

CAPÍTULO 7

EXTRAÇÃO SELETIVA DE AMINOÁCIDOS UTILIZANDO SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS FORMADOS POR ALCOÓIS E FOSFATO DE POTÁSSIO

Samuel Bruno dos Santos

RESUMO

Os sistemas aquosos bifásicos caracterizam-se por ser uma metodologia simples, rápido, de baixo custo e eficiente para a extração de biomoléculas como aminoácidos, proteínas e enzimas. Esse processo tem como principal vantagem o alto conteúdo de água que o torna compatível com o ambiente e as biomoléculas e de fácil ampliação de escala. O objetivo deste trabalho foi verificar a partição de tirosina e triptofano em sistemas aquosos bifásicos formados por alcoóis e sais de potássio. O efeito do tipo do álcool (metanol, etanol, 1-propanol e 2-propanol) e sua concentração (40 a 60%, p/v), tipo do sal de potássio (K_3PO_4 , K_2HPO_4 e tampão: K_2HPO_4/KH_2PO_4) e sua concentração (10 a 20%, p/v), bem como a temperatura do processo (5 a 30°C) foi estudada. As variáveis foram otimizadas para uma partição para a fase de topo (rica em álcool), devido à facilidade de recuperação do aminoácido. O maior coeficiente de partição (K) para a tirosina ocorreu em sistema formado por 2-propanol e K_2HPO_4 na concentração de (40 e 20%, respectivamente), à temperatura de 30°C ($K= 3,01$ e recuperação de 82,23%), já para o triptofano foi sistema formado por 1-propanol e K_2HPO_4 na concentração de (60 e 20%, respectivamente), à temperatura de 30°C ($K= 2,73$ e recuperação de 82,88%). A extração da tirosina e do triptofano são processos não espontâneos, endotérmicos e regidos por efeitos entrópicos.

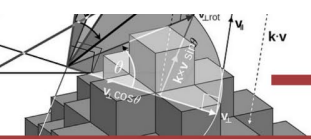
PALAVRAS-CHAVE: Aminoácidos. SAB. Purificação.

1. INTRODUÇÃO

A utilização de moléculas obtidas de origem vegetal, animal e microbiana em diversos setores industrial têm evoluído com o passar dos anos, principalmente devido ao surgimento de diversas técnicas de extração. Este interesse crescente é fortalecido pela alta demanda da indústria alimentícia (interessada na obtenção de produtos probióticos e nutracêuticos) em produtos com alto grau de pureza. Desta forma, torna-se necessário escolher métodos de extração que não danifiquem as biomoléculas, as quais são extremamente sensíveis à temperaturas elevadas de extração, presença de elementos químicos dentre outras.

A extração e purificação de biocompostos utilizada na indústria consistem em processos formados por sistemas tradicionais com a utilização de solventes orgânicos, a quente ou a frio (CHUNG *et al.*, 2010), agentes quelantes e precipitantes (ANDREO; JORGE, 2006), técnicas cromatográficas (WANG, 2011) e de forma menos tradicional a aplicação de fluidos supercríticos (PARK *et al.*, 2012), ultrassom (JUN, 2009) e radiação micro-ondas (CHAN *et al.*, 2011). Essas técnicas consomem quantidades elevadas de solventes ou são procedimentos dispendiosos e pode apresentar condições que sejam danosas às biomoléculas.

Uma técnica que desponta para a extração de biomoléculas são os sistemas aquosos bifásicos, que podem ser formados utilizando uma série muito grande de compostos como



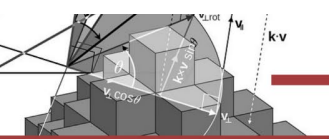
polímeros (polietileno glicol, dextrana e maltodextrina), são orgânicos (fosfato de potássio, citrato de sódio), líquidos iônicos (principalmente da família do imidazólium) e álcoois. Estes sistemas apresentam como maiores vantagens a ampliação de escala e de fácil montagem, além da alta concentração de água (70 a 95%) que oferecem um ótimo meio para biomoléculas sensíveis, baixa tensão interfacial que facilita a migração das biomoléculas e também de partículas celulares entre as fases e ainda minimiza o risco de comprometimento da estrutura de células e proteínas (HASMANN *et al.*, 2008), entretanto algumas desvantagem econômica estão associadas. Em comparação com outros métodos de purificação o alto custo dos polímeros como a dextrana levou a aplicação de sistemas baseado em sais, neste trabalho foca-se na utilização de álcoois e sais, ambos de baixo custo e de certa forma abundante na região do país que o trabalho é desenvolvido.

Para a aplicação do sistema aquoso bifásico, é necessário o conhecimento prévio dos diagramas de fase dos sistemas em estudo, por este motivo as curvas binodais para todos os sistemas utilizados e as linhas de amarração que preveem a composição das fases de topo e fundo para alguns pontos de mistura foram realizadas. Cabe ressaltar a importância deste procedimento para o entendimento dos efeitos associados durante a partição de biomoléculas, além do ajuste matemático inserido.

A literatura científica tem apresentado alguns trabalhos de partição em sistemas álcoois e sais (OOI *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2010), porém a otimização das condições do processo de partição das biomoléculas não é inteiramente estudadas, portanto este trabalho aplica a variação dos tipos e concentrações dos álcoois e sais de fosfato de potássio, da temperatura e da adição dos eletrólitos, tornando o trabalho inovador. As moléculas estudadas foram escolhidas como modelos, os aminoácidos para entendimento da partição de peptídeos e proteínas.

2. AMINOÁCIDOS

Os aminoácidos são as unidades monoméricas formadoras dos peptídeos e proteínas, a molécula é composta por uma porção carboxila ligada a porção amina por um carbono alfa, ao qual estão ligados diferentes radicais, propiciando assim a diferenciação destes compostos (NELSON; COX, 2011). Basicamente existem 22 aminoácidos que se ligam por meio de ligações peptídicas, e destes 8 são chamados de "essenciais" pois não são sintetizados pelos humanos (histidina, iso-leucina, leucina, lisina, metionina, treonina, triptofano), e, portanto, devem fazer parte da dieta alimentar (LEE *et al.*, 2003). Além deste importante papel na nutrição humana, os aminoácidos são utilizados na produção de plásticos biodegradáveis,



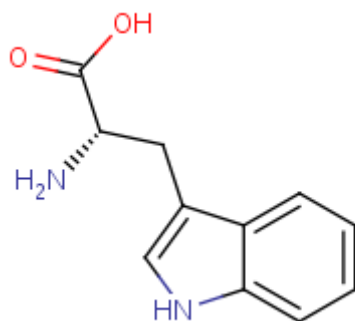
drogas e catalisadores quirais, realçadores de sabor, adoçantes com baixas calorias, além da sua aplicação na síntese de fármacos e cosméticos (PENTEADO, 2003).

Esses monômeros apresentam solubilidade em água e em solução aquosa (JI; FENG, 2008), mas essa propriedade é reduzida em solventes orgânicos e influenciada fortemente pelo valor do pH e da força iônica da solução aquosa, apresentam ainda um elevado ponto de fusão (ASENJO; ANDREWS, 2011).

2.1 Triptofano

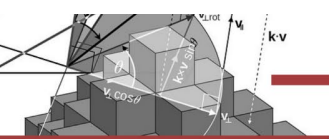
O triptofano (Figura 1) é um aminoácido aromático essencial, tanto para homens como animais, pois não pode ser produzido no organismo, tendo que ser obtido na alimentação diária. Este aminoácido é encontrado em menor concentração nas proteínas dietéticas: 1% nas proteínas de origem animal e 1,4% nas proteínas de origem vegetal (ROSSI; TIRAPEGUI, 2004), tendo como dosagem de ingestão recomendada 100 mg/kg de massa corporal por dia (MARKLOVÁ *et al.*, 2000). O isolamento de triptofano foi primeiramente relatado por Frederick Hopkins em 1901, por meio da hidrólise da caseína. A partir de 600 gramas de caseína bruta obtém-se 4-8 g de triptofano (GOIHL, 2006).

Figura 1: Estrutura molecular do triptofano.



Fonte: A autoria própria (2022).

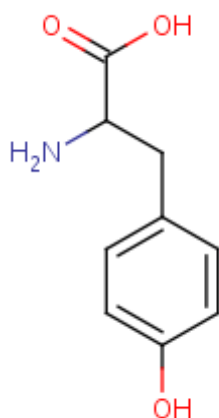
Além de ser precursor da serotonina, o triptofano apresenta outras funções como: contribuição no crescimento normal e síntese proteica, influência no sono, comportamento, fadiga, ingestão alimentar, precursor da vitamina B₃ e é um dos aminoácidos que estimula a secreção de insulina e hormônio do crescimento (ROSSI; TIRAPEGUI, 2004). Os distúrbios de má absorção de frutose e intolerância à lactose provocam absorção inadequada do triptofano no intestino, ocasionando a redução da concentração de triptofano no sangue. No sistema nervoso central atua na produção de serotonina desempenhando uma atividade antidepressiva (GOIHL, 2006).



2.2 Tirosina

A tirosina (Figura 2) é um aminoácido aromático não essencial, produzido a partir da fenilalanina. Este aminoácido pode ser encontrado na carne, trigo, aveia e frutos do mar, e apresenta importante papel no metabolismo, pois é precursor de importantes neurotransmissores como adrenalina, noradrenalina e dopamina. Outra função é a aceleração no sistema nervoso agindo como regulador do humor, na comunicação entre neurônios e supressor de apetite. Cabe também destacar a atividade antitumoral, a ação na redução da gordura corporal e auxílio na produção de melanina (BRETTI *et al.*, 2011). A tirosina também é precursora dos hormônios tireoidianos triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) que são produzidos pela tireoide (CHATCRAWALSAIN, 2005).

Figura 2: Estrutura molecular da tirosina.



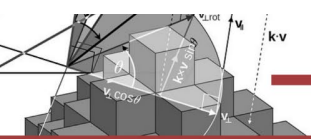
Fonte: Autoria própria (2022).

3. METODOLOGIA

Os materiais utilizados foram os álcoois (metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol) e os sais fosfato de potássio tribásico (K_3PO_4), fosfato de potássio dibásico anidro (K_2HPO_4) e fosfato de potássio monobásico anidro (KH_2PO_4) foram adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Os aminoácidos L-Tirosina (> 99,5%) e o L-Triptofano (> 99,0%) foram fornecidos pela Fluka. Todos os produtos químicos acima foram de grau analítico. Água destilada e deionizada foi utilizada em todo o experimento.

3.1 Extração das biomoléculas em sistema aquoso bifásico

O estudo da partição das biomoléculas (L-tirosina, L-triptofano, cafeína e tetraciclina) foram preparadas em tubos de centrifuga de 15 mL providos de tampas de vedação para prevenir a vaporização dos álcoois. Quantidades adequadas dos componentes do sistemas



álcoois e sal de fosfato de potássio para perfazer uma solução de concentração de 40-60 % (p/p) e 10 - 20% (p/p), respectivamente, foram pesadas e sobre elas foram adicionadas uma solução aquosa das biomoléculas - L-tirosina, L-triptofano, cafeína e tetraciclina, de forma a se ter uma concentração de 10 mg/L e em cada tubo, o sistema apresentava ao final uma massa de 14,0 g. Depois de uma homogeneização completa por agitação vigorosa, cada sistema foi centrifugado a 3000 x g por 10 min, para induzir a separação das fases, e em seguida deixado em por no mínimo 18 h para atingir o equilíbrio.

Após este tratamento, ambas as fases tornaram-se claras e transparentes e a interface bem definida. As fases foram cuidadosamente separadas com auxílio de uma pipeta para a fase de topo e uma seringa com uma agulha longa para a fase de fundo, e em seguida foram determinadas as massas e os volumes de cada fase. As temperaturas avaliadas foram entre 278.15 K a 308.15 K.

O coeficiente de partição (K) foi definido como a relação entre as concentrações das biomoléculas na fase de topo e fundo. A fim de avaliar o processo de extração, a razão volumar (R_v) e a eficiência da extração das biomoléculas (E -%) foram calculados de acordo com Souza *et al.* (2010), e apresentados nas equações (3.1) a (3.3).

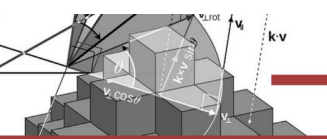
$$K = \frac{C_T}{C_B} \quad (3.1)$$

$$R_v = \frac{V_T}{V_F} \quad (3.2)$$

$$E = 100 \times \left(\frac{K \times R_v}{1 + K \times R_v} \right) \quad (3.3)$$

onde: C é a concentração das biomoléculas é o volume, E a eficiência de extração e T e B correspondem as fases de topo e fundo, respectivamente.

A otimização da partição das biomoléculas foi iniciada com o estudo do efeito dos tipos de álcoois e sais de fosfato de potássio empregado, nesta fase elegeu-se a combinação de parâmetros que propiciava a migração da molécula ou para a fase rica em álcool ($K > 1,0$) ou para a fase rica sem sal de fosfato de potássio ($K < 1,0$). Em seguida variou-se as concentrações do sal de fosfato de potássio escolhido (10 a 20 %, p/p), do álcool elegido (40 a 60 %, p/p), temperatura entre 278,15 a 303,15 K, adição de de eletrólitos com variação do cátion ($BaCl_2$,



CaCl₂, MgCl₂, LiCl, NaCl e KCl) e dos ânions (NaSCN, NaI, NaBr, NaNO₃, NaCl, Na₂HPO₄, Na₂SO₄ e NaF) na concentração de 0,1 % (p/p) e em seguida estudou-se a concentração de eletrólitos, usando NaCl (0,5 a 5,0 %, p/p).

3.2 Determinação da concentração das biomoléculas

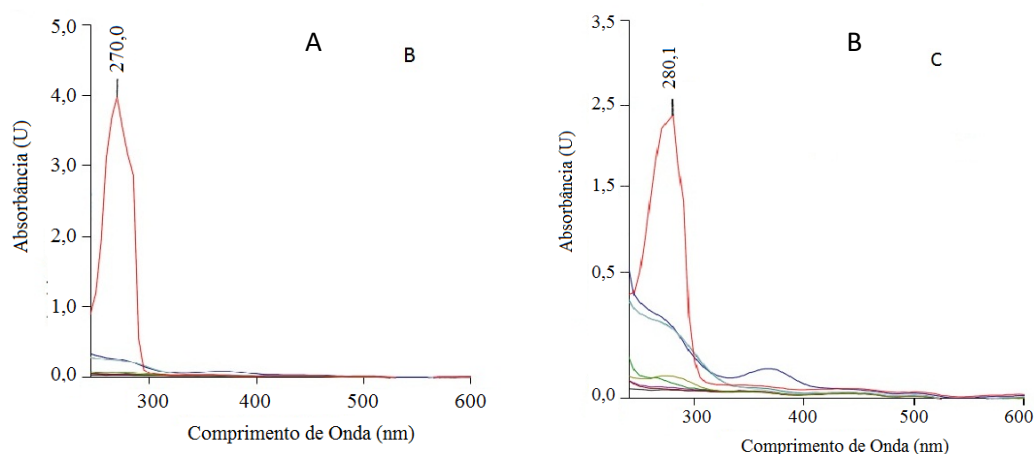
A determinação das concentrações das biomoléculas nas fases do sistema estudados foi realizada por meio de espectroscopia UV-Vis, utilizando o aparelho Varian Cary-50 Espectrofotômetro UV-visível Bio, em comprimentos de onda definidos por meio da máxima absorção (L-tirosina - 270 nm, L-triptofano – 280 nm). Curvas de calibração, para cada biocomposto, foram previamente determinadas. A interferência dos sais inorgânicos e dos álcoois no método analítico da verificação de sobreposição de picos de absorção máxima no espectro de varredura na região do UV-Vis.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

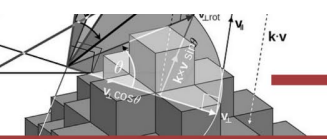
4.1 Influência dos constituintes do SAB nas determinações das biomoléculas

Para avaliar a influência dos constituintes do sistema aquoso bifásico, foi realizada uma varredura no espectro UV-visível para as soluções aquosas dos álcoois e sais de fosfato de potássio a 40% (p/p), bem como de solução aquosa das biomoléculas (40 mg/L), como mostra a Figura 3. Observou-se primeiramente que os comprimentos de onda que garantem a máxima absorção foi 270 nm L-tirosina (ZAIA *et al.*, 1998), 280 nm L-triptofano (TOMÉ *et al.*, 2010).

Figura 3: Espectro de absorção dos constituintes do sistema e da solução de biomoléculas (40 mg/L) (A-tirosina, B-triptofano).



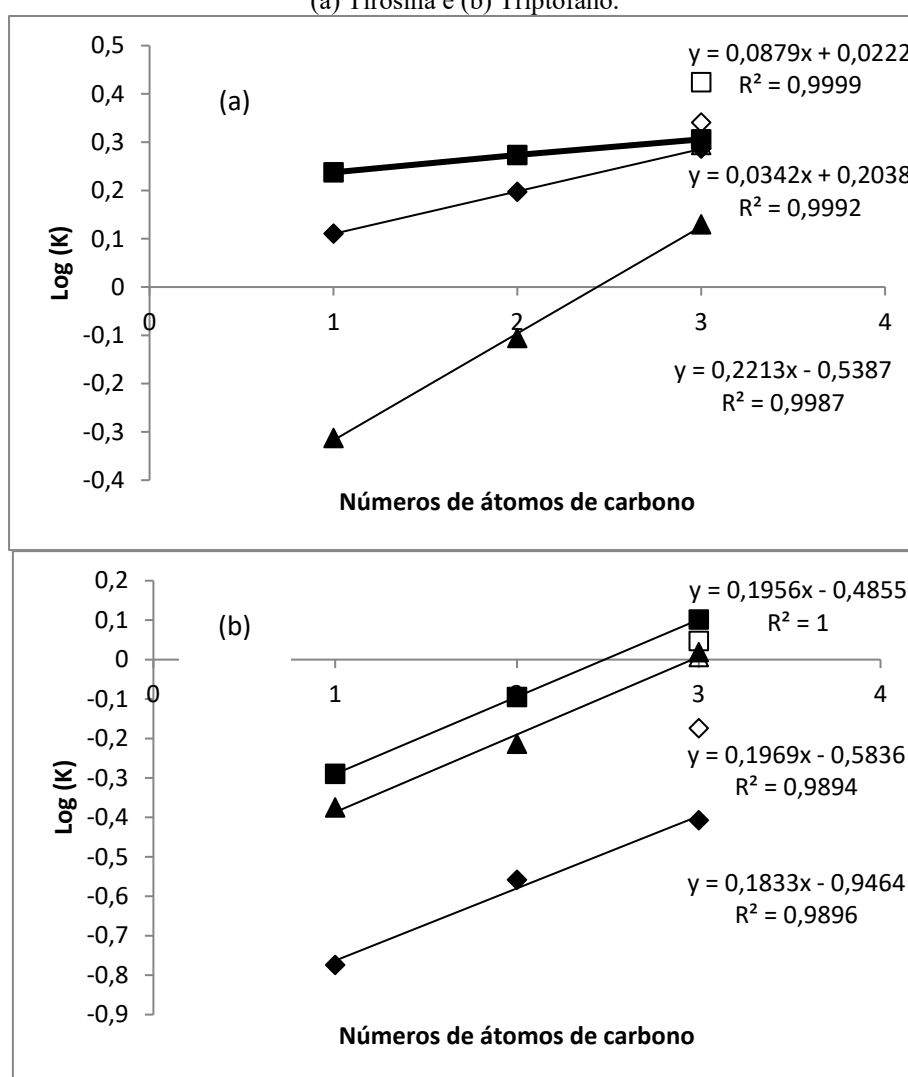
Fonte: Autoria própria (2022).



4.2. Extração dos aminoácidos (Tirosina e Triptofano)

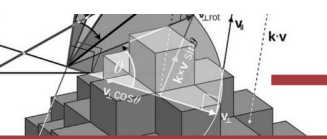
O processo de otimização da partição dos aminoácidos foram realizados utilizando os sistemas, cujos diagramas de fase foram construídos neste trabalho. Os resultados da partição dos aminoácidos nos sistemas formado com os diferentes álcoois e sais de potássio estão apresentados na Figura 4.

Figura 4: Influência do tipo de álcool (1=metanol, 2=etanol e 3 =1-propanol) e fosfato de potássio (▲ - K_3PO_4 , ■ - K_2HPO_4 e ◆ - K_2HPO_4/KH_2PO_4 tampão) sobre o coeficiente de partição dos aminoácidos usando 50% de álcool em peso 15% em peso de fosfato de potássio em 298,15K. O símbolo aberto representa 2-propanol. Onde (a) Tirosina e (b) Triptofano.



Fonte: Autoria própria (2022).

Os processos de partição de biomoléculas em sistemas aquosos bifásicos formados por compostos orgânicos e sais inorgânicos são regidos pela hidrofobicidade do composto orgânico, especificamente pelo comprimento da cadeia alquílica (número de átomos de carbono) e pelo efeito do *salting-out* promovido pela adição dos sais inorgânicos (FREIRE *et al.*, 2010; FREIRE *et al.*, 2011). Os resultados da partição dos aminoácidos mostram que o aumento da cadeia alquílica do álcool possibilita o aumento do coeficiente de partição.



Outra possibilidade de explicação para este efeito é a interação da cafeína com os álcoois formadores de sistemas, segundo Wang *et al.* (2010) o aumento da constante dielétrica do álcool possibilita a maior facilidade de formação de ligações de hidrogênio, e conseqüentemente maior interação entre as moléculas do álcool, a ordem decrescente para os valores desta constante é:

$$\text{metanol (33,1)} < \text{etanol (24,3)} < \text{1-propanol (20,52)} < \text{2-propanol (19,70)}.$$

O coeficiente de partição dos aminoácidos apresentam tendência contrária à constante dielétrica, que representa as interações álcool-álcool. Sugerindo que a interação das moléculas de aminoácidos - álcool é menor com valores de constante dielétrica maiores, e assim se explica a permanência dos aminoácidos na fase de fundo.

Comparando os coeficientes de partição dos aminoácidos entre si para cada álcool, pode-se notar que os valores dos coeficientes de partição para a tirosina são maiores que os do triptofano. Essa diferença é decorrente do número de pontes de hidrogênio que pode ser estabelecida com os álcoois, que no caso da tirosina ocorrem 4 possibilidades de formação de pontos de hidrogênio, enquanto que no triptofano são apenas 3.

Para as extrações da tirosina a composição do sistema com maior coeficiente de partição (2,66) foi 2-propanol e K_2HPO_4 , para o triptofano a composição do sistema com maior K (1,26) ocorreu para 1-propanol e K_2HPO_4 . Estes sistemas foram os escolhidos para continuar no processo de otimização da partição do aminoácido.

Após essa determinação, foi mantida a concentração constante do álcool, respectivo para cada aminoácido e foi variado a concentração do K_2HPO_4 de 10,0 a 20,0% (p/p). Com o aumento da quantidade do sal aumentou a exclusão das moléculas para a fase de topo, devido ao efeito *salting-out*, e conseqüentemente os aminoácidos foram particionados para a fase de topo. Os coeficientes de partição atingiram valores de 2,78 e 1,92 para a tirosina e o triptofano, respectivamente. Também foi observado que os valores de eficiência de extração foram elevados de 73,78 para 86,84 e de 69,70 para 76,85, para Tirosina e triptofano, respectivamente (Figura 5).

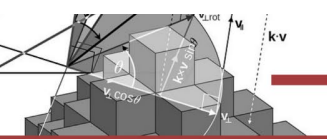
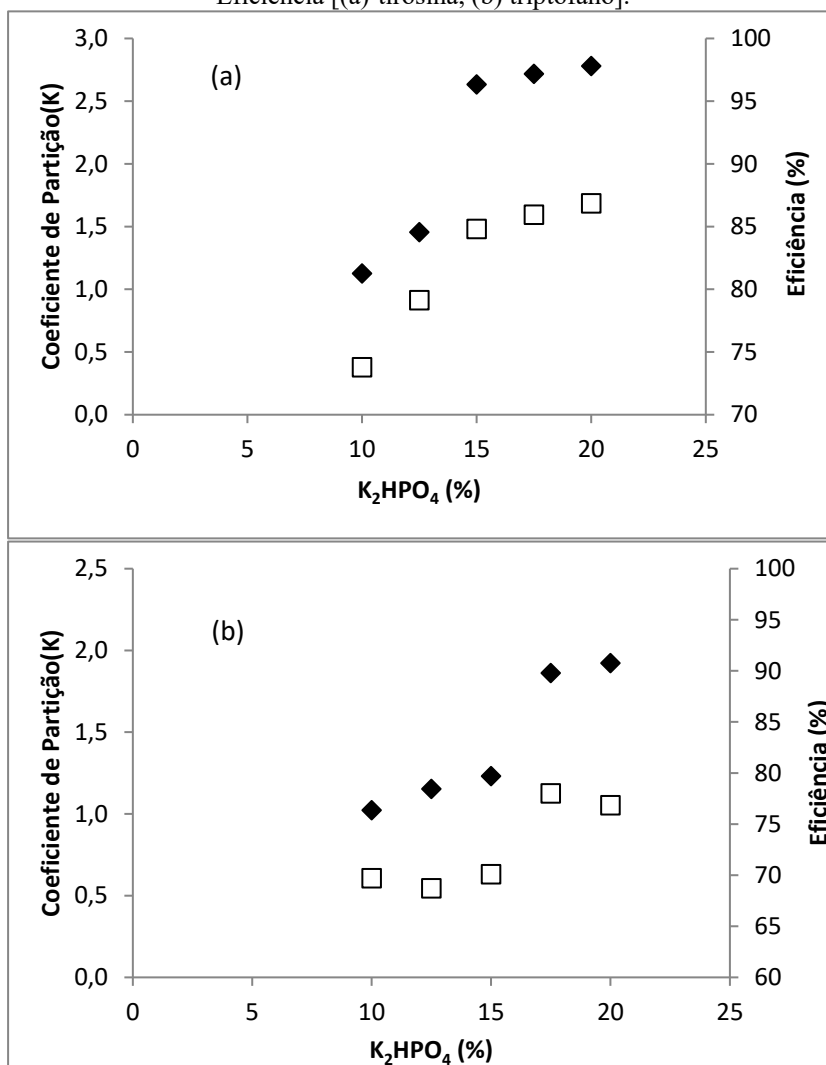


Figura 5: O coeficiente de partição e eficiência de extração do aminoácido em função variação da concentração do sal (10-20 p/p%) com seu respectivo álcool (50 p/p%) a 298.15 K. Onde ♦ Coeficiente de Partição e □ Eficiência [(a)-tirosina, (b) triptofano].



Fonte: Autoria própria (2022).

A análise da influência da variação da concentração do álcool (40, 45, 50, 55 e 60%, p/p) sobre o coeficiente de partição de aminoácidos foi estudada no sistema 2-propanol/ K_2HPO_4 (20% em peso) para a tirosina e no sistema 1-propanol/ K_2HPO_4 (20% em peso) para o triptofano (Figura 6). Observa-se efeitos antagônicos na partição dos aminoácidos. O aumento da concentração do álcool promove a diminuição do coeficiente de partição da tirosina e as eficiências de extração não são alteradas, enquanto que para o triptofano ocorre o aumento do coeficiente de partição e da eficiência de extração.

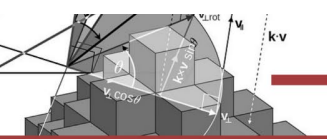
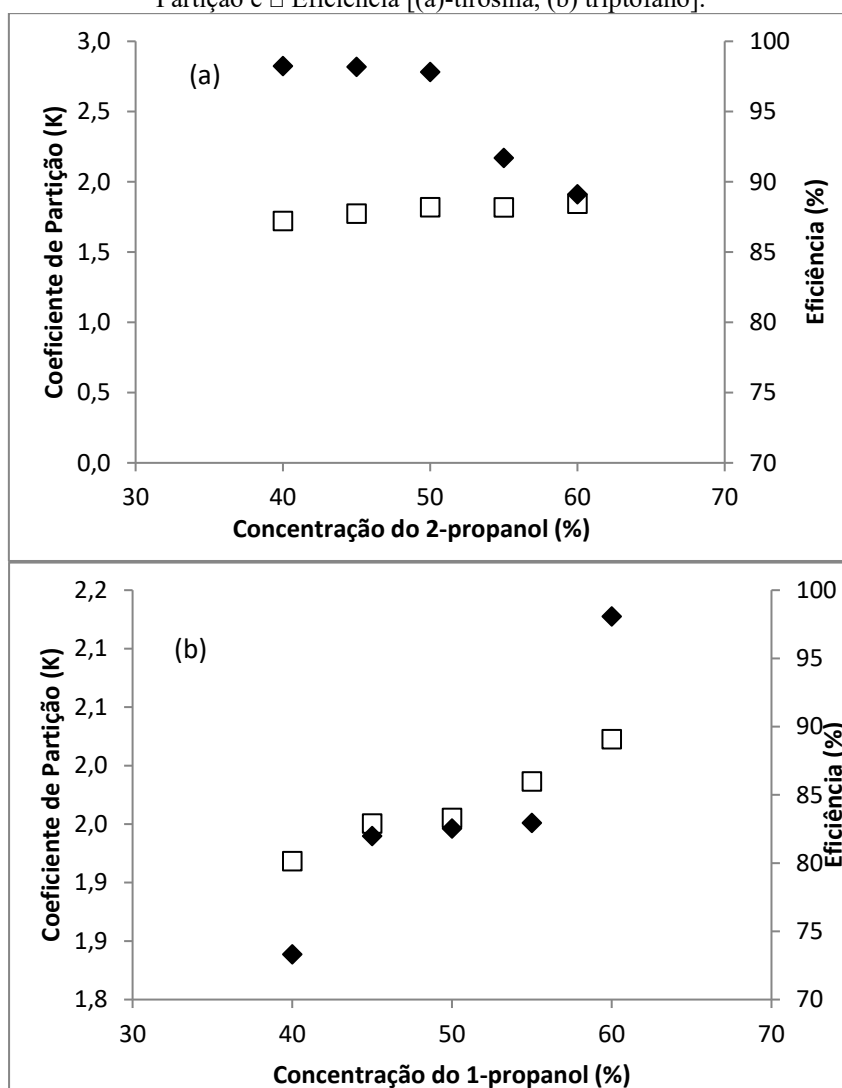


Figura 6: O coeficiente de partição e eficiência de extração dos aminoácidos em função variação da concentração do álcool (40-60 p/p%) com seu respectivo sal (20 p/p%) a 298,15 K. Onde \blacklozenge Coeficiente de Partição e \square Eficiência [(a)-tirosina, (b) triptofano].



Fonte: Autoria própria (2022).

O estudo do efeito da temperatura (278,15-303,15 K) sobre a extração dos aminoácidos foram realizados em sistema 60% (p/p) de 1-propanol e 20% (p/p) de K_2HPO_4 para triptofano e 40% (p/p) de 2-propanol e 20% (p/p) de K_2HPO_4 para tirosina, como mostra a Figura 7. Os resultados indicam que o aumento do coeficiente de partição aumentou com a temperatura, chegando a 3,01 para a tirosina e a 2,73 para triptofano ambos a 303,15 K, levando a concluir que a temperatura é um parâmetro crucial a ser manipulado. No entanto, a elevação da temperatura não pode ser demasiada para permitir a desnaturação do aminoácido, por isto a maior temperatura foi de 305,15 K.

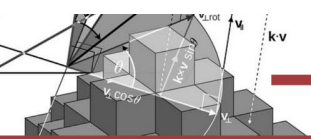
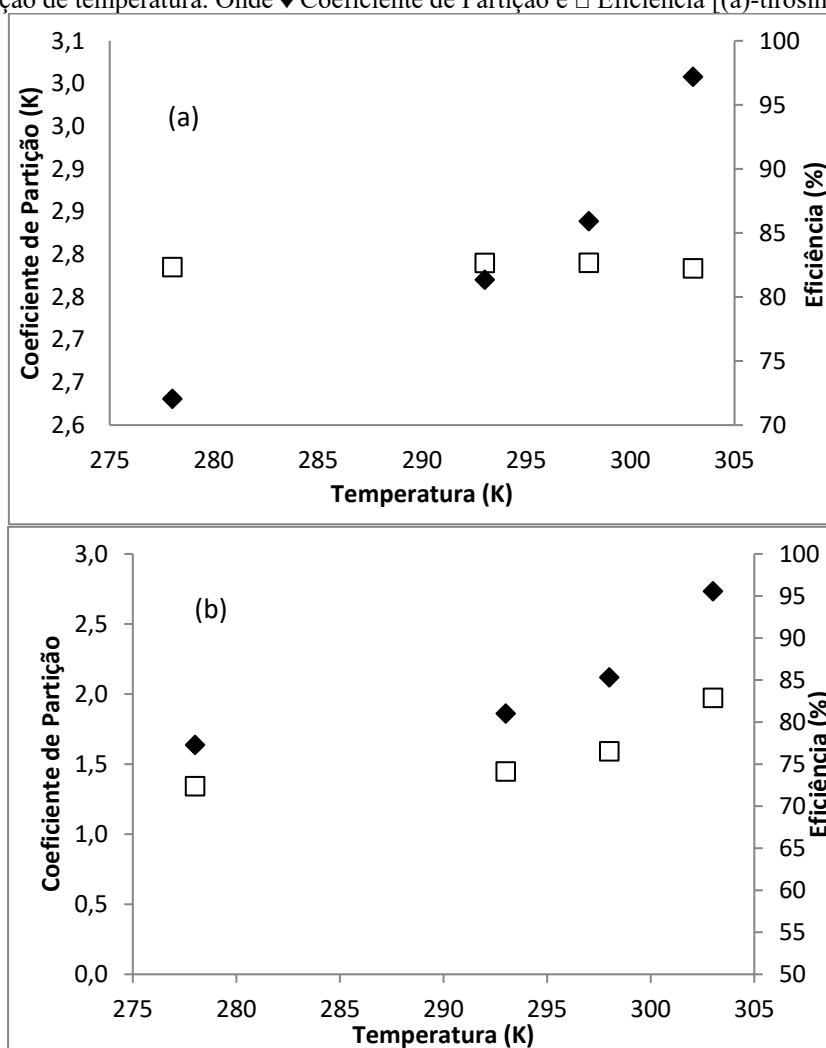


Figura 7: Efeito da temperatura sobre o coeficiente de partição e eficiência de extração dos aminoácidos em função da variação de temperatura. Onde \blacklozenge Coeficiente de Partição e \square Eficiência [(a)-tirosina, (b) triptofano].



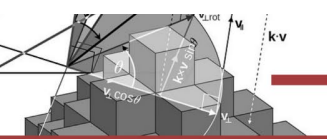
Fonte: Autoria própria (2022).

A fim de calcular os parâmetros termodinâmicos de transferência dos aminoácidos, tais como o variação da energia de Gibbs (ΔG°_m), a entalpia (ΔH°_m), e a entropia padrão molar de transferência (ΔS°_m), a abordagem utilizada baseou-se na equação de van't Hoff, os valores dos parâmetros termodinâmicos são apresentados na Tabela 1. Pereira *et al.* (2010) averiguando o efeito da temperatura na partição de L-triptofano em sistemas PEG-sal reportaram que este efeito é crucial na determinação dos coeficientes de partição e dos parâmetros termodinâmicos.

Tabela 1: Parâmetros termodinâmicos de particionamento dos aminoácidos usando 2-propanol para a tirosina (40 p/v%) e K_2HPO_4 (20 p/v%), e 1-propanol para o triptofano (60 p/v%) e K_2HPO_4 (20 p/v%).

	ΔH (KJ.mol ⁻¹)	ΔS (J.mol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔG (KJ.mol ⁻¹)
Tirosina	3,40	20,21	-2,72
Triptofano	6,54	28,87	-2,21

Fonte: Autoria própria (2022).

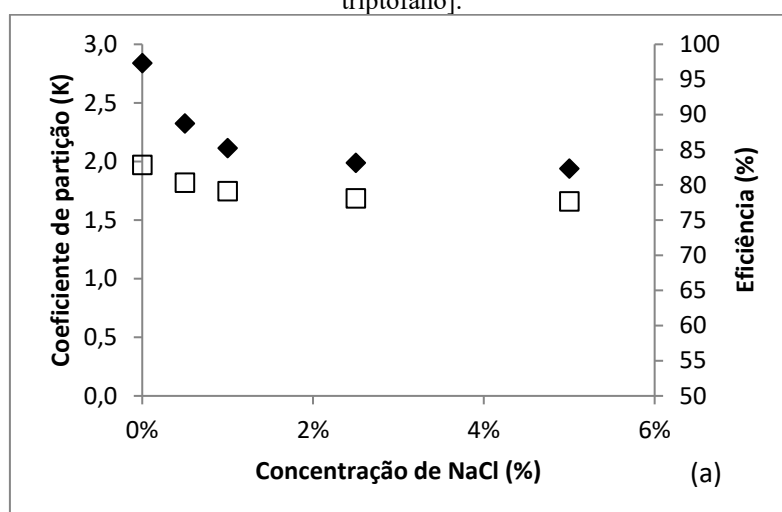


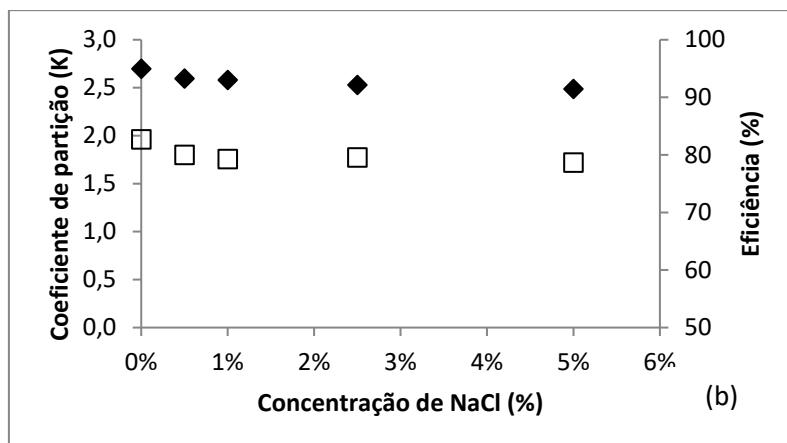
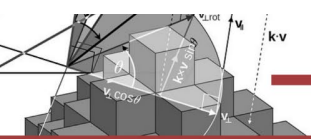
A presença de valores máximos dos coeficientes de partição como uma função da temperatura sugerem que a partição dos aminoácidos é impulsionada por efeitos opostos que resultam da dependência da temperatura, das contribuições energéticas e entrópica. O sistema aquoso bifásico é um processo espontâneo ($\Delta G_m^\circ < 0$), favorecendo a partição dos aminoácidos para a fase de topo, além ser um processo é endotérmico ($\Delta H_m^\circ > 0$) regido por mudanças entrópicas devido à $T \times \Delta S_m^\circ$ é maior do que ΔH_m° . Pei *et al.* (2012), em sistemas formados por K_2HPO_4 e $[C_4mim]Br$ a pH 9.3 para leucina observaram também que o processo de extração era espontâneo, endotérmico e controlado pela entropia do sistema.

Baseados nos resultados do efeito da temperatura nos SAB para os aminoácidos, utilizou-se os sistemas 60% (p/p) de 1-propanol e 20% (p/p) de K_2HPO_4 para triptofano e 40% (p/p) de 2-propanol e 20% (p/p) de K_2HPO_4 para tirosina, com o intuito de averiguar a influência da adição de cloreto de sódio (0 a 5%, p/p) na partição e recuperação das biomoléculas (Figura 8).

Foi observado que apenas a l-tirosina apresenta uma pequena redução no coeficiente de partição à medida que aumenta a concentração de cloreto de sódio, já para o triptofano a influência é negligenciada. As eficiências de extração permaneceu praticamente a mesma para estes sistemas.

Figura 8: Efeito da temperatura sobre o coeficiente de partição e eficiência de extração dos aminoácidos em função da variação de concentração de NaCl. Onde \blacklozenge Coeficiente de Partição e \square Eficiência [(a)-tirosina, (b) triptofano].





Fonte: Autoria própria (2022).

Alguns trabalhos da literatura reportam valores de coeficiente de partição utilizando diferentes sistemas. A Tabela 2 apresenta esses valores. Observa-se que a constituição do sistema é de fundamental importância na separação, isto porque os valores do coeficiente de partição são bastante variados. O triptofano também

Freire *et al.* (2011) verificou que para sistemas utilizando líquidos iônicos como e carboidratos ([C4mim][CF₃SO₃] - 40%, p/p + carboidratos - 25%, p/p) a eficiência de extração não excediam 50%, valor muito abaixo dos encontrados neste trabalho para os sistemas álcoois + sal de fosfato de potássio.

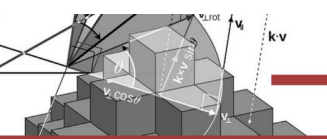
Tabela 2: Coeficiente de partição de L-triptofano em diferentes sistemas aquosos bifásico.

Sistema	K	Referencia
[C ₄ mim][CF ₃ SO ₃] (40%, p/p) + carboidratos (25%, p/p)	1,50 – 2,68	Freire <i>et al.</i> , 2011
PEG-600 (40%, p/p) + Na ₂ SO ₄ (5%, p/p)	14,93	Pereira <i>et al.</i> , 2010
PEG-600 (40%, p/p) + Na ₂ SO ₄ (5%, p/p) + [C ₄ mim]Cl (5%, p/p)	21,84	Pereira <i>et al.</i> , 2010
[P ₄₄₄₁][MeSO ₄] + (23%, p/p) + K ₃ PO ₄ (11%, p/p)	9,0	Louros <i>et al.</i> , 2010

Fonte: Autoria própria (2022).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A extração da L-tirosina e do L-triptofano são processos não espontâneos, endotérmicos e regidos por efeitos entrópicos. O maior coeficiente de partição (K) para a L-tirosina ocorreu em sistema formado por 2-propanol e K₂HPO₄ na concentração de (40 e 20%, respectivamente), à temperatura de 30°C (K= 3,01 e recuperação de 82,23%), já para o L-triptofano foi sistema formado por 1-propanol (60%) e K₂HPO₄ (20%), à temperatura de 30°C (K= 2,73 e recuperação de 82,88%).



REFERÊNCIAS

CHUNG, E. S. *et al.* **Revisiting the determination of climate sensitivity from relationships between surface temperature and radiative fluxes.** *Geophysical Research Letters*, 37, L10703, 6. 2010. Disponível em: < <https://ui.adsabs.harvard.edu/abs/2010GeoRL..3710703C> >. Acessado em: 18 out. 2019.

ANDREO, D.; JORGE, N. **Antioxidantes naturais: técnicas de extração B.CEPPA**, Curitiba v. 24, n. 2, p. 319-336, jul./dez. 2006. Disponível em: <<http://sci-hub.tw/10.5380/cep.v24i2.7489>>. Acessado em: 18 out. 2019.

ASENJO, J. A.; ANDREWS B. A. **Aqueous two-phase systems for protein separation: a perspective.** *Journal of Chromatography A*. Inglaterra 49:8826-35. 2011 Disponível em: < <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/01496395.2011.5765436> >. Acessado em: 18 out. 2019.

BRETTI, C. *et al.* **Some thermodynamic properties of dl-Tyrosine and dl-Tryptophan. Effect of the ionic medium, ionic strength and temperature on the solubility and acid–base properties.** *Fluid Phase Equilibria*. Inglaterra 314, 185– 197. 2012 Disponível em: < <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/01496395.2012.9876546> >. Acessado em: 18 out. 2019.

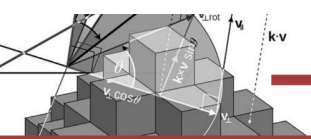
CHAN, C. H. *et al.* **Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants.** *Journal of Chromatography A*. Inglaterra, 1218: 6213 – 6225, 2011. Disponível em: < <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/01496395.2011.5873306> >. Acessado em: 18 out. 2019.

CHATCHAWALSAISIN, J. *et al.* **The preparation by extrusion/spheronization and the properties of pellets containing drugs, microcrystalline cellulose and glyceryl monostearate.** *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, Inglaterra, 24, 35-48. 2005. Disponível em: < <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/01496395.2005.5839246> >. Acessado em: 18 out. 2019.

FREIRE, M. G. *et al.* **High-performance extraction of alkaloids using aqueous two-phase systems with ionic liquids.** *Green Chemistry*. Inglaterra, 12, 1715–1718. 2010. Disponível em: < <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/01496395.2010.987656> >. Acessado em: 18 out. 2019.

FREIRE, M. G. *et al.* **Aqueous biphasic systems composed of water-stable ionic liquid +carbohydrates and their applications.** *Green Chemistry*. Inglaterra, 13, 1536. 2011. Disponível em: < <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/01496395.2011.1234586> >. Acessado em: 18 out. 2019.

GOIHL, J. **Tryptophan can lower aggressive behavior.** *Feedstuffs*, Alemanha. 78, 12-22. 2006. Disponível em: < https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Tryptophan+can+lower+aggressive+behavior >



r&author=J.+Goihl&publication_year=2006&journal=Feedstuffs&pages=12-22> Acessado em: 18 out. 2019.

Hasmann, F. A. *et al.* **Purificação de biomoléculas intracelulares, produzidas por microrganismos.** *Microrbiologia in Foco*. Inglaterra 04-11. 2008. Disponível em: < <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/01496395.2008.8764326>>. Acessado em: 18 out. 2019.

Ji, P. E.; FENG, W. **Solubility of amino acids in water and aqueous solutions by the statistical associating fluid theory.** *Industrial e Engineering Chemistry Research*. Inglaterra. 47,6275-6279. 2008. Disponível em: < <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/01496395.2008.5955436>>. Acessado em: 18 out. 2019.

LEE, S. W.; LIM, J. M.; BOO, S. H. (Org) **Colorimetric determination of amino acids using genipin from Gardenia jasminoides.** *Anal.Chemical Acta*, Inglaterra 480, 267. 2003. Disponível em: < <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/01496395.2003.7893356>>. Acessado em: 18 out. 2019.

JUN, X. **Caffeine extraction from green tea leaves assisted by high pressure processing.** *Journal of Food Engineering*. Inglaterra 94, 105–109. 2009. Disponível em: < <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/01496395.2009.5843516>>. Acessado em: 18 out. 2019.

MARKLOVÁ, E.; MAKOVIC'KOVÁ, H.; KRÁKOROVA, I. (Org) **Screening for defects in tryptophan metabolism.** *Journal of chromatography A*, Inglaterra 870, 289-293. 2000. Disponível em: < <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/0149634.2000.583456>>. Acessado em: 18 out. 2019.

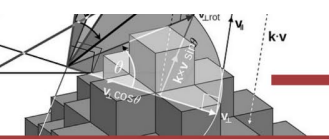
OOI, C. W. *et al.* **Purification of lipase derived from Burkholderia pseudomallei with alcohol/salt-based aqueous two-phase systems.** *Process biochemistry*. Inglaterra, 44, 1083-1087. 2009. Disponível em: < <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/01496395.2009.5843316>>. Acessado em: 18 out. 2019.

PARK, H. S. *et al.* **Extraction behaviors of caffeine and chlorophylls in supercritical decaffeination of green tea leaves.** *Food Science and Technology*. Inglaterra, 45, 73-78. 2012. Disponível em: < <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/01496395.2012.5973306>>. Acessado em: 18 out. 2019.

PENTEADO, M. D. V. C. **Vitaminas –Aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos.** São Paulo: Ed. Metha. p. 611 2003. Disponível em: <https://repositorio.usp.br/item/001306512>. Acesso em: 18 out. 2019.

ROSSI, L.; TIRAPAGUI, J. **Implicações do sistema serotoninérgico no exercício físico.** *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*, São Paulo, v. 48, n. 2, p. 227-233. 2004. Disponível em : < <https://www.scielo.br/j/abem/a/TwYqWxv5dTMxrDz3k5CPS6g/abstract/?lang=pt>> Acessado em 18 out 2019.

PEREIRA, J. F. B. *et al.* **Ionic liquids as adjuvants for the tailored extraction of biomolecules in aqueous biphasic systems.** *Green Chemistry*. Inglaterra, 12, 1661–1669.



2010. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/01496395.2010.5443306>>. Acessado em: 18 out. 2019.

TOMÉ, L. I. N. *et al.* **Tryptophan extraction using hydrophobic ionic liquids.** Separation and purification technology. 72, 167-173. 2010. Inglaterra 8, 886-891. 2010. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/01496395.2010.3873306>>. Acessado em: 18 out. 2019.

WANG, Y. *et al.* **Liquid-liquid equilibrium of novel aqueous two-phase systems and evaluation of salting-out abilities of salts.** Central European Journal of Chemistry. Inglaterra, 8, 886-891. 2010. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/01496395.2010.5873306>>. Acessado em: 18 out. 2019.

WANG, Y. *et al.* **Application of Water-Miscible Alcohol-Based Aqueous Two-Phase Systems for Extraction of Dyes.** Separation Science and Technology. Inglaterra, 46, 1283–1288. 2011. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/01496395.2011.583306>>. Acessado em: 18 out. 2019.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. (Org) ELICHTIG, J. **Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos metodos existentes.** Química nova. São Paulo, 21, jun. 1998. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/sa/a/N9DLLrhzrnzkwbxM6LWx7g/?lang=pt>> Acessado em: 18 out. 2019.