de amônio	Wang et al., 2010b
	Álcool/Sais de Potássio	Reis et al., 2012
	Tetrahidrofurano/sais de sódio	Santos et al., 2018
Líquido Iônico - Sal Inorgânico	[C <sub>4</sub> min]Cl/ Fosfato de potássio	Louros et al., 2010
	[EMIM]Cl e [BMIM]Cl/ Sais de fosfato	Bezold, Goll e Minceva, 2015
Líquido Iônico - Carboidratos	[C <sub>4</sub> mim][CF <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> ]/mono e dissacarídeos	Freire et al., 2011
Solvente Orgânico - Carboidratos	Tetrahidrofurano/mono e dissacarídeos	Cardoso et al., 2014
		Sousa et al., 2017

Como os SABs podem ser constituídos de diferentes componentes, foram descritos abaixo os reagentes utilizados nesse trabalho, bem como suas propriedades químicas.

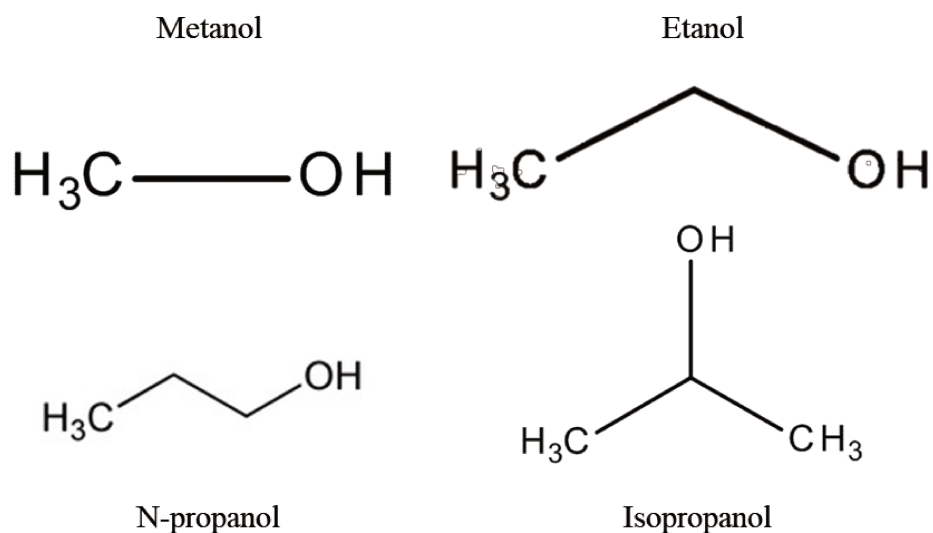
### 2.8.1. Hidróxido de sódio

O hidróxido de sódio (NaOH) é um composto sólido à temperatura ambiente de massa molar  $39,99 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , apresentando ponto de fusão igual a  $318 \text{ }^\circ\text{C}$  e ponto de ebulição igual a  $1390 \text{ }^\circ\text{C}$ . O NaOH é solúvel em água, álcool e glicerol, sendo sua solubilidade em água igual a  $1,09 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . A solução aquosa de NaOH apresenta-se sem cor e sem cheiro, sendo mais densa que a água (PubChem).

### 2.8.2. Álcool

Nesse trabalho foram utilizados álcoois de cadeia curta apresentados nos tópicos abaixo. A escolha dos álcoois de cadeia curta deu-se devido à sua solubilidade em água e capacidade de formar SABs. As fórmulas estruturais dos álcoois utilizados nesse estudo estão representadas na Figura 4

**Figura 4:** Fórmula química estrutural dos álcoois de cadeia curta utilizados para constituir os SABs apresentados nesse trabalho.



#### i. Metanol

Também conhecido como álcool metílico, é um composto orgânico que apresenta fórmula de  $\text{CH}_3\text{OH}$ , sendo o álcool de menor cadeia existente. Sua massa molar é igual a  $32,04 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , e apresenta ponto de fusão baixo igual a  $-98 \text{ }^\circ\text{C}$ , sendo sua apresentação líquida à

temperatura ambiente. Já seu ponto de ebulição também é baixo, sendo esse 64,7 °C. O metanol é solúvel em água e levemente solúvel em óleos e gorduras (PubChem).

O uso primário do metanol se dá na indústria química como solvente ou matéria prima. Grande parte (65 %) do metanol produzido mundialmente é consumido para a produção de outros compostos como ácido acético e acetato de metila. A outra porção é convertida a formaldeído e seus derivados. Sua produção acontece a partir de diversas fontes de carbono, como carvão, gás natural e biomassa (Khadzhiev, Kolesnichenko e Ezhova, 2016).

#### *ii. Etanol*

Atualmente, o etanol utilizado no Brasil é advindo da fermentação da cana-de-açúcar e é usado como combustível em sua maioria puro ou misturado com gasolina. Por ser produzido a partir de fontes de carbono, apresenta-se como uma alternativa para aplicações industriais, além de ser uma fonte de energia renovável (Oliveira, Vaughan e Rykiel, 2005).

Apresenta fórmula estrutural de dois átomos de carbono ligados à uma hidroxila ( $C_2H_5OH$ ), conforme representado na figura x. De massa molar igual a 40,06  $g \cdot mol^{-1}$ , o etanol apresenta ponto de fusão igual a -144 °C e ponto de ebulição igual a 78 °C. Apresenta solubilidade infinita em água (PubChem).

#### *iii. N - propanol*

Também conhecido como 1- propanol ou propanol, é um solvente muito utilizado na indústria farmacêutica para resinas ou compostos derivados de celulose. Pode ser produzido na natureza a partir da decomposição de materiais orgânicos a partir de diversos microrganismos ou a partir de eteno derivado da indústria petroquímica. Pode ser utilizado para síntese de propileno ou isopropanol, um de seus isômeros (Gong et al., 2015).

Sua fórmula química consiste em três átomos de carbono, oito átomos de hidrogênio e um átomo de oxigênio ( $C_3H_7OH$ ). Apresenta ponto de fusão igual a -127 °C e ponto de ebulição igual a 97 °C. Sua massa molar é igual a 66,09  $g \cdot mol^{-1}$ . Também é miscível em água (PubChem).

#### *iv. Isopropanol*

Também conhecido como propano-2-ol, álcool isopropílico ou 2-propanol, esse álcool apresenta-se como uma substância líquida incolor, com forte odor alcoólico. O álcool



isopropanol é um isômero do n-propanol. Sua fórmula química é a mesma do n-propanol ( $C_3H_7OH$ ), porém um grupo OH está ligado ao segundo carbono da cadeia, como demonstrado em sua estrutura molecular apresentada na Figura 4. Sua massa molar é de  $60,10 \text{ g.mol}^{-1}$  e sua densidade de  $0,786 \text{ g.mL}^{-1}$  a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Seu ponto de fusão é igual a  $-90 \text{ }^\circ\text{C}$  e o ponto de ebulição igual a  $82,6 \text{ }^\circ\text{C}$ . Apresenta elevada solubilidade em água, sendo também solúvel em outros álcoois, dimetilformamida, clorofórmio, éter, glicerina, benzeno e acetona (PubChem).

### 3. Objetivo e metas

#### 3.1. *Objetivo geral*

O trabalho visou a obtenção de diagramas de equilíbrio para sistemas formados por soluções aquosas de quatro diferentes álcoois (metanol, etanol, isopropanol e n-propanol) e hidróxido de sódio, e subsequente emprego no particionamento de ácidos húmicos.

#### 3.2. *Objetivos específicos*

Para este trabalho teve-se como objetivos específicos:

- Construção de diagrama de fases para sistemas formados por diferentes álcoois e NaOH;
- Utilizar o modelo matemático de Merchuck (1998) para ajuste das curvas binodais e determinação das linhas de amarração dos sistemas propostos;
- Determinar os coeficientes de partição e recuperação dos ácidos húmicos nos sistemas propostos;
- Avaliar a influência da variação da concentração de NaOH e dos álcoois na partição dos ácidos húmicos.

## 4. Metodologia

Nesta seção serão apresentados os materiais e as metodologias empregadas para a realização dos procedimentos experimentais deste trabalho.

### 4.1. Materiais

Os SABs foram formados por diferentes álcoois tais como: metanol ( $\geq 99,9\%$ ), n-propanol ( $\geq 99,5\%$ ) e isopropanol ( $\geq 99,8\%$ ) adquiridos da Merck; etanol ( $\geq 99,5\%$ ) obtido da Synth, e NaOH ( $\geq 99\%$ ) adquirido da Êxodo Científica. O ácido húmico comercial utilizado foi obtido da Sigma-Aldrich®. Em todos os experimentos foi utilizada água destilada.

### 4.2. Diagramas de fases

Diagrama de fases para cada sistema foram construídos utilizando o método de turvação (cloud point) à temperatura de 25 °C e pressão atmosférica (Salabat et al., 2011). Soluções aquosas estoque de cada álcool na concentração 80 % (p/p) e de NaOH (30-40 %) foram previamente preparadas. A solução aquosa de NaOH foi gotejada lentamente sobre a solução aquosa do álcool até a obtenção de uma solução turva, que corresponde à região bifásica. Em seguida, adicionou-se gota a gota de água destilada, até a obtenção de uma solução límpida (região monofásica). O procedimento foi conduzido sob agitação contínua e os valores das massas da solução anotada para posterior cálculo. As curvas de saturação foram determinadas pelo método gravimétrico. A variação máxima da balança foi  $\pm 1,0 \times 10^{-4}$ g e o protocolo de turvação foi repetido até que fossem obtidos pontos suficientes para construção da curva binodal.

Para determinação das curvas binodais, foi utilizada a seguinte equação:

$$[\text{álcool}] = A \times \exp(B[\text{NaOH}]^{0.5} - C[\text{álcool}]^3) \quad (1)$$

onde A, B e C são parâmetros constantes obtidos a partir de regressão.

### 4.3. Determinação das linhas de amarração

A determinação das linhas de amarração (*tie-lines* – TL) foi realizada pelo método gravimétrico descrito por Merchuck e colaboradores (1998). As TL foram determinadas mediante escolha de pontos acima da curva (região bifásica), cuja escolha foi cuidadosamente analisada para que o comprimento das TL fosse semelhante entre os diferentes diagramas de equilíbrio para cada álcool. Uma composição foi preparada para os diferentes pontos de mistura, sendo a solução agitada vigorosamente, centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos (para acelerar a separação das fases), e deixada em repouso em banho a 25 °C por 3 horas para que fosse atingido o equilíbrio termodinâmico. Após 3 horas, as fases de topo e fundo foram separadas e pesadas, e os volumes foram determinados. Para determinação de cada TL foi aplicada a regra da alavanca na relação entre a composição mássica da fase de topo e do sistema global.

As TL foram então obtidas através da resolução de um sistema de quatro equações listadas a seguir, para determinação de quatro valores desconhecidos de  $[\text{álcool}]_T$ ,  $[\text{álcool}]_F$ ,  $[\text{NaOH}]_T$  e  $[\text{NaOH}]_F$ ,

$$[\text{álcool}]_T = A \times \exp(B[\text{NaOH}]_T^{0,5} - C[\text{NaOH}]_T^3) \quad (2)$$

$$[\text{álcool}]_F = A \times \exp(B[\text{NaOH}]_F^{0,5} - C[\text{NaOH}]_F^3) \quad (3)$$

$$[\text{álcool}]_T = \left( [\text{álcool}]_M / \alpha \right) - \left[ (1 - \alpha) / \alpha \right] [\text{álcool}]_F \quad (4)$$

$$[\text{NaOH}]_T = \left( [\text{NaOH}]_M / \alpha \right) - \left[ (1 - \alpha) / \alpha \right] [\text{NaOH}]_F \quad (5)$$

onde os índices M, T e F denotam, respectivamente, a mistura inicial e as fases de topo e fundo. Os valores de  $\alpha$  representam a proporção entre a massa da fase de topo e a massa total da mistura. O comprimento das linhas de amarração (*tie-line length* – TLL) foi determinado por meio da aplicação da equação (6), representada abaixo.

$$TLL = \sqrt{([\text{NaOH}]_T - [\text{NaOH}]_F)^2 - ([\text{álcool}]_T - [\text{álcool}]_F)^2} \quad (6)$$

O ponto crítico do diagrama de fases foi determinado por extrapolação das linhas de amarração dos sistemas individuais mediante aplicação da equação (7).

$$[\text{álcool}] = f + g[\text{NaOH}] \quad (7)$$

onde f e g são parâmetros definidos.

#### 4.4. Partição dos ácidos húmicos nos sistemas aquosos bifásicos

Os sistemas para partição dos AHs foram preparados em três diferentes concentrações de NaOH e álcool. Em tubos de centrífuga graduados de 15 mL, foram pesadas quantidades apropriadas dos constituintes do sistema (álcool, NaOH e água). Também foi pesada uma solução de AHs previamente preparada para que fosse obtida uma concentração de 50 mg. L<sup>-1</sup> nos SABs. Após preparo dos sistemas e mistura completa de todos os componentes, cada sistema foi deixado em repouso por 4 horas. Os sistemas foram colocados em repouso por 3 horas nas temperaturas de 15, 25 e 35 °C. O volume de ambas as fases foi quantificado e essas foram separadas para que o AH fosse quantificado. Todos os pontos do experimento foram conduzidos em triplicata.

As concentrações de AH nas fases de topo e fundo foram determinadas mediante leitura da absorbância a 350 nm utilizando um espectrofotômetro UV (Thermo Electron Corporation - Genesys 6). A curva de calibração foi previamente preparada utilizando AHs comerciais em diferentes concentrações como padrão (0,5, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 mg.L<sup>-1</sup>) e o branco utilizado foi a fase correspondente que estava sendo analisada.

O coeficiente de partição dos AHs ( $K_{AH}$ ) foi determinado a partir da relação entre as suas concentrações na fase de topo ( $C_T$ ) e fundo ( $C_F$ ). A porcentagem de recuperação foi determinada utilizando a Equação (9).

$$K_{AH} = \frac{C_T}{C_F} \quad (8)$$

$$R_{AH} = \frac{100}{1 + \left[ \frac{1}{R_V \times K_{AH}} \right]} \quad (9)$$

onde  $R_{AH}$  é a recuperação dos AHs na fase de fundo e  $R_V$  é a razão volumétrica entre as fases de topo e fundo.

## 5. Resultados e discussão

Nesta seção serão apresentados os resultados obtidos nos experimentos conduzidos nesse trabalho sobre os diagramas de fases, construção das curvas binodais e partição dos ácidos húmicos nos SABs.

### 5.1. Diagramas de fases

Os sistemas estudados nesse trabalho foram formados por NaOH, álcoois e água. Os pontos experimentais de todos os diagramas de fase construídos nesse estudo foram determinados à 25 °C e pressão atmosférica. Os diagramas de fase correspondentes estão apresentados na Figura 5 e permitem analisar a capacidade dos álcoois para induzir a formação dos sistemas. As curvas se encontram apresentadas em unidades de molalidade. Os dados para construção das curvas binodais estão expostos na Tabela 3.

A adição de uma solução aquosa de NaOH nos álcoois resulta na separação de duas fases, sendo uma rica em NaOH, correspondente à fase de fundo e uma rica nos álcoois, correspondente à fase de topo.

Não foi possível observar pontos de turvação ou desturvação para formação de uma curva com metanol em nenhuma concentração que foi testada, sendo possível concluir que esse álcool não é capaz de formar SABs com NaOH. A não existência de uma curva binodal para metanol reafirma a ligação da capacidade dos álcoois de formar sistema ao tamanho da sua cadeia carbônica.

Os resultados obtidos nesse trabalho estão de acordo com os resultados obtidos por Han e colaboradores (2013), que utilizou os mesmos componentes para formação de um SAB e analisou a capacidade de formação dos sistemas em diferentes temperaturas. Além disso, a capacidade de formação de SABs dos mesmos álcoois foi demonstrada na mesma ordem do presente trabalho: n-propanol > isopropanol > etanol. O sistema constituído de tiosulfato de sódio (Nemati-Knade, Shekaari e Jafari, 2012) demonstrou a mesma sequência de álcoois para formação da região bifásica.

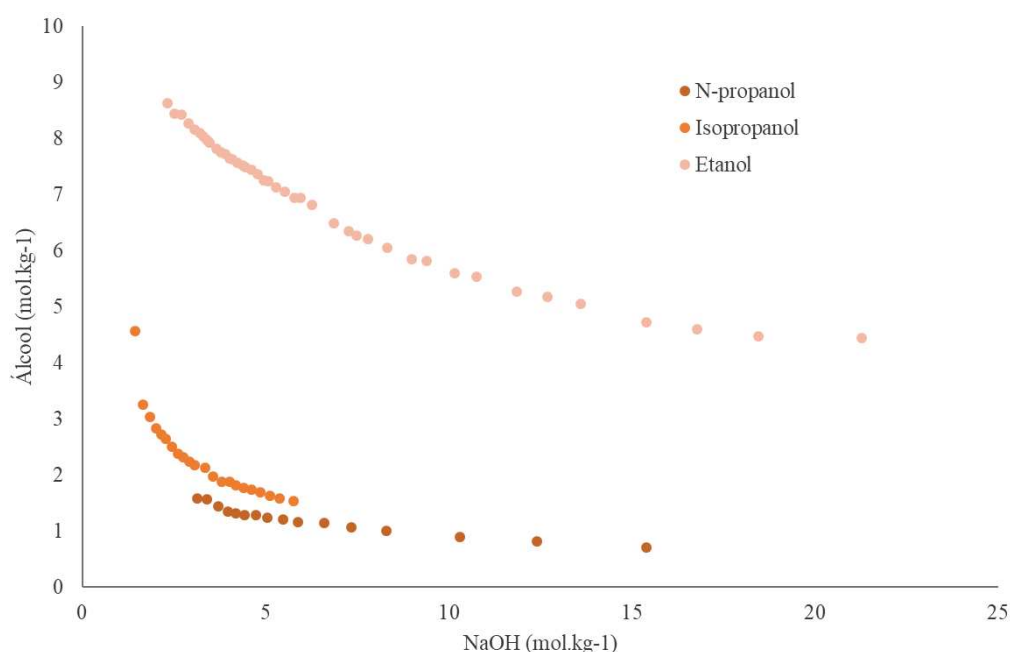
**Tabela 3:** Pontos utilizados para construção da curva binodal, onde  $w_1$  de refere ao NaOH e  $w_2$  se refere ao álcool.

<b>100w<sub>1</sub></b>	<b>100w<sub>2</sub></b>	<b>100w<sub>1</sub></b>	<b>100w<sub>2</sub></b>	<b>100w<sub>1</sub></b>	<b>100w<sub>2</sub></b>	<b>100w<sub>1</sub></b>	<b>100w<sub>2</sub></b>
<i>Etanol</i>							
49,51	15,08	27,75	19,47	18,60	22,48	13,81	24,06
45,94	15,14	26,43	19,90	18,09	22,74	13,56	24,16
43,61	15,52	25,64	20,04	17,55	22,91	13,22	24,31
41,50	15,87	25,07	20,22	17,05	23,06	12,89	24,47
38,55	16,80	24,03	20,58	16,77	23,12	12,37	24,62
36,90	17,14	22,44	21,44	16,31	23,23	11,83	24,87
35,35	17,40	21,55	21,71	15,87	23,37	11,08	25,21
33,15	18,14	21,03	21,74	15,66	23,40	10,36	25,23
31,92	18,30	20,29	21,99	15,24	23,58	9,65	25,65
30,24	18,87	19,62	22,20	14,87	23,68		
29,29	18,95	18,98	22,45	14,48	23,81		
<i>N-propanol</i>							
72,50	2,78	30,64	4,09	21,00	4,88	14,57	6,56
48,06	2,73	28,43	4,34	20,09	5,02	12,91	6,99
42,72	3,16	26,14	4,41	19,26	5,11	11,51	7,58
38,27	3,42	24,74	4,57	18,27	5,44	10,17	8,42
35,06	3,45	23,25	4,70	16,95	5,86		
33,29	3,86	22,17	4,85	15,85	5,96		
<i>Isopropanol</i>							
70,88	3,41	22,60	6,30	16,78	7,85	11,45	9,78
58,70	5,13	21,73	6,48	15,60	8,01	10,85	10,15
49,80	7,45	20,93	6,59	14,94	8,19	10,04	10,81
45,61	7,77	20,15	6,78	14,26	8,45	9,03	11,49
25,72	5,76	19,50	6,95	13,54	8,67	7,95	15,45
24,44	5,91	18,66	7,00	12,87	9,08		
23,54	6,12	17,70	7,30	12,05	9,54		

Sabe-se que a solubilidade dos álcoois em água depende do tamanho de sua cadeia carbônica, e diminui à medida que o número de carbonos aumenta. Sendo assim, de acordo com

Reis e colaboradores (2012), os álcoois de maior cadeia são mais facilmente separados no SAB. Além disso, mediante adição de um sal inorgânico tem-se um aumento na quantidade de íons dispersos na fase aquosa que propicia uma melhor separação do sistema, justificado pelo *salting-out*.

**Figura 5:** Diagramas de fases formados por NaOH + álcoois (etanol, n-propanol e isopropanol) + água à 25 °C.



Os coeficientes de regressão ( $R^2$ ) e os parâmetros de ajuste A, B e C estimados por regressão de mínimos quadrados e os desvios padrão correspondentes ( $\sigma$ ) de cada sistema são apresentados na Tabela 4. Pode-se observar pelos valores dos coeficientes de regressão ( $\geq 0,989$ ) que há uma consistência dos dados experimentais utilizados para cálculo dos coeficientes, o que indica uma confiabilidade no trabalho.

**Tabela 4:** Os parâmetros obtidos a partir da regressão da equação de Merchuk ajustada para os sistemas ternários compostos de NaOH + álcoois + água à 25 °C e pressão atmosférica.

Álcool	Parâmetros de regressão			
	A	B	C	$R^2$
Etanol	$259,2 \pm 8,7$	$-0,376 \pm 0,025$	$7,66 \times 10^{-5} \pm 4,69 \times 10^{-5}$	0,9934
N-propanol	$352,0 \pm 8,8$	$-1,174 \pm 0,151$	$1,40 \times 10^{-3} \pm 7,0 \times 10^{-3}$	0,9895
Isopropanol	$304,9 \pm 8,7$	$-1,042 \pm 0,025$	$5,15 \times 10^{-15} \pm 4,69 \times 10^{-6}$	0,9934



### 5.2. Obtenção das linhas de amarração

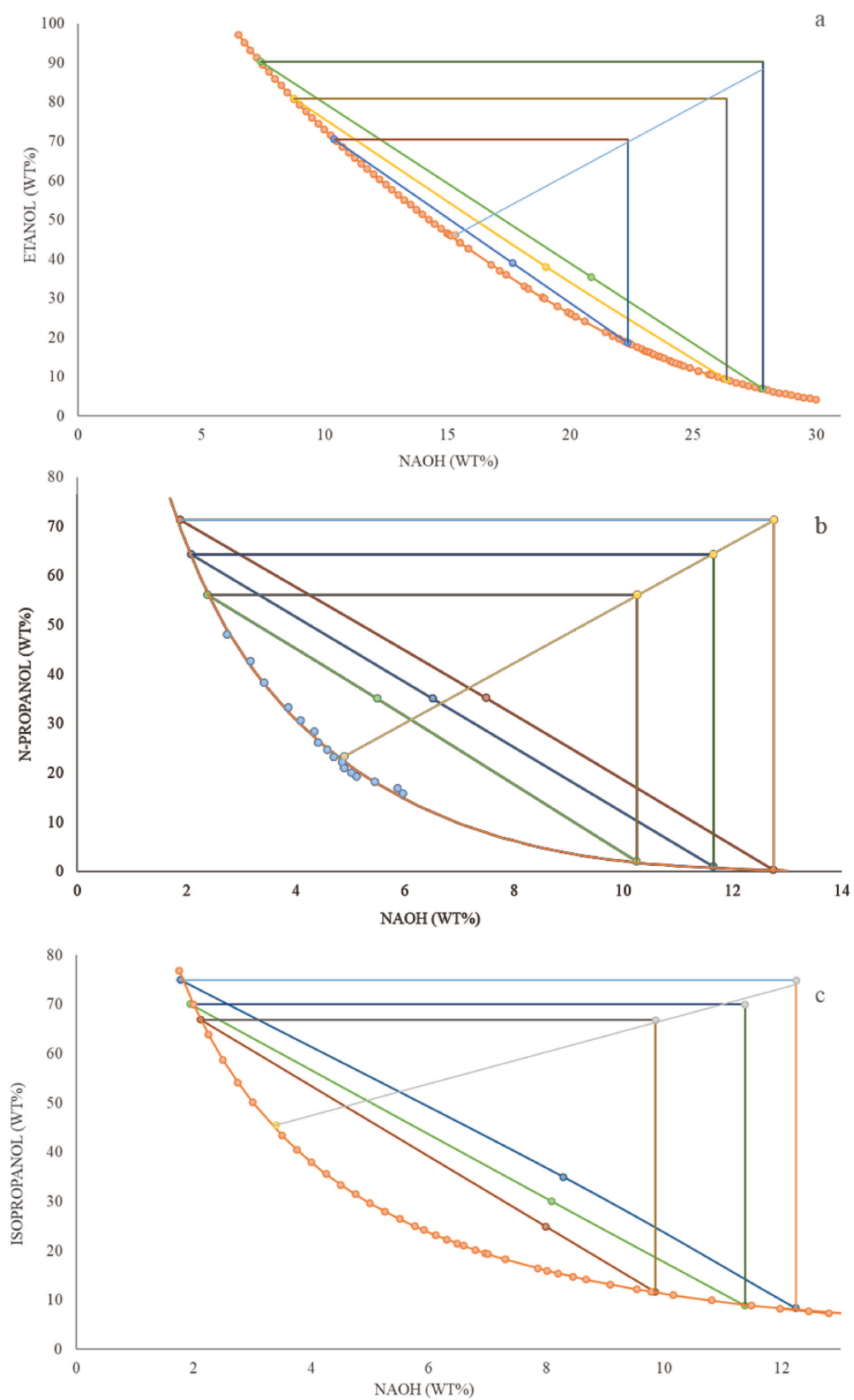
Para completar os diagramas de fase, foram utilizados três pontos de mistura localizados na região bifásica do sistema. Os valores da composição de fases e o comprimento da TL estão expressos na Tabela 5.

**Tabela 5:** Composições das frações em peso das linhas de amarração, na fase superior (T) e na fase inferior (F), composição da mistura (M), e respectivos comprimentos de linhas de amarração (TLL) para os sistemas compostos por álcoois e NaOH à 25 °C e à pressão atmosférica.

Álcoois	Fração em peso (%)						TLL
	[álcool] <sub>M</sub>	[NaOH] <sub>M</sub>	[álcool] <sub>T</sub>	[NaOH] <sub>T</sub>	[álcool] <sub>F</sub>	[NaOH] <sub>F</sub>	
<i>Etanol</i>	38,903	17,684	18,643	22,336	70,552	10,417	53,260
	38,025	19,019	80,833	8,758	9,225	26,362	65,740
	35,391	20,857	6,824	27,833	90,393	7,417	75,420
<i>N-propanol</i>	35,010	5,497	2,024	10,252	56,092	2,384	54,984
	35,009	6,516	1,031	11,652	64,292	2,084	65,420
	35,185	7,489	0,324	12,752	71,332	1,885	75,818
<i>Isopropanol</i>	24,908	7,988	66,843	2,121	11,578	9,853	55,804
	29,984	8,093	69,972	1,939	8,849	11,380	65,728
	34,939	8,292	74,919	1,773	8,288	12,245	74,899

Os diagramas completos com suas respectivas linhas de amarração são apresentados na Figura 6. Pode-se observar pelas figuras que um aumento na concentração de NaOH leva a um aumento no comprimento da linha de amarração, observação também obtida para o efeito da concentração do álcool. Um aumento do comprimento das linhas de amarração indica uma melhor separação das fases do sistema pois quanto maior a TL, mais diferentes serão as composições das fases de topo e fundo, tornando possivelmente mais fácil a separação de fases.

**Figura 6:** Diagrama de fases do SAB constituído de NaOH + etanol (a); n-propanol (b); isopropanol (c) + água à 25 °C e à pressão atmosférica.



O ponto crítico foi determinado por extrapolação das linhas de amarração e seus valores são apresentados na Tabela 6. Sabe-se que, no ponto crítico, as diferenças entre as propriedades termodinâmicas intensivas de cada fase se acabam e o valor da tensão interfacial se iguala a zero, fazendo com o que não haja mais duas fases no SAB (da Silva e Loh, 2006).

**Tabela 6:** Pontos críticos calculados a partir da extrapolação das linhas de amarração.

	Álcool (%)	NaOH (%)
<i>Etanol</i>	46,10	15,32
<i>N-propanol</i>	23,34	4,89
<i>Isopropanol</i>	45,58	3,41

### 5.3. Partição dos ácidos húmicos nos SABs

A aplicação dos sistemas investigados foi aplicada para partição dos AHs, material de amplo interesse como já ressaltado nesse estudo. Para cada sistema foram, primeiramente, investigados três diferentes pontos que se encontravam sob as linhas de amarração.

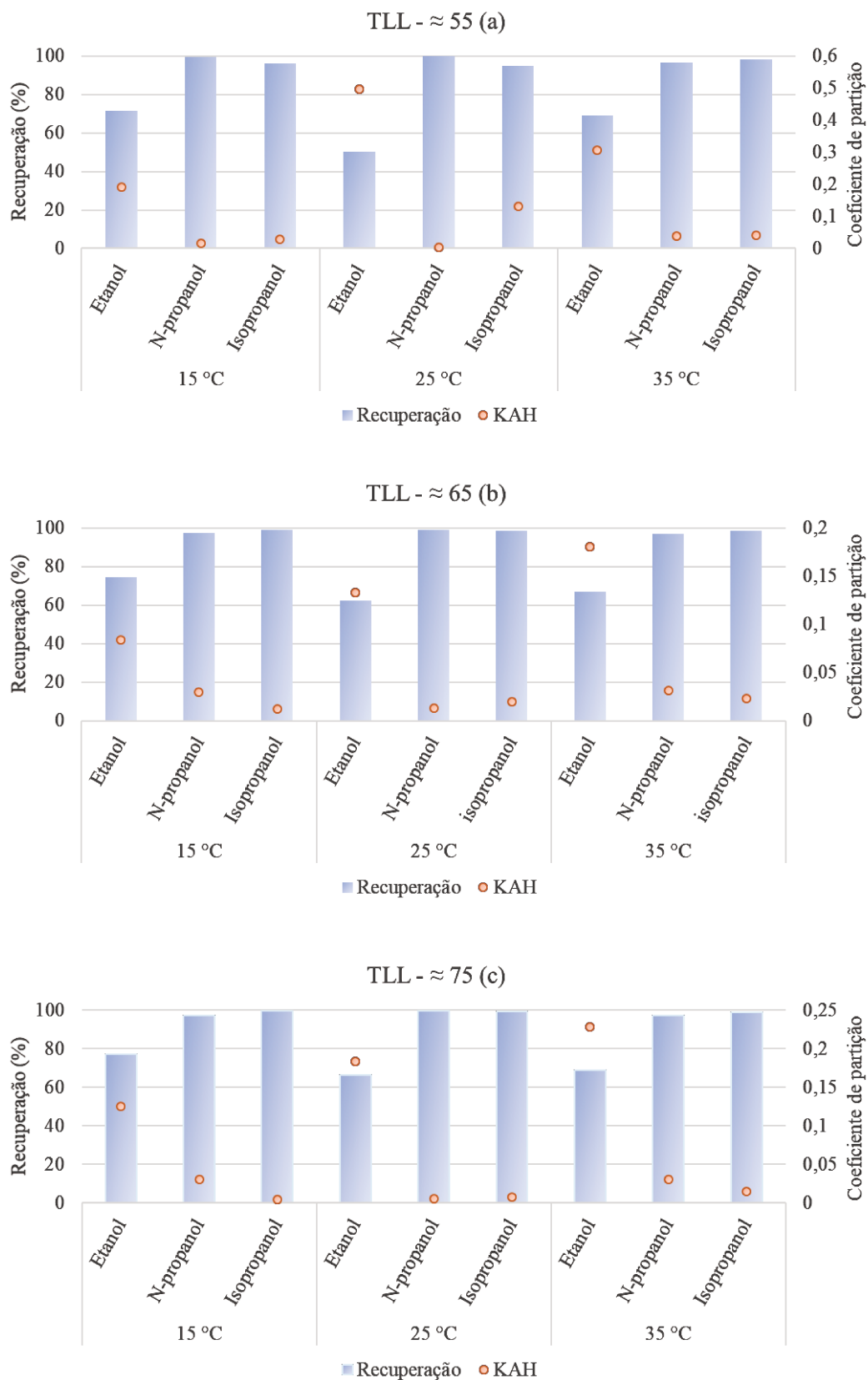
Os valores de pH das fases dos SABs estão apresentados na Tabela 7. Pode-se observar que os valores de pH são muito próximos e, embora os AHs apresentem maior solubilidade em soluções alcalinas, eles não se distribuem igualmente entre as fases. Em meio alcalino que apresentem íons, como as soluções de NaOH utilizadas nesse trabalho, os grupos fenólicos e carboxílicos dos AHs são desprotonados, aumentando a repulsão das cargas negativas dos respectivos grupos, fazendo com que o AH assumira uma configuração linear e, conseqüentemente, aumentando sua solubilidade no meio (de Melo, Motta e Santana, 2015).

**Tabela 7:** Valores de pH das fases de topo e fundo dos SABs e seus respectivos álcoois.

Álcool	pH (T)	pH (F)
<i>Etanol</i>	13,11	13,65
<i>N-propanol</i>	13,05	13,44
<i>Isopropanol</i>	13,58	13,70

A Figura 7 apresenta os dados de coeficiente de partição e recuperação dos AHs. Todos os sistemas foram testados em três diferentes temperaturas e os resultados obtidos foram expressos em termos da recuperação e do coeficiente de partição, sendo esses representados graficamente abaixo.

**Figura 7:** Recuperação e coeficientes de partição para os sistemas constituídos de NaOH + álcoois + água em diferentes temperaturas, separados de acordo com o TLL ( $\approx 55$ ,  $\approx 65$  e  $\approx 75$ ).



Nos SABs aqui descritos, tem-se duas fases aquosas de naturezas diferentes: uma fase hidrofílica e iônica, constituída em sua maioria por NaOH; e uma fase hidrofóbica constituída dos álcoois. As diferenças entre as polaridades das fases, ligadas ao fato de a molécula estar associada à íons, propicia a migração dos AHs para a fase pela qual possui maior afinidade (Reis et al., 2014), sendo essa a fase de fundo, rica em NaOH.

Pode-se observar na Figura 7 que a partição dos AHs nos sistemas propostos é eficiente e esse é quase completamente particionado para uma das fases, exceto nos sistemas formados por etanol, como pode ser observado em qualquer TLL na Figura 7 a – c.

Nota-se que a recuperação dos AHs nos sistemas constituídos de etanol e NaOH é, dentre os álcoois testados, a que apresenta a menor eficiência, sendo que a maior recuperação apresentada foi de 77%, com um coeficiente de partição igual a 0,14. Pode-se observar que, nesse sistema, a variação de temperatura analisada não tem grande influência na partição dos AHs, sendo baixa em todas as temperaturas, quando comparada aos outros sistemas formados por outros álcoois.

Para o sistema constituído de n-propanol e NaOH, podemos observar que os coeficientes de partição são menores e as recuperações são mais altas. Uma elevada recuperação nas diferentes temperaturas e concentrações do sistema caracteriza uma boa partição dos AHs. A maior recuperação obtida foi de 99,69%, com um coeficiente de partição de 0,0038.

Já para o sistema constituído de isopropanol e NaOH podemos observar que, assim como para o sistema anterior, as recuperações foram altas e os coeficientes de partição baixos, o que também caracteriza boa partição dos AHs no sistema. Para o esse SAB, a maior recuperação foi de 99,56, com o coeficiente de partição de 0,0045. Pode-se observar também que, quando comparado aos demais sistemas, esse apresentou as melhores recuperações, o que levou à seleção do SAB constituído de NaOH e isopropanol para testes posteriores.

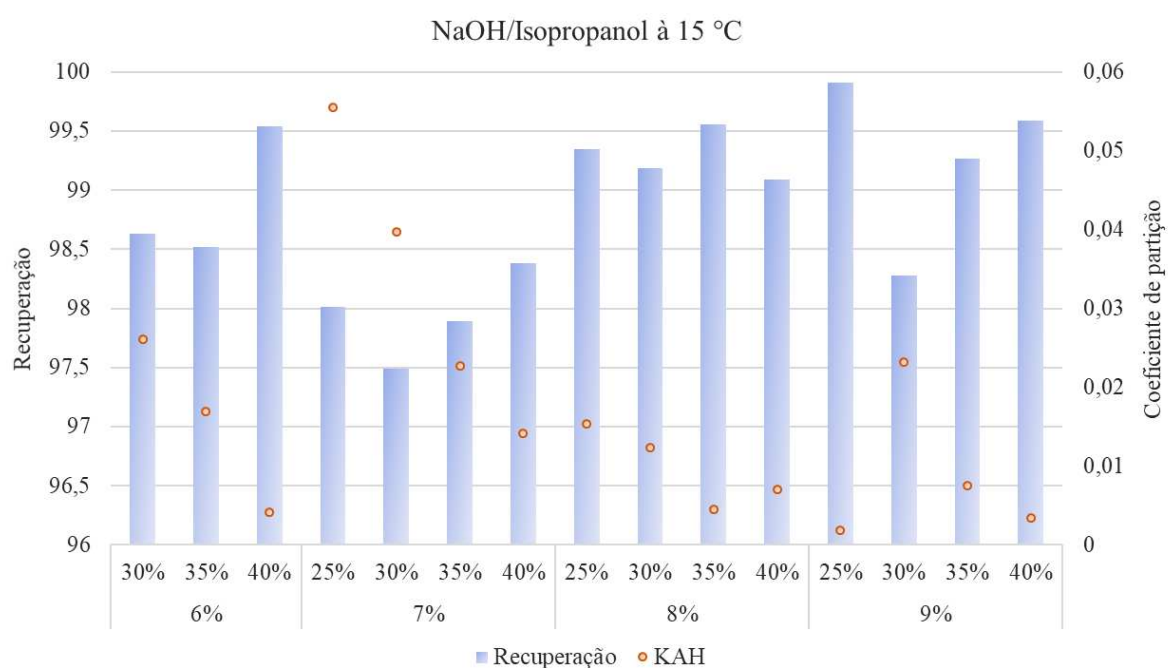
Observou-se que, no presente trabalho e na variação de temperatura estudada, não há uma influência considerável da temperatura na recuperação dos AHs nos sistemas estudados para o n-propanol e o isopropanol, mesmo que a temperatura afete positivamente a partição do SAB, como demonstrado por Han e colaboradores (2013). Em contrapartida, para o SAB constituído de etanol foi possível observar uma variação na recuperação quando em diferentes temperaturas. Além disso, existem relatos na literatura que demonstraram que a temperatura tem pouco ou nenhum efeito em SABs baseados em álcoois hidrofílicos e sal (Katayama e Miyahara, 2006; Wang et al., 2010a). Em contrapartida, Tan, Li e Xu (2013) demonstraram que um aumento da temperatura resulta em uma diminuição da recuperação do sistema composto

de sais de amônio e álcoois, onde a molécula particionada migra para a fase de topo. A diminuição acontece pelo fato de que, mediante aumento da temperatura, o álcool volatiliza mais facilmente, diminuindo a concentração da fase rica em álcool e, conseqüentemente, diminuindo a recuperação.

Na figura 8 são observadas informações após a seleção do SAB composto de NaOH e isopropanol, na temperatura de 15 °C, que apresentou nos testes preliminares uma pequena elevação na recuperação. A escolha da temperatura deu-se pelo fato da reação do NaOH com água ser exotérmica, sendo assim uma menor temperatura foi escolhida para que fosse menor o impacto dessa liberação de calor na partição do sistema.

Pode-se observar que foi variada a concentração de álcool (25 - 40%) e a variação de NaOH (6 - 9%). Observa-se que, em pontos próximos à curva, como 6% - 25%, não acontece a formação do sistema, visto que quanto mais próximo da curva binodal, mais instável o sistema. Observou-se que, independente da variação das concentrações de NaOH e álcool, ainda se obtém uma elevada recuperação dos AHs na fase de fundo, apresentando sempre valores de recuperação acima de 97%. Sendo assim, pode-se escolher menores porcentagens de NaOH e isopropanol para composição do sistema e partição dos AHs, que haverá uma recuperação eficiente do composto de interesse.

**Figura 8:** Recuperação e coeficientes de partição para os sistemas constituídos de NaOH + isopropanol + água, nas temperaturas de 15 °C, em diferentes concentrações dos componentes.



Pode-se perceber que os sistemas testados com NaOH foram eficientes na partição dos AHs, sendo que os sistemas constituídos dos álcoois de maior cadeia apresentaram maior eficiência na recuperação dos AHs.

## 6. Conclusões e sugestões para trabalhos futuros

Avaliou-se nesse estudo a formação de SAB formado por constituintes associados que foram listados apenas uma vez na literatura, a proposta desse sistema aconteceu por não terem sido observados muitos relatos de SABs alcalinos. Assim, a introdução desse sistema é apreciável para compostos que possuem maior afinidade por meios alcalis.

Foi possível observar que os diagramas de fase estão de acordo com o estudo previamente publicado por Han e colaboradores (2013). Notou-se que o NaOH pode ser utilizado como agente *salting-out* para formação de SABs baseados em álcoois de cadeia curta, exceto para o caso do metanol, que não é capaz de formar sistema. A capacidade de formação de sistema dos álcoois foi observada na seguinte sequência: n-propanol > isopropanol > etanol, nota-se que a capacidade de formação de sistema varia de acordo com a hidrofobicidade do álcool. Sendo assim, quanto mais hidrofóbico, mais favorecida a formação do SAB.

Para explorar a aplicabilidade dos sistemas propostos, foi investigada a partição dos AHs nos SABs. Em todos os ensaios foi possível observar que os AHs migram para a fase de fundo, rica em NaOH. Os melhores resultados de recuperação e coeficiente de partição aconteceram nos sistemas constituídos de NaOH + n-propanol sendo esses, 99,69% e 0,0038; e NaOH + isopropanol, sendo esses 99,91% e 0,0019. Foi possível observar que o sistema de NaOH + etanol não foi eficiente para partição dos AHs, atribuindo-se a isso o fato de que os álcoois de menor cadeia apresentam uma maior solubilidade em água, desfavorecendo, neste caso, a partição de AHs no sistema.

Sugere-se para trabalhos futuros que esses sistemas nesse trabalho identificado sejam aplicados para extração dos AHs produzidos por fermentação em trabalhos já demonstrados por nosso grupo de pesquisa, visto que são sistemas adequados para extração de biomoléculas por apresentarem em sua composição uma elevada quantidade de água.



## 7. Referências

AIKEN, G. R.; MCKNIGHT, D. M.; WERSHAW, R. L.; MACCARTHY, P. Humic substances in soil, sediment and water: geochemistry, isolation and characterization. **Geological Journal**. p. 858 – 642; 1985.

ALBERTSSON, P. A. Partition of cell and macromolecules. **Ed. John Wiley**. p. 346. New York, 1986.

ALBERTSSON, P.A., JOHANSSON, G., TJERNELD, F. Separation processes in biotechnology. Aqueous two-phase separations. **Bioprocess Technology**. v. 9, p. 287–327, 1990.

ALEXANDER, P.D.; NEVISON, I.M.; WILLIAMS, R.H. Improving gardeners' understanding of water management in peat and peat-free multi-purpose growing media: An assessment with fuchsia, **Acta Horticulturae**, v. 1013, p. 257-263, 2013.

AMANI, P.; AMANI, M.; AHMADI, G.; MAHIAN, O.; WONGWISWS, S. A critical review on the use of nanoparticles in liquid-liquid extraction. **Chemical Engineering Science**. v. 183, p. 148 – 176, 2018.

ASENJO, J. A., ANDREWS, B. A. Aqueous two-phase systems for protein separation: A perspective. **Journal of Chromatography A**. v. 1218, p. 8826– 8835, 2011.

BALDOTTO, M. A.; CANELA, M. C.; CANELLAS, L. P.; DOBBSS, L. B.; VELLOSO, A. C. X. Redox index of soil carbon stability. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v. 34, p. 1543 – 1551, 2010.

Banco de Dados PubChem. National Center for Biotechnology Information – **National Library of Medicine**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>.

BARBOSA, A. A. Obtenção de dados de equilíbrio de Sistemas Aquosos formados por PEG, sulfato e água e partição de Antocianina do jamelão. **Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia**. Dissertação de mestrado. 2013.

BERLO, M.; OTTENS S, M.; LUYBEN, K.C.A.; WIELEN, L. A. M. Partitioning behavior of amino acids in aqueous two-phase systems with recyclable volatile salts. **Journal of Chromatography B**. v. 743, n. 1-2; p. 317 – 325, 2000.

BEZOLD, F.; GOLL, J.; MINCEVA, M. Study of non-conventional aqueous two-phase systems in counter-current and centrifugal partition chromatography. **Journal of Chromatography A**. v. 1388, p. 126 – 132, 2015.

BORSARI F. Experiências de campo demonstram os benefícios para a produtividade do uso de ácidos húmicos na agricultura intensiva. **Agro DB.**, v. 46, p. 44, 2013.

BRITES, L. M. Separação e Purificação do ácido clavulânico através de extração Líquido-Líquido seguida de Adsorção em coluna de leito fixo. **Universidade Federal de São Carlos**. Dissertação de mestrado. 2005.

BUFFLE, J.A.E. Humic substances in water and their interaction with mineral ions. Conference Proceedings de la Commission d'Hydrologie Appliquee de A.G.H.T.M. p. 3-10, 1977.

BUSATO, J. G.; ZANDONADI, D. B.; DOBBSS, L. B.; FAÇANHA, A. R.; CANELLAS, L. P. Humic substances isolated from residues of sugar cane industry as root growth promoter. **Scientia Agricola**. v. 67, p. 206 – 212, 2010.

CANELLAS, L. P.; SANTOS, G. A. Humosfera: tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas. Campos dos Goytacazes, UENF. p. 348, 2005.

CARDOSO, G. B.; MOURÃO, T.; PEREIRA, F. M.; FREIRE, M. G.; FRICKS, A. T.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S. Aqueous two-phase systems based on acetonitrile and carbohydrates and application to the extraction of vanillin. **Separation and Purification Technology**. v. 104, p. 106 – 113, 2013.

CARDOSO, G. B.; SOUZA, I. N.; PEREIRA, M. M.; COSTA, L. P.; FREIRA, M. G.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S. Poly(vinyl alcohol) as a novel constituent to form aqueous two-phase systems with acetonitrile: Phase diagrams and partitioning experiments. **Chemical Engineering Research and Design**. v. 94, p. 317 – 323, 2015.

CARVALHO, M. M. Estudo de equilíbrio de fases para Sistemas Aquosos Bifásicos compostos por Poli (etileno glicol) 6000, sulfato de cobre ou sulfato de zinco e água, em função da temperatura. 2007.

CHETHANA, S., NAYAK, C. A., RAGHAVARAO K. S. M. S. Aqueous Two-Phase extraction for purification and concentration of Betalains. **Journal of Food Engineering**, v. 81, p. 679-687, 2007.

CHRISTL, I., MILNE, C. J., KINNIBURGH, D. G., KRETZSCHMAR, R. Relating ion binding by fulvic and humic acids to chemical composition and molecular size. 2. Metal binding. **Environmental Science Technology**. v. 28, p. 2512 – 2517, 1994.

CIENFUEGOS, N. E. C.; SANTOS, P. L.; GARCÍA, A. R.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S.; SOUZA, R. L. Integrated process for purification of capsaicin using aqueous two-phase systems based on ethanol. **Food and Bioproducts Processing**. v. 106, p. 1 – 10, 2017.

COOPER, R. J. Humic substances and their potential for improving turfgrass growth. **Soils**. p. 9 – 13, 1999.

de MELO, B. A. G.; MOTTA, F. L.; SANTANA, M. H. A. Humic acids: Structural properties and multiple functionalities for novel technological developments. **Material Science and Engineering C**. v. 62, p. 967 – 974, 2016.

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

FELBECK, G.T. Chemical and biological characterization of humic matter, **Soil Biochemistry**, Vol. 2. Marcel Dekker, New York, N.Y., p. 36 – 59, 1971.

FREIRE, M. G.; LOUROS, C. L. S.; REBELO, L. P. N.; COUTINHO, J. A. P. Aqueous biphasic systems composed of a water-stable ionic liquid + carbohydrates and their applications. **Green Chemistry**. v. 13, p. 1536-1545, 2011.

GOJA, A. M.; YANG, H.; CUI, M.; LI, C. Aqueous Two-Phase Extraction advances for bioseparation. **Journal of Bioprocessing and Biotechniques**. v. 4, p. 1 – 8, 2013.

GONG, J.; ZHANG, S.; CHENG, Y.; HUANG, Z.; TANG, C.; ZHANG, J. A Comparative study of n-propanol, propanal, acetone, and propane combustion in laminar flames. **Proceedings of the Combustion Institute**. v. 35, p. 795 – 801, 2015.

GONZÁLEZ-AMADO, M.; RODIL, E.; ARCE, A.; SOTO, A.; RODRÍGUEZ, O. Polyethylene glycol (1500 or 600) – potassium tartrate aqueous two-phase systems. **Fluid Phase Equilibria**. v. 470, p. 120 – 125, 2018.

GU, Z.; GLATZ C.E. Aqueous two-phase extraction for protein recovery from corn extracts. **Journal of Chromatography B**. v. 845, p. 38 – 50, 2007.

GUPTA, R., BRADDOO, S., SAXENA R. K. Aqueous Two-Phase Systems: An attractive technology for downstream processing of biomolecules. **Current Science**. v. 77, p. 520 – 523, 1999.

HAMTA, A.; DEHGHANI, M. R. Application of polyethylene glycol based aqueous two-phase systems for extraction of heavy metals. **Journal of Molecular Liquids**. v. 231, p. 20 – 24, 2017.

HAN, J.; WU, Y.; XIANG, Y.; WANG, Y.; MA, J.; HU, Y. Liquid-liquid equilibria of hydrophilic alcohol + sodium hydroxide + water systems: Experimental and correlation. **Thermochimica Acta**. v. 566, p. 261 – 267, 2013.

HATTI-KAUL R. Methods in biotechnology: Aqueous Two-Phase Systems: Methods and Protocols. Edited by: Hatti-Kaul, R. **Humana Press Inc**. v. 11, p. 442. Totowa, New Jersey, 2000.

HAYES, M.H.B.; SWIFT, R.S.; WARDLE, R.E.; BROWN, J.K. Humic Materials from an organic soil: a comparison of extractants and properties of extracts. **Geoderma**. v. 13, p. 231- 245, 1975.

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

JANNIN, L.; ARKOUN, M.; OURRY, A.; LAÎNÉ, P.; GOUX, D.; GARNICA, M.; FUENTES, M.; FRANCISCO, S.S.; BAIGORRI, R.; CRUZ, F.; HOUDUSSE, F.; GARCIA-MINA, J.M.; YVIN, J.C.; ETIENNE, P. Microarray analysis of humic acid effects on *Brassica napus* growth: Involvement of N, C and S metabolisms. **Plant Soil**, v. 359, p. 297-319, 2012.

KATAYAMA, H.; MIYAHARA, M. Liquid–liquid phase equilibria of (ethanol or methanol + water) containing either dipotassium hydrogen phosphate or sodium dihydrogen phosphate, **Journal of Chemical & Chemical Engineering Data**. v. 51, p. 914 – 918, 2006.

KHADZHIEV, S. N.; KOLESNICHENKO, N. V.; EZHOVA, N. N. Slurry technology in methanol synthesis (review). **Petroleum Chemistry**. v. 56, p. 77 – 95, 2016.

KLÖCKING, R.; HELBIG, B. Medical Aspects and Applications of Humic Substances. **Biopolymers for Medical and Pharmaceutical Applications**. p. 1 – 16, 2005.

KOOCHKEI, A.; FALLAHI, H. R.; AMIRI, M. B.; EHYAEI, H. R. Effects of humic acid application and mother corm weight on yield and growth of saffron (*Crocus sativus* L.) **Directory of Open Access Journals**. v. 7, p. 425 – 442, 2016.

KUWATSUKA, S.; WATANABE, A.; ITOH, K. I.; ARAI, Z. S. Comparison of Two Methods of Preparation of Humic and Fulvic Acids, IHSS Method and NAGOYA Method. **Soil Science & Plant Nutrition**. v. 38, p. 23-30, 1992.

LIMA, A. S.; PLÁCIDO, N. S. O.; de FRANÇA, R. L. S.; REIS, I. A. O.; PEREIRA, M. M.; FREIRE, M. G. Processos de extração e purificação de biomoléculas. **Cap 2: Aplicação de sistemas aquosos bifásicos na purificação de biomoléculas**. p. 113 – 140, 2017.

LIMA, A. S.; PLACIDO, N. S. O.; FRANÇA, R. L. S.; REIS, I. A. O.; PEREIRA, M. M.; FREIRE, M. G. Aplicação de Sistemas Aquosos Bifásicos na Purificação de Biomoléculas. In: Lima, A. S.; Santana, C. C. (Org.). Processos de Extração e Purificação de Biomoléculas. 1ª edição. **Aracaju: Editora Universitária Tiradentes**. v. 1, p. 113 – 140, 2017.

LOUROS, C. L. S.; CLÁUDIO, A. F. M.; NEVES, C. M. S. S.; MARRUCHO, M. G. F.; ISABEL, M.; PAULY, J.; COUTINHO, J. A. P. Extraction of biomolecules using phosphonium-based ionic liquids + K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> aqueous biphasic systems. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 11, p. 1777 – 1791, 2010.

LUCENA, I. V.; BRANDÃO, I. V.; MATTEDI, S.; SOUZA, R. L.; SOARES, C. M. F.; FRICKS, A. T.; LIMA, A. S. Use of protic ionic liquids as adjuvants in PEG-based ATPS for the purification of radish peroxidase. **Fluid Phase Equilibria**. v. 452, p. 1 – 8, 2017.

LUECHAU, F.; LING, T. C.; LYDDIATT, A. Two-step process for initial capture of plasmid DNA and partial removal of RNA using aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**. 45(8), p. 1432-1436, 2010.

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

MALPIEDI, L. P.; ROMANINI, D.; PICÓ, G. A.; NERLI, B. B. Purification of trypsinogen from bovine pancreas by combining aqueous two-phase partitioning and

precipitation with charged flexible chain polymers. **Separation and Purification Technology**. v. 65, p. 40 – 45, 2009.

MERCHUCK, J. C., ANDREWS, B. A., & ASENJO, J. A. Aqueous two-phase systems for protein separation: Studies on phase inversion. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, 711, 285–293, 1998.

MESROGLI, M.; MAAS, A.; SCHNEIDER, J. Stellenwert der Moorthherapie in der Sterilitätsbehandlung, in: **Moorthherapie: Grundlagen und Anwendungen**. p. 225 - 235, 1988.

MIRZA, A.; AHMAD, N.; AGARWAL, S. P.; MAHMOOD, D.; ANWER, M. K.; IQBAL, Z. Comparative evaluation of humic substances in oral drug delivery. **Results in Pharma Sciences**. v. 1, p. 16–26, 2011.

MONTEIRO FILHO, E. S. Sistemas aquosos bifásicos: uma alternativa para purificação de biomoléculas e simulação de sistemas líquidos complexos. **Ciência & Tecnologia**. v. 1, p. 33-41, 2010.

MOTTA, F. L.; SANTANA, M. H. A. Solid-state fermentation for humic acids production by a *Trichoderma reesei* strain using an oil palm empty fruit bunch as the substrate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 172, p. 2205–2217, 2014.

NAN, J.; CHEN, X.; WANG, X.; LASHARI, M. S.; WANG, Y.; GUO, Z.; DU, Z. Effects of applying flue gas desulfurization gypsum and humic acid on soil physicochemical properties and rapeseed yield of a saline-sodic cropland in the eastern coastal area of China. **Journal of Soils and Sediments**. v. 16, p. 38 – 50, 2015.

NASCIMENTO, K. S.; YELO, S. CAVADA, B. S.; AZEVEDO, A. M.; AIRES-BARROS, M. R. Liquid - Liquid Equilibrium data for Aqueous Two-Phase Systems composed of Ethylene Oxide Propylene Oxide Copolymers. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 56, p. 190-194, 2011.

NEMATIKNADE, E.; SHEKAARI, H.; JAFARI, S. A. Thermodynamic study of aqueous two-phase systems for some aliphatic alcohols + sodium thiosulfate + water. **Fluid Phase Equilibria**. v. 321, p. 64 – 72, 2012.

OLIVEIRA, B. S.; D'ANZICOURT, C. M. S.; SOARES, C. M. F.; SOUZA, R. L.; LIMA, A. S. Liquid-liquid extraction of phenolic compounds in systems based on acetonitrile

+ water + polyvinylpyrrolidone at 298.15 K. **Separation and Purification Technology**. v. 211, p. 117 – 123, 2019.

OLIVEIRA, F. C.; COIMBRA, J. S. R.; SILVA, L. H. M.; ROJAS, E. E. G.; SILVA, M. C.H. Ovomucoid partitioning in aqueous two-phase systems. **Biochemical Engineering Journal**. v. 47, p. 55 – 60, 2009.

OLIVEIRA, M. E. D.; VAUGHAN, B. E.; RYKIEL, E. J. Ethanol as Fuel: Energy, Carbon Dioxide Balances, and Ecological Footprint. **BioScience**. v. 55, p. 593 – 602, 2005.

OLIVERA-NAPPA, A., LAGOMARSINO, G., ANDREWS, B. A., ASENJO, J. A. Effect of electrostatic energy on partitioning of proteins in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**. v. 807, p. 81 – 6, 2004.

OOI, C. W.; TEY, B. T.; HII, S. L.; KAMAL, S. M. M.; LAN, J. C. W.; ARIFF, A.; LING, T. C. Purification of lipase derived from *Burkholderia pseudomallei* with alcohol/salt-based aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**. v. 44, p. 1083 – 1087, 2009.

PADILHA, G. S.; FERREIRA, J. F.; ALEGRE, R. M.; TAMBOURGI, E. B. Efeitos do pH e massa molar do Polímero sobre o Sistema Bifásico Aquoso PEG/fosfato. **Technology**. v. 33, p. 1-4, 2011.

PEI, Y.; LI, Z.; LIU, L.; WANG, J. Partitioning behavior of amino acids in aqueous twophase systems formed by imidazolium ionic liquid and dipotassium hydrogen phosphate. **Journal of Chromatography A**. v. 1231, p. 2 – 7, 2012.

PESSOA JUNIOR, A.; KILIKIAN, B. V. Purificação de produtos biotecnológicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 41, p. 440, 2005.

PLACIDO, N. S. O.; CARLOS, A. L. S.; GALVÃO, J. U. S.; SOUZA, R. L.; SOARES, C. M. F.; MATTEDI, S.; FRICKS, A. T.; LIMA, A. S. Protic ionic liquids as a constituent of biphasic systems based on acetonitrile: Phase diagram and alkaloid partitioning. **Separation and Purification Technology**. v. 200, p. 318 – 326, 2018.

PONOMAREVA, V. V.; PLOTNIKOVA, T. A. Methods and some results of the fractionation of Chernozem humus. **Soviet Soil Science**. v. 11. p. 1562 – 1572, 1968.

PRINZ, A.; HÖNIG, J.; SCHÜTTMANN, I.; ZORN, H.; ZEINER, T. Separation and purification of laccases from two different fungi using aqueous two-phase extraction. **Process Biochemistry**. v. 49, p. 335 – 346, 2014.

QUAGGIOTTI, S., RUPERTI, B., PIZZEGHELLO, D., FRANCIOSO, O., TUGNOLI, V.; NARDI, S. Effect of low molecular size humic substances on nitrate uptake and expression of genes involved in nitrate transport in maize (*Zea mays* L.). **Journal of Experimental Botany**. v. 55, p. 803-813, 2004.

RATANAPONGLEKA, K. Recovery of biological products in Aqueous Two-Phase Systems. **International Journal of Chemical Engineering and Applications**. v. 1, p. 191-198, 2010.

REIS, I. A. O.; CAMPOS, A. F.; SANTOS, P. H. S.; SANTOS, P. H. S.; SANTOS, S. B.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S. Potassium Phosphate Salts – Based Aqueous Two-Phase Systems Applied in the Extraction of Gallic Acid from Guava. **Separation Science and Technology**. v. 50, p. 520 – 528, 2015.

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

REIS, I. A.O.; SANTOS, S. B.; PEREIRA, F. D. S; SOBRAL, C. R. S.; FREIRE, M. G.; FREITAS, L. S.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S. Extraction and recovery of Rutin from acerola waste using alcohol-salt-based aqueous two-phase systems. **Separation Science and Technology**. v. 49, p. 656 – 663, 2014.

RICO-CASTRO, X.; GONZÁLEZ-AMADO, M.; SOTO, A.; RODRÍGUEZ, O. Aqueous two-phase systems with thermo-sensitive EOPO co-polymer (UCON) and sulfate salts: Effect of temperature and cation. **The Journal of Chemical Thermodynamics**. v. 108, p. 136 – 142, 2017.

RODRIGUES, L. R., VENANCIO, A., TEIXEIRA, J. A. Partitioning and separation of a-lactalbumin and b-lactoglobulin in polyethylene glycol/ammonium sulphate aqueous two-phase systems. **Biotechnology Letters**. v. 23, p. 1893–1897, 2001.

ROSA, A. H.; ROCHA, J. C.; FURLAN, M. Substâncias húmicas de turfa: estudo dos parâmetros que influenciam no processo. **Química Nova**, v. 23, p. 472-476, 2000.

SAITO, B.; SECKLER, M. M. Alkaline extraction of humic substances from peat applied to organic-mineral fertilizer production. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v. 31, p. 675 – 682, 2014.



SALABAT, A.; SADEGHI, R.; MOGHADAM, S. T.; JAMENHBOZORG, B. Partitioning of L-methionine in aqueous two-phase system containing poly (propylene glycol) and sodium phosphate salts. **The Journal of Chemical Thermodynamics**. v. 43, p. 1525 - 1529, 2011.

SANTOS, G. A.; SILVA, L. S.; CANELLAS, L. P.; CAMARGO, F. A. O. Fundamentos da matéria orgânica: ecossistemas tropicais e subtropicais. Porto Alegre, Metrópole. 2ª edição, p. 636, 2008.

SANTOS, J. H.; SILVA, F. A.; VENTURA, S. P. M.; COUTINHO, J. A. P.; SOUZA, R. L.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S. Ionic Liquid-Based Aqueous Biphasic Systems as a Versatile Tool for the Recovery of Antioxidant Compounds. **Biotechnology Progress**. v. 31, p. 70 – 77, 2015.

SANTOS, P. L.; SANTOS, L. N. S.; VENTURA, S. P. M.; SOUZA, R. L.; COUTINHO, J. A. P.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S. Recovery of capsaicin from *Capsicum frutescens* by applying aqueous two-phase systems based on acetonitrile and, cholinium-based ionic liquids. **Chemical Engineering Research and Design**. v. 112, p. 103 – 112, 2016a.

SANTOS, R. P.; SOUZA, L. M.; BALIEIRO, A. L.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S.; SOUZA, R. L. Integrated process of extraction and purification of betanin from *Opuntia ficus-indica* using aqueous two-phase systems based on THF and sodium salts. **Separation Science and Technology**. v. 53, p. 734 – 744, 2018.

SANTOS, R. P.; SOUZA, L. M.; BALIEIRO, A. L.; SOARES, C. M.; LIMA, A. S.; SOUZA, R. L. Integrated process of extraction and purification of betanin from *Opuntia ficus-indica* using aqueous two-phase systems based on THF and sodium salts. **Separation Science and Technology**. v. 53, p. 734 – 744, 2018.

SANTOS, S. B.; REIS, I. A. O.; SILVA, C. P. C.; CAMPOS, A. F.; VENTURA, S. P. M.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S. Selective partition of caffeine from coffee bean and guarana seed extracts using alcohol-salt aqueous two-phase systems. **Separation Science and Technology**. v. 51, p. 2008 – 2019, 2016.

SARAVANAN, S.; RAO, J. R.; MAIR, B. U.; RAMASAMI, T. Aqueous two-phase poly (ethylene glycol)- poly (acrylic acid) system for protein partitioning: influence of molecular weight, pH and temperature. **Process Biochemistry**. v. 43, p. 905-911, 2008.

SARUBBO, L. A.; OLIVEIRA, L. A.; PORTO, A. L. F.; DUARTE, H. S.; CARNEIRO-LEÃO, A. M. A.; LIMA-FILHO, J. L.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; TAMBOURG, E. B. New aqueous two-phase system based on cashew-nut tree gum and poly (ethylene glycol). **Journal of Chromatography B**. v. 743, p.79 – 84, 2000.

SCHNITZER M. Humic substance: chemistry and reactions. **Soil organic matter**. p.1–64, 1978.

SCHNITZER, M.; KHAN, S.U. Humic Substances in the Environment. **Marcel Dekker, New York**, 327 p. 1972.

SEADER, J. D.; HENLEY, E. J.; ROPER, D. K. Separation process principles, 3ed. **Wiley**. 2011.

SILVA, L. H. M., LOH, W. Sistemas Aquosos Bifásicos: Fundamentos e Aplicações para Partição/Purificação de Proteínas. **Química Nova**, v. 29, n.6, p. 1345 – 1351, 2006.

SMITH, J. M.; VAN NESS, H. C.; ABBOTT, M. M. Introdução a termodinâmica da engenharia química 5ed. Rio de Janeiro: LTC - **Livros Técnicos e Científicos Editora S. A.**, 2000.

SOUSA, K. M.; MACIEL, G. E. L. O.; BUARQUE, F. S.; SANTOS, A. J.; MARQUES, M. N.; CAVALCANTI, E. B.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S. Novel phase diagrams of aqueous two-phase systems based on tetrahydrofuran + carbohydrates + water: Equilibrium data and partitioning experiments. **Fluid Phase Equilibria**. v. 433, p. 1 – 9, 2017.

SOUSA, R. C. S., COIMBRA, J. S. R., SILVA, L. H. M., SILVA, M. C. H., ROJAS, E. E. G., VICENTE, A. A. A. Thermodynamic studies of partitioning behavior of lysozyme and conalbumin in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography**. v. 877, p. 2579- 2584, 2009.

STEVENSON, F.J. Humus chemistry: Genesis, composition, reactions. **John Wiley and Sons**. 1982.

SUAREZ RUIZ, C. A.; VAN DEN BERG, C.; WIJFFELS, R. H.; EPPING, M. H. M. Rubisco separation using biocompatible aqueous two-phase systems. **Separation Purification Technology**. Article in press, 2017.

TATE III, R. L. Soil organic matter. **Biological and Ecological Effects**, 1987.

TREYBAL, R.E. Extracción en fase líquida. Mexico: **Union Tipografica Editorial Hispano Americana**. v. 1, p. 729, 1968.

VAŠKOVÁ, J.; VELIKÁ, B.; PILÁTOVÁ, M.; KRON, I.; VAŠKO, L. Effects of humic acids in vitro. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal**. v. 47, p. 376–382, 2011.

VON WANDRUSZKA, R. Humic acids: their detergent qualities and potential uses in pollution remediation, **Geochemical Transactions**. v. 1, 2000.

VON WANDRUSZKA, R.; RAGLE, C.; ENGBRETSON, R. The role of selected cations in the formation of pseudomicelles in aqueous humic acid, **Talanta**. v. 44, p. 805 – 809, 1997.

VOROS, N., PROUST, P., FREDENSLUND, A. Liquid-liquid Phase Equilibria of Aqueous Two-Phase Systems containing Salts and Polyethylene Glycol. **Fluid Phase Equilibria**, v. 90, p. 333 – 353, 1993.

WANG, N.; LI, B.; QIAO, F.; SUN, J.; FAN, H.; AI, S. Humic acid-assisted synthesis of stable copper nanoparticles as a peroxidase mimetic and their application in glucose detection. **Journal of Materials Chemistry B**. v. 3, p. 7718 – 7723, 2015a.

WANG, Y.; HAN, J.; XU, X.; HU, S.; YAN, Y. Partition behavior and partition mechanism of antibiotics in ethanol/2-propanol–ammonium sulfate aqueous two-phase systems. **Separation and Purification Technology**. v. 75, p. 352–357, 2010b.

WANG, Y.; MAO, Y. L.; HAN, J.; LIU, Y.; YAN, Y. S. 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 & Chemical Engineering Data**. v. 55, p. 5621 – 5626, 2010a.

WANG, Z.; PEI, Y.; ZHAO, J.; LI, Z.; CHEN, Y.; ZHUO, K. Formation of ether-functionalized ionic-liquid-based aqueous two-phase systems and their application in separation of protein and saccharides. **Journal of Physical Chemistry B**. v. 119, p. 4471-4478, 2015b.

WOLLINA, U. Peat: a natural source for dermatocosmetics and dermatotherapeutics, **Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery**. v. 2, p. 17–20, 2009.

ZANETTI, M. Treatment of HIV infection with humic acid, **WO Patent number** 008335, 1995.

ZHANG, S.; YUAN, L.; LI, W.; LIN, Z.; LI, Y.; HU, S.; ZHAO, B. Characterization of pH-fractionated humic acids derived from Chinese weathered coal. **Chemosphere**. v. 166, p. 334-342, 2017.

ZHAO, L.; PENG, Y.; GAO, J.; CAI, W. Bioprocess intensification: An Aqueous Two-Phase Process for the Purification of C-phycoerythrin from dry *Spirulina platensis*. **European Food Research and Technology**. v. 238, p. 451-457, 2014.

TAN, Z.; LI, F.; XU, X. Extraction and purification of anthraquinone derivatives from *Aloe vera* L. using alcohol/salt aqueous two-phase system. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. v. 36, p. 1105 – 1113, 2013.