



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

FABIANA LUÍSA SILVA

**EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE 2,3-BUTANODIOL UTILIZANDO SISTEMAS
AQUOSOS BIFÁSICOS E PROCESSOS DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS**

Florianópolis

2020

FABIANA LUÍSA SILVA

**EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE 2,3-BUTANODIOL UTILIZANDO SISTEMAS
AQUOSOS BIFÁSICOS E PROCESSOS DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS**

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, para obtenção do grau de Doutora em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Marco Di Luccio
Coorientador: Prof. Dr. Alan Ambrosi

Florianópolis

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Silva, Fabiana Luísa

EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE 2,3-BUTANODIOL UTILIZANDO
SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS E PROCESSOS DE SEPARAÇÃO POR
MEMBRANAS / Fabiana Luísa Silva ; orientador, Marco Di
Luccio , coorientador, Alan Ambrosi, 2020.

94 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em
Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Engenharia de Alimentos. 2. 2,3-butanodiol. 3.
Sistema aquoso bifásico. 4. Processos de separação com
membranas. 5. Purificação. I. Di Luccio , Marco . II.
Ambrosi, Alan . III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de
Alimentos. IV. Título.

FABIANA LUÍSA SILVA
**EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE 2,3-BUTANODIOL UTILIZANDO SISTEMAS
AQUOSOS BIFÁSICOS E PROCESSOS DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca
examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Helen Treichel, Dr.(a)
Universidade Federal da Fronteira Sul

Prof.(a) Kátia Rezzadori, Dr.(a)
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Alcilene Rodrigues Monteiro Fritz, Dr.(a)
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi
julgado adequado para obtenção do título de doutora em Engenharia de Alimentos.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Marco Di Luccio, Dr.
Orientador

Florianópolis, 2020.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Luciana e Josué (*in memorian*) uma imensa gratidão pelo apoio e dedicação. Sempre me acolheram com carinho nos momentos difíceis e de incertezas ao longo da minha vida acadêmica. Vocês foram essenciais nessa conquista! Amo vocês!

Ao meu orientador Prof. Dr. Marco Di Luccio e ao meu Coorientador Alan Ambrosi, pela orientação, incentivo, confiança e contribuições neste trabalho.

A toda equipe do LABSEM, pela convivência agradável e divertida, em especial a Jádina e ao Richer, pela disponibilidade e ajuda na realização dos experimentos. Um agradecimento especial também para a Mari, Ingrid, Nely, Monique e Angélica, agradeço o apoio, a colaboração intelectual e a disponibilidade de sempre ajudar nos experimentos e análises, vocês fazem toda a diferença na construção do conhecimento científico, que nós conquistamos cada vez mais espaços.

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos e à Universidade Federal de Santa Catarina.

À Prof^a. Dr^a. Denise Maria Guimarães Freire da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pelas análises iniciais de HPLC e pela doação de amostras para realizar experimentos.

Ao Laboratório de Propriedades Físicas de Alimentos, pelas análises iniciais de HPLC.

Ao Prof. Dr. Boris U. Stambuk, e ao Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia de Leveduras, pelas análises de HPLC. Em especial ao Eduardo Zanella, gratidão por sua solicitude e colaboração.

À CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

RESUMO

O 2,3-butanodiol (2,3-BDO) é um composto versátil, utilizado na indústria de alimentos, química e farmacêutica. O interesse na produção biotecnológica do 2,3-BDO é crescente e o Brasil tem uma posição estratégica dentro desse contexto, pois possui biomassa em abundância gerada pela agroindústria. O processo *downstream* do 2,3-BDO é uma tarefa desafiadora devido à complexidade do meio fermentado e as propriedades físico-químicas do 2,3-BDO. Com base no exposto o objetivo desse trabalho foi propor um processo de extração e purificação para o 2,3-BDO. Pela primeira vez estudou-se a viabilidade da extração do 2,3-BDO em sistema aquoso bifásico (SAB) formado por PEG-sal e posterior purificação utilizando processos de separação por membranas. Para investigar o desempenho da extração do 2,3-BDO no SAB foi analisado se o tipo de sal (citrato de sódio, sulfato de amônio e fosfato de potássio), a massa molar do PEG 4000 e 6000 Da e as concentrações desses constituintes mudariam os valores do coeficiente de partição (K) e da recuperação do 2,3-BDO ($Y_T\%$) no sistema. Os resultados obtidos nesse estudo evidenciaram que a extração de moléculas no SAB é um fenômeno complexo. Vários fatores contribuíram para a extração do 2,3-BDO, entre eles o poder de solvatação do sal, a concentração dos constituintes no sistema e a menor massa molar do PEG 4000 que possivelmente interferiram na viscosidade das fases e conseqüentemente na transferência de massa do 2,3-BDO no sistema. A melhor condição para a extração do 2,3-BDO foi no SAB constituído por 36,22 % (m/m) de PEG 4000 e 4,47 % (m/m) de fosfato de potássio, a recuperação chegou a $94,2\% \pm 0,31$ e coeficiente de partição foi expressivo $2,37 \pm 0,04$. Para a etapa seguinte, de purificação do 2,3-BDO extraído no SAB foram selecionadas três membranas, a NP010, UH004 e BW30. A membrana NP010 foi identificada como a mais adequada para a etapa de separação pois apresentou alta rejeição ao PEG 4000, 87,0 %. A membrana BW30, utilizada na etapa de concentração do 2,3-BDO também apresentou um bom desempenho, pois além de apresentar uma alta seletividade, exibiu fluxo permeado praticamente constante ao longo do tempo. Por fim, com este estudo foi possível concluir a associação do SAB com a tecnologia de separação por membranas é uma proposta promissora de processo *downstream* do 2,3-BDO, uma vez que ambas operações unitárias apresentaram resultados efetivos dentro das aplicações propostas por esse trabalho.

Palavras-chave: 2,3-butanodiol. Sistema aquoso bifásico. Coeficiente de partição. Nanofiltração. Osmose inversa. Seletividade.

ABSTRACT

The 2,3-Butanediol (2,3-BDO) is a versatile compound used in the food, chemical, and pharmaceutical industry. The interest in the biotechnological production of 2,3-BDO is growing. Brazil has a strategic position within this context, as it has abundant biomass generated by agribusiness. The 2,3-BDO downstream process is a challenging task due to the complexity of the fermented medium and some physicochemical properties of 2,3-BDO. The objective of this work was to propose an extraction and purification process for 2,3-BDO. Thus an integrated process comprising an aqueous two-phase system (ATPS) and membrane separation processes has been studied for the first time. The feasibility of the extraction was investigated through the partition coefficient (K) and recovery (YT %) of 2,3-BDO by varying some parameters of the system, such as the phase-forming salts (sodium citrate, ammonium sulfate, and potassium phosphate), the molar mass of the poly(ethylene) glycol (PEG 4000 and 6000Da) and the concentrations of these constituents of the ATPS. The results showed that the extraction of molecules in the ATPS is a complex phenomenon, and the solvation ability of the salt, the concentration of constituents in the system, and the molar mass of PEG on the extraction of 2,3-BDO have effects on the extraction. The highest values of the 2,3-BDO extraction were obtained in ATPS based on PEG 4000 36.22% (w / w) and potassium phosphate 4.47% (w / w), for which the recovery reached $94,2\% \pm 0.31$, and partition coefficient was 2.37 ± 0.04 (137%). Three commercial membranes were selected, UH004, NP010 e BW30 for the purification step of 2,3-BDO extracted in the ATPS. The NP010 membrane was identified as the most suitable for the separation step because presenting high rejection to PEG 4000, 87.0%. The BW30 membrane exhibited a high selectivity, good permeate flow, which did not suffer a significant reduction over time in the 2,3-BDO concentration step. In this study, it was possible to conclude that an integrated process comprising of an aqueous two-phase system (ATPS) and membrane separation processes proved efficient in 2,3-BDO downstream process.

Keywords: 2,3-butanediol. Aqueous two-phase system. Partition coefficient. Nanofiltration. Reverse osmosis. Selectivity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estereoisômeros do 2,3-butanodiol.....	17
Figura 2: Esquema da síntese de compostos químicos derivados do 2,3-butanodiol.....	18
Figura 3: Exemplo de diagrama de fase de um sistemas aquosos bifásicos, expresso em coordenadas retangulares.....	26
Figura 4: Esquema ilustrativo da filtração tipo <i>cross-flow</i> (a) e <i>dead-end</i> (b).....	34
Figura 5: Fluxograma do processo de extração do 2,3-BDO em SAB.....	38
Figura 6: Planejamento experimental (DCCR) para SAB PEG 4000-fosfato (a) e PEG 6000-fosfato (b) criado a partir dos diagramas de fases.	39
Figura 7: Médias referentes à recuperação (Y_T %) (a) e ao coeficiente de partição (K) do 2,3-BDO (b) na melhor condição de extração do 2,3-BDO de cada SAB estudado.	53
Figura 8: Estudo do efeito do tempo de agitação sobre recuperação (YT %) e o coeficiente de partição (K) do 2,3-BDO no SAB PEG 4000-fosfato.	56
Figura 9: Esquema do sistema de filtração <i>dead-end</i> utilizado nos ensaios de permeação.....	59
Figura 10: Fluxograma do estudo de rejeição do PEG 4000 pelas membranas UH004 (a) e NP010 (b).	60
Figura 11: Fluxograma do estudo de rejeição do 2,3-BDO pelas membranas UH004 (a) e NP010 (b) e BW30 (c).....	62
Figura 12: Diagrama do processo de separação e concentração do 2,3-BDO extraído no SAB.	63
Figura 13: Permeância hidráulica inicial das membranas UH004 e NP010.....	65
Figura 14: Fluxo permeado obtido nas membranas UH004 (a) e NP010 (b) durante os ensaios de rejeição do PEG 4000 (30g/L) em diferentes pressões.....	66
Figura 15: Fluxo de permeado e rejeição observada para o PEG 4000 nas membranas NP010 (a) e BW30 (b) na filtração do SAB PEG 4000-fosfato.....	72
Figura 16: Recuperação da permeância hidráulica das membranas NP010 e BW30 após procedimento de limpeza física.	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados sobre propriedades físicas e químicas do 2,3-BDO.	18
Tabela 2: Estudos sobre síntese biotecnológica de 2,3-BDO utilizando diferentes meios de fermentação e microrganismos para sua produção.....	20
Tabela 3: Estudos sobre <i>downstream</i> do 2,3 BDO produzido a partir de biomassa, utilizando diferentes operações unitárias como proposta para sua extração, concentração e/ou purificação.	23
Tabela 4: Exemplos de constituintes de sistemas aquosos bifásicos.....	25
Tabela 5: Níveis codificados e reais das variáveis independentes utilizados no DCCR sistemas PEG 4000-citrato, PEG 6000-citrato, PEG 4000-fosfato e PEG 6000-fosfato.	39
Tabela 6: Níveis codificados e reais das variáveis independentes utilizados no DDCR para os SAB PEG 4000-sulfato e PEG 6000-sulfato.	39
Tabela 7: Matriz do delineamento e respostas obtidas na extração do 2,3-BDO em SAB constituído de PEG 4000-citrato e PEG 6000-citrato.....	41
Tabela 8: Matriz do delineamento e respostas obtidas na extração do 2,3-BDO em SAB constituído de PEG 4000-sulfato e PEG 6000-sulfato.	44
Tabela 9: Matriz do delineamento e respostas obtidas na extração do 2,3-BDO em SAB constituído de PEG 4000-fosafato e PEG 6000-fosfato.	48
Tabela 10: Modelos obtidos para a recuperação e coeficiente de partição do 2,3-BDO nos diferentes SAB's estudados.	51
Tabela 11: SAB's utilizados no teste de Tukey para análise da influência do tipo de sal sobre K e YT %.....	52
Tabela 12: Características das membranas utilizadas nos ensaios de permeação.	58
Tabela 13: Rejeição observada (R_{obs} %) nas membranas UH004 e NP010 para o PEG 4000 (30 g L^{-1}) nas diferentes pressões estudadas.....	67
Tabela 14: Rejeição observada (R_{obs}) nas membranas UH004 (5 bar), NP010 (9 bar) e BW30 (9 bar) para o 2,3-BDO (2 g L^{-1}).	69
Tabela 15: Comparativo da permeância e rejeição observada nas membranas UH004, NP010 e BW30 para o PEG 4000 (30 g L^{-1}) e 2,3-DBO (2 g L^{-1}).	70
Tabela 16: Rejeição observada nas membranas NP010 e BW30 na separação e concentração do 2,3-DBO extraído no SAB PEG 4000-fosfato.	70

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	OBJETIVO GERAL.....	15
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
1.3	ESTRUTURA DO DOCUMENTO.....	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1	CONCEITO E APLICAÇÕES DO 2,3-BUTANODIOL.....	18
2.2	PROCESSOS DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS.....	21
2.2.1	Sistemas aquosos bifásicos (SAB).....	24
2.2.2	Constituintes do SAB.....	30
2.2.3	Processos de separação por membranas.....	31
2.3	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	35
3	EXTRAÇÃO DO 2,3-BUTANODIOL EM SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO.....	36
3.1	MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
3.1.1	REAGENTES E SOLUÇÕES.....	36
3.1.2	Dados de equilíbrio de fase e definição da composição global dos sistemas aquosos bifásicos (SAB's).....	37
3.1.3	Procedimento experimental para extração do 2,3-BDO por sistema aquoso bifásico (SAB).....	37
3.1.4	Quantificação do 2,3-butanodiol.....	38
3.1.5	Desempenho da extração do 2,3-BDO no SAB.....	38
3.1.6	Análise estatística.....	38
3.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
3.3	CONSIDERAÇÕES PARCIAIS.....	56
4	SEPARAÇÃO DO 2,3-BUTANODIOL CONTIDO NO SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO.....	58
4.1	MATERIAIS E MÉTODOS.....	58
4.1.1	Reagentes e soluções.....	58
4.1.2	Membranas utilizadas.....	58
4.1.3	Aparato experimental.....	59
4.1.4	Estudo da rejeição das membranas ao PEG 4000.....	60
4.1.5	Quantificação do PEG 4000.....	61

4.1.6	Estudo da rejeição das membranas ao 2,3-butanodiol.....	61
4.1.7	Separação e concentração do 2,3-butanodiol a partir do sistema PEG 4000 fosfato.....	62
4.1.8	Determinação do <i>fouling</i>	64
4.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
4.2.1	Rejeição das membranas UH004 e NP010 ao PEG 4000.....	64
4.2.2	Rejeição das membranas UH004, NP010 e BW30 ao 2,3-BDO.....	68
4.2.3	Separação e concentração do 2,3-butanodiol contido na fase de topo do SAB.....	70
4.2.4	Recuperação do desempenho das membranas após permeação do SAB.....	73
4.3	CONSIDERAÇÕES PARCIAIS.....	74
5	CONCLUSÕES.....	75
	REFERÊNCIAS	77
	APÊNDICE A - Ensaios preliminares de extração em sistema aquoso bifásico em diferentes regiões dos diagramas de fase.....	84
	APÊNDICE B - Validação dos modelos do DCCR nos SABs constituídos por PEG 4000-sal.....	86
	APÊNDICE C - Tabelas da Análise de Variância (ANOVA) do DCCR para a recuperação e coeficiente de partição nos diferentes sistemas estudados, PEG-citrato, PEG-sulfato e PEG-fosfato.....	87
	APÊNDICE D - Comparação entre valores preditos pelos modelos e os valores observados experimentalmente.	90
	ANEXO A - Diagramas de equilíbrio	92

DIAGRAMA CONCEITUAL

EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE 2,3-BUTANODIOL UTILIZANDO SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS E PROCESSOS DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS

Por quê?

- 2,3-butanodiol é um precursor de inúmeros compostos e produtos para indústria de alimentos, química e farmacêutica, tais como biopolímeros e aromas.
- Dificuldades na extração e purificação de 2,3-BDO de meios complexos.
- Não existem estudos que associem a extração do 2,3-butanodiol em SAB e a concentração e purificação por processos de separação por membranas.

Hipóteses

- É possível recuperar o 2,3-butanodiol com eficácia utilizando SAB constituído por PEG e sal?
- É possível purificar e concentrar com eficiência o 2,3-butanodiol contido no SAB através dos processos de separação por membranas?

O que está sendo feito?

- Estudos relacionados à extração líquido-líquido, entre eles o SAB formado por álcoois-sais e a extração por solventes como o n-butanol.
- Estudos de concentração e purificação por membranas de pervaporação, eletrodialise, nanofiltração e osmose.

Métodos experimentais

- Ensaios de extração por SAB em diferentes condições para avaliar o efeito das variáveis de processo na recuperação e purificação do 2,3-BDO de soluções modelo.
- Análise da rejeição do 2,3-BDO por diferentes membranas de NF e OI.
- Experimentos de permeação da fase contendo melhor recuperação e concentração do 2,3-BDO.

Respostas

- SAB constituído por PEG e sal é eficaz na recuperação e partição do 2,3-BDO.
- Conhecimento sobre os fatores do SAB que contribuem para a recuperação e partição do 2,3-BDO.
- Processo de separação por membrana capaz de concentrar e purificar de forma eficiente o 2,3-BDO contido no SAB.

1 INTRODUÇÃO

O 2,3-butanodiol (2,3-BDO) pode ser sintetizado por via química, a partir de derivados do petróleo, ou por via biotecnológica, na qual a biomassa é a matéria prima. Atualmente, o interesse em produzir o 2,3-BDO utilizando resíduos da agroindústria e biomassa florestal é crescente, pois este diol é um precursor de inúmeros compostos e produtos para indústria de alimentos, química e farmacêutica (YANG et al., 2015). Quantidades significativas de 2,3-BDO podem ser obtidas de substratos alternativos como os resíduos da agroindústria, entre eles o melaço gerado na etapa de cristalização da sacarose da cana de açúcar, o hidrolisado de bagaço de maçã, o hidrolisado de algas marinhas, o glicerol bruto, a biomassa lignocelulósica derivada de bagaço e palha da cana-de-açúcar e o hidrolisado de fibra de milho (sabugo) (JI; HUANG; OUYANG, 2011a; LIAKOU et al., 2018).

Um dos interesses comerciais do 2,3-BDO na indústria de alimentos é sua utilização como aroma. Por meio de sua desidrogenação catalítica, se produz dois aromas com alto valor agregado, a acetoína e o diacetil. O diacetil é utilizado como ingrediente em formulações de baunilha, caramelo, manteiga e café, é também empregado em produtos de panificação, pudins e produtos lácteos (TIAN et al., 2016; XIAO; LU, 2014). Outro segmento de destaque da utilização do 2,3-BDO na indústria de alimentos é sua conversão em diésteres para síntese de polímeros termoplásticos (JI; HUANG; OUYANG, 2011a; KOUTINAS et al., 2016). O consumo de polímeros ao redor do mundo aumenta numa taxa anual de 5% e a indústria de alimentos é uma das grandes consumidoras de embalagens plásticas. Com as pressões ambientais crescentes, o setor busca alternativas para substituir o 2,3-butanodiol obtido na indústria petroquímica por matérias primas de fontes renováveis. Os biopolímeros sintetizados a partir de biomassa da própria indústria de alimentos surgem como uma alternativa para atender a demanda desse setor (DAHIYA et al., 2018; DUDEFOI et al., 2017; KARAN et al., 2019; REDDY et al., 2013; ZHANG et al., 2017).

Pesquisas relacionadas à síntese de 2,3-BDO utilizando diferentes microrganismos estão avançadas. No entanto, a extração e purificação do bioproduto ainda são fatores que limitam sua disponibilidade e produção em larga escala. O caldo da fermentação do 2,3-DBO é uma mistura complexa de proteínas, sais, e outros nutrientes. Além disso, os bioprodutos de interesse estão em baixas concentrações, e esses fatores dificultam as etapas de extração e purificação (DA SILVA; DE LIMA; CONTIERO, 2015). Várias técnicas de processo *dowstream* do 2,3-BDO foram estudadas nos últimos anos, entre elas a destilação, as

tecnologias por membranas como a pervaporação, nanofiltração e a osmose inversa, e também tecnologias de extração como extração por solvente, extração *salting-out* e sistema aquoso bifásico (HONG et al., 2019). A destilação ainda é o principal método de separação empregado na obtenção 2,3-BDO. No entanto, este é um método com alta demanda energética, uma vez que a temperatura normal de ebulição do 2,3 BDO é elevada, 183 °C (BIRAJDAR et al., 2015).

A tecnologia de membranas é um processo consolidado, amplamente difundido na indústria, incluindo a química e a alimentícia. Entre as vantagens dessa tecnologia está a menor demanda energética quando comparada aos processos que empregam calor como a destilação. As principais limitações do uso de membranas no fracionamento do 2,3-BDO estão associados às perdas de desempenho do processo, e à complexidade do meio de fermentação, que possui quantidades significativas de proteínas e polissacarídeos que levam à rápida formação de *fouling* nas membranas (SÁNCHEZ-RAMÍREZ et al., 2019). Uma forma de minimizar a rápida formação de *fouling* na purificação do 2,3-BDO é combinar a tecnologia de membranas com outras operações unitárias. O sistema aquoso bifásico (SAB), por exemplo, pode ser utilizado para remover parte das impurezas presentes no caldo fermentativo e para recuperar a molécula alvo.

A extração utilizando solventes orgânicos como o hexano e tolueno tem como desvantagem a toxicidade e a inflamabilidade. Os sistemas aquosos bifásicos (SAB's) são uma alternativa para reduzir esse problema, uma vez que podem ser constituídos por componentes não tóxicos ou que representam riscos ambientais significativamente menores que outros solventes orgânicos (LI et al., 2016; SÁNCHEZ-RAMÍREZ et al., 2019; XIU; ZENG, 2008). Outras vantagens do SAB são a simplicidade do processo e a flexibilidade de integração à outras operações unitárias, além da economia, pois alguns de seus constituintes como os sais e álcoois possuem baixo custo. O *scale-up* do SAB ainda é um desafio pois alguns fenômenos que regem a partição e recuperação de moléculas nesse sistema ainda não foram elucidados (PHONG et al., 2018). São poucos os trabalhos que utilizam essa tecnologia como etapa da purificação do 2,3-BDO, entre os SABs estudados, estão os constituídos por álcool-sal e álcool-glicose (DAI; LIU; XIU, 2015; DAI; ZHANG; XIU, 2011). Sistemas constituídos por polímero-sal não foram analisados para extração do 2,3-BDO.

Com base no exposto, a etapa de purificação do 2,3-BDO obtido por síntese biotecnológica é uma tarefa desafiadora devido a algumas de suas características físico-químicas e a complexidade do meio fermentado o que demanda diferentes operações unitárias para obter um produto com alto grau de pureza. Nesse contexto, pensando em tecnologias

menos onerosas e que não empreguem altas temperaturas, a hipótese desta pesquisa consistiu em avaliar se é possível extrair e purificar o 2,3-BDO com eficiência utilizando métodos combinados baseados em sistemas aquosos bifásicos constituídos de polímero-sal e o processo de separação com membranas. Até o momento não foram encontrados estudos sobre o *downstream* do 2,3-BDO utilizando essas duas operações unitárias.

1.1 OBJETIVO GERAL

Utilizar o sistema aquoso bifásico associado à tecnologia de separação por membranas na extração e purificação do 2,3-butanodiol.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar a influência do tipo de sal formador de sistema aquoso bifásico e de sua concentração sobre a partição e a recuperação do 2,3-butanodiol.
- Estudar a influência da concentração do polietileno glicol (PEG) e de sua massa molar sobre a partição e a recuperação do 2,3-butanodiol.
- Analisar a influência do tempo de agitação do SAB sobre o coeficiente de partição e a recuperação.
- Analisar o desempenho das membranas UH004 e NP010 na separação do 2,3-BDO extraído no SAB.
- Analisar o desempenho da membrana de osmose inversa BW30 na concentração do 2,3-BDO extraído no SAB.

1.3 ESTRUTURA DO DOCUMENTO

Esse documento está organizado na forma de capítulos. O Capítulo 2 apresenta a revisão bibliográfica dos pontos relevantes ao tema e abordagem de estudos disponíveis na literatura relevantes a esse trabalho. O Capítulo 3 descreve o processo de extração do 2,3-butanodiol em SAB constituído por polietileno glicol (PEG) e diferentes sais. Foram estudados os fatores do SAB que contribuiriam para recuperação e partição da molécula de interesse. O Capítulo 4 aborda a separação e concentração do 2,3-BDO extraído no SAB por meio do

processo de separação por membranas, para essa etapa foram estudadas membranas comerciais de ultrafiltração, nanofiltração e osmose inversa.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CONCEITO E APLICAÇÕES DO 2,3-BUTANODIOL

O 2,3-butanodiol (2,3-BDO) é um composto orgânico que ocorre naturalmente e em pequenas quantidades em tecidos vegetais. Pesquisas recentes têm evidenciado que esse composto seria responsável por aumentar a tolerância de plantas ao stress térmico e hídrico, dois fatores que limitam seu crescimento (SHI et al., 2018). Entretanto, a forma que o 2,3-BDO interfere no desenvolvimento da planta ainda não é compreendido (SHI et al., 2018). O entendimento desses efeitos fisiológicos nos vegetais pode fazer do 2,3-BDO uma interessante alternativa para conservação de frutas e vegetais por meio no uso em biofilmes ou embalagens para atmosfera modificada, por exemplo.

O 2,3-BDO utilizado na indústria pode ser obtido por síntese química ou biotecnológica, e uma das principais vertentes da sua utilização na indústria de alimentos é sua conversão em diéster para síntese de polímeros termoplásticos (JI et al., 2011; KOUTINAS et al., 2016). Alguns dióis têm sido parcialmente utilizados na produção de biopolímero. O 1,4-butanodiol, por exemplo, é comercializado como bio-BDO e é obtido de recurso natural renovável, o amido de milho (DA SILVA; DE LIMA; CONTIERO, 2015). Em 2015, uma das grandes empresas do ramo da Engenharia Química, a Genomatica localizada em San Diego, Califórnia fez parcerias para acelerar a produção em larga escala de butanodiol a partir de biomassa. O 1,4-BDO da Genomatica recebe o nome comercial de GENO BDO™. Em 2016, a Novamont, líder na produção de biopolímero, inaugurou na Itália uma planta com capacidade de produzir anualmente 30.000 toneladas do GENO BDO™ (Genomatica, 2017).

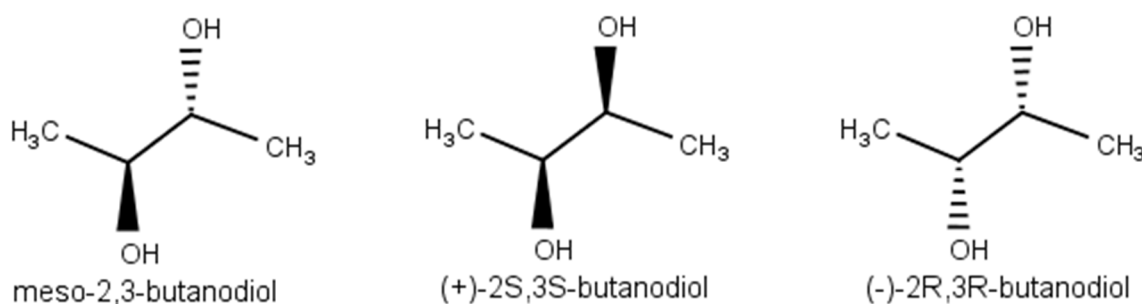
O 1,3-propanodiol é outro componente de interesse para indústria de embalagens e as pesquisas tanto para síntese quanto para a purificação desse diol estão mais avançadas. A DuPont Tate & Lyle Bio Products já sintetiza biopolímeros utilizando 1,3-propanodiol obtido de biomassa. Sua denominação comercial é Bio-PDO™, e a fábrica, em Loudon, Tennessee (EUA) é uma das primeiras a produzir 1,3-PDO em escala comercial utilizando fontes renováveis (DA SILVA; DE LIMA; CONTIERO, 2015)

Em alimentos industrializados, o 2,3-BDO é coproduto de processos fermentativos. Nos vinhos, por exemplo, esse composto é o segundo componente mais abundante, contribuindo para as características sensoriais da bebida, como viscosidade, aroma e sabor. Esse diol é também um importante precursor de aromas, principalmente para a indústria de laticínios. Sua desidrogenação catalítica produz dois aromas de alto valor agregado, a acetoína e o diacetil (XIAO; LU, 2014; TIAN et al., 2016).

Em experimentos realizados *in vitro*, utilizando meios sintéticos com adição de diacetil, foi observado o efeito antimicrobiano desse componente sobre algumas bactérias patogênicas. Concentrações de 50 ppm dificultaram o crescimento da *Escherichia coli* O157:H7 e *Salmonella typhimurium*. Alguns estudos sugerem que o mecanismo de inibição do diacetil em bactérias gram-negativas baseia-se na reação entre esse composto e as proteínas periplasmáticas que se ligam à arginina, interferindo assim no metabolismo desse aminoácido que é responsável pela síntese de moléculas importantes (CORSETTI; PERPETUINI; TOFALO, 2015; LANCIOTTI et al., 2003).

A fórmula química do 2,3-BDO é $C_4H_{10}O_2$, trata-se de um diálcool, com duas hidroxilas ligadas à cadeia carbônica. Esse composto possui três estereoisômeros diferentes: 2R-3R-BDO, 2S-3S-BDO e a forma meso-2,3-BDO (Figura 1). As propriedades físicas desses isômeros como densidade, solubilidade e temperatura de ebulição são semelhantes (HAZEENA et al., 2019a; LIAKOU et al., 2018a).

Figura 1: Estereoisômeros do 2,3-butanodiol.



Fonte: Adaptado de Ji; Huang; Ouyang (2011).

A Tabela 1 exhibe algumas propriedades físicas e químicas do 2,3-BDO utilizado neste trabalho.

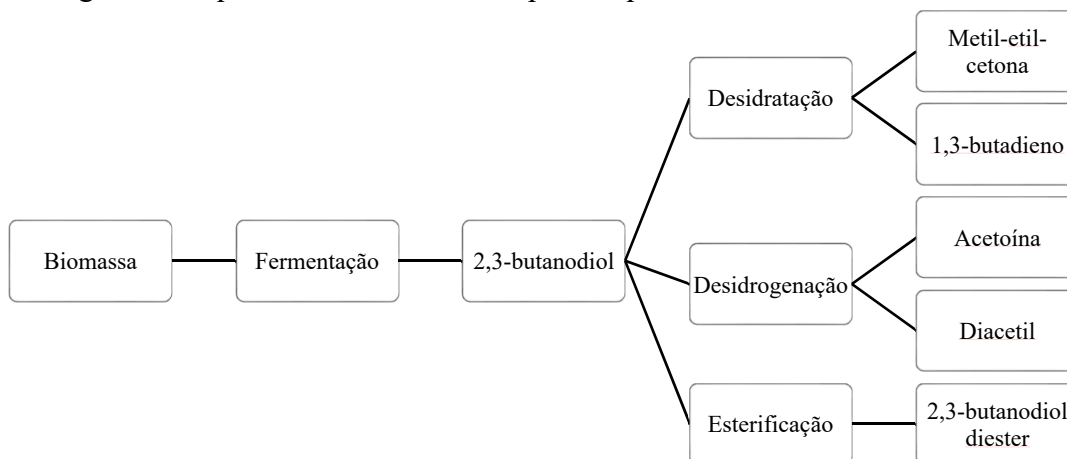
Tabela 1: Dados sobre propriedades físicas e químicas do 2,3-BDO.

Massa molar	90,12 g/mol
pKa	14,9 a 25 °C
Ponto de ebulição	183 °C
Densidade	1,002 g/cm ³ .
Hidrossolubilidade	Solúvel

Fonte: Sigma-Aldrich.

O grande interesse na produção de 2,3-BDO está na sua versatilidade não só para a indústria de alimentos, mas também para a indústria química e farmacêutica (Figura 2). Esse composto pode ser utilizado como agente anticongelante (o isômero (+)-2S,3S-butanodiol tem baixo ponto de fusão -60 °C). Além disso, pode ser empregado como aditivo de combustível quando convertido em metil-etil-cetona (butanona). Outros processos de conversão resultam no 1,3-butadieno, usado na produção de borracha sintética. O 2,3-BDO também é um precursor de espuma de poliuretano que é utilizada em produtos da indústria farmacêutica e de cosméticos, loções e antitranspirantes (MAINA et al., 2019b).

Figura 2: Esquema da síntese de compostos químicos derivados do 2,3-butanodiol.



Fonte: Adaptado de Girardi (2014).

Além da sua ampla aplicação, o potencial de síntese de 2,3-BDO por via microbiológica tem despertado a atenção dos pesquisadores, uma vez que pode ser obtido de diferentes fontes de carbono, pentoses (C5), hexoses (C6) e sacarose (KOUTINAS et al., 2016).

O BDO é atualmente produzido por processos petroquímicos com um preço de mercado relativamente alto de US\$ 1.600 por tonelada. A produção de BDO via fermentação pode ser um processo alternativo com menos impactos ambientais (MAINA et al., 2019b). O

Brasil tem posição estratégica dentro desse contexto, pois possui biomassa em abundância gerados pela agroindústria, como o bagaço e a palha de cana de açúcar, que representam 60 % em peso da produção total anual de cana de açúcar. Outros exemplos de biomassa vegetal são o sabugo e folhas de milho, as palhas de arroz e sorgo e a casca de aveia (CAMARGO, 2017).

Dentro deste cenário as biorrefinarias têm um papel essencial, uma vez que por meio de investimentos em pesquisa e desenvolvimento tem sido possível integrar processos de conversão de biomassa em biocombustíveis e insumos químicos, ou seja, agregar valor as cadeias produtivas e reduzir os impactos ambientais (CHATZIFRAGKOU et al., 2014; KOUTINAS et al., 2014).

2.1.1 Produção fermentativa de 2,3-butanodiol

O butanodiol é uma importante commodity produzida numa escala de 2,5 milhões de toneladas anuais para síntese de plásticos, poliéster e outros produtos já citados. Para substituir o BDO derivado de petróleo, um volume considerável de pesquisas utilizando organismos geneticamente modificados está em andamento (LEE; LEE, 2016).

A modificação genética de diferentes cepas bacterianas e leveduras tem permitido produzir 2,3-BDO com boa produtividade, alguns exemplos estudados são a *Klebsiella oxycorre*, *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus polymyxa* e a *Saccharomyces cerevisiae* (CELIŃSKA; GRAJEK, 2009; JI; HUANG; OUYANG, 2011b). A Tabela 2 apresenta uma contextualização dos estudos de produção fermentativa de 2,3-BDO, nos quais são abordados os biorreatores utilizados na fermentação, as cepas geneticamente modificadas, o meio de fermentação utilizado e quantidade de 2,3-BDO produzido.

Tabela 2: Estudos sobre síntese biotecnológica de 2,3-BDO utilizando diferentes meios de fermentação e microrganismos para sua produção.

Tipo de Fermentação	Microrganismo	Meio de fermentação	Concentração 2,3BDO (g/L)	Produtividade 2,3BDO(g/L/h)	Referência
Fermentação em batelada, aeróbia	<i>E. aerogenes</i> SUMI02	sintético (glicose)	38,24	0,80	Thapa et al. (2019)
Fermentação em batelada	<i>Enterobacter cloacae</i> sp.SG1	biomassa da produção de óleo de palma	30,74	0,32	Hazeena et al. (2019)
Fermentação em batelada, aeróbia	<i>B. amyloliquefaciens</i> 18 025	açúcar bruto (VHP)	127,30	1,04	Maina et al., (2019a)
Fermentação aeróbia	<i>Paenibacillus brasiliensis</i> PB24	sintético (glicose)	27,00	0,38	Dias et al. (2018)
Fermentação contínua, aeróbia	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	palha de milho	18,80	1,13	Ma et al. (2018)
Fermentação em batelada	<i>Enterobacter ludwigii</i> FMCC 204	maçã e pêra	50,00	0,41	Liakou et al. (2018)
Fermentação em batelada alimentada, aeróbia	<i>S. cerevisiae</i> BD4	Sintético (glicose)	96,20	0,39	Kim et al. (2013)
Fermentação em batelada	<i>E. aerogenes</i> KCTC 2190, EMY-68	Melaço de cana	28,88	2,89	Jung et al. (2013)
Fermentação e batelada	<i>Serratia marcescens</i> H30	Sacarose	139,92	3,49	Zhang et al., (2010)

Fonte: Elaborada pelo autor deste trabalho (2020)

Notas:VHP - *Very High Polarization*

Um dos desafios atuais da síntese biotecnológica do 2,3-BDO é se obter bons rendimentos utilizando microrganismos não patogênicos, o que tornaria o processo de fermentação mais barato e menos complexo. Como ilustrado na Tabela 2, a maior parte dos estudos na área envolvem cepas de microrganismos patogênicos como da *Enterobacter*. Quando se compara as concentrações máximas de 2,3-BDO obtidas com cepas patogênicas (acima de 139,9 g/L), os valores são significativamente mais altos que aqueles utilizando as não patogênicas (ZHANG et al., 2010). O uso de cepas patogênicas dificulta o processo de fermentação em escala industrial devido às rígidas normas de segurança e aos crescentes custos do processo (MA et al., 2018b; MAINA et al., 2019a; ZHANG et al., 2010).

A produção de 2,3-butanodiol com cepas não patogênicas deve ser melhorada para que essas sejam potenciais produtoras de 2,3-BDO na fermentação em larga escala. Maina et al. (2019a) estudou a espécie *B. amyloliquefaciens*, geralmente reconhecida como segura (GRAS), e obteve concentração e produtividades de 2,3-BDO equiparáveis aos resultados obtidos com cepas patogênicas 127,30 g/L. Concentrações expressivas de 2,3-BDO também foram alcançadas por Dias et al. (2018) ao trabalhar com *Paenibacillus brasilensis* e por Kim et al. (2013) que desenvolveram uma linhagem de *S. cerevisiae* *BD4* e aumentaram a concentração de 2,3-BDO na fermentação.

O processo de fermentação para a produção de 2,3-BDO gera um meio complexo com sais, células microbianas, proteínas, polissacarídeos, além de subprodutos da fermentação como etanol, ácido butírico, acético e lático, o que torna a purificação em grande escala uma etapa onerosa. Além do meio de fermentação complexo, a alta hidrofiliabilidade do 2,3-BDO, e seu elevado ponto de ebulição dificultam o processo de purificação e concentração (*downstream process*) (DA SILVA; DE LIMA; CONTIERO, 2015).

2.2 PROCESSOS DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS

A conversão de biomassa para obtenção de insumos químicos como o 2,3-BDO exige uma série de operações unitárias, por isso o processo *downstream*, relacionado à separação e purificação, tem um custo significativo na obtenção do produto. Várias técnicas de processo *dowstream* do 2,3-BDO foram estudadas nos últimos anos, entre elas a destilação, as tecnologias por membranas, pervaporação, a nanofiltração e a osmose inversa, e também as tecnologias de extração, entre elas a extração por solvente, extração *salting-out* e sistema aquoso bifásico (HONG et al., 2019).

A Tabela 3 mostra alguns estudos desenvolvidos nos últimos anos para extração e purificação do 2,3-BDO de meios fermentados. Detalhes sobre os estudos serão apresentados separadamente.

A destilação não é um processo vantajoso na etapa *downstream* do 2,3-BDO pois sua temperatura de ebulição é maior que a da água (183 °C), logo há uma alta demanda energética para remover o excesso de água presente nos meios fermentados (BIRAJDAR et al., 2015). Como alternativa, diferentes operações unitárias têm sido propostas para o *downstream* do 2,3-BDO, entre os processos mais pesquisados está a extração líquido-líquido. Quanto à tecnologia de membranas, são poucos os estudos que utilizam esse processo para a separação ou purificação do 2,3-BDO, sendo as membranas comerciais e membranas comerciais modificadas, as mais empregadas para esse fim. Davey et al., (2016) utilizaram membranas comerciais de nanofiltração e osmose para purificar e concentrar o 2,3-BDO de um caldo fermentado e observaram a rápida formação de *fouling*, decorrente das características da alimentação, como alta viscosidade e presença de muitos sólidos solúveis. Na Tabela 3, observa-se que alguns estudos abordam a extração líquido-líquido convencional, que utiliza solventes como n-butanol, mas a maior parte analisa a extração do 2,3-BDO por SAB constituído por álcool-sais e em alguns casos por álcool-glicose. Não foram encontrados estudos que utilizam sistemas constituídos por PEG-sal na extração do 2,3-BDO. O SAB tem sido relatado por diferentes autores como um processo eficiente na recuperação do 2,3-BDO de meios fermentados (DAI; ZHANG; XIU, 2011; LI; TENG; XIU, 2010, 2011).

Tabela 3: Estudos sobre *downstream* do 2,3 BDO produzido a partir de biomassa, utilizando diferentes operações unitárias como proposta para sua extração, concentração e/ou purificação.

Fonte:	Método de extração/purificação	Alimentação	Concentração 2,3-BDO (g/L)	Recuperação (%)	Referência
	Membranas de nanofiltração e osmose inversa	Caldo de fermentação	3,34	94,6	Davey et al. (2016)
	Extração líquido-líquido contínua em contracorrente (<i>n</i> -butanol)	Caldo de fermentação	3,5 %m/m	58	Birajdaret al. (2015)
	Extração <i>Sugaring-out</i> (t-butanol/glicose /água)	Caldo de fermentação a partir de glicose	60,3	75,60	Dai; Liu; Xiu (2015)
	Extração <i>salting-out</i> (K ₂ HPO ₄ /etanol)	Caldo de fermentação da alcachofra de Jerusalém	65	97	Dai; Zhang; Xiu, (2011)
	Sistema aquoso bifásico, etanol-sulfato de amônio	Caldo de fermentação a partir de glicose	42,24	91,7	Li; Teng; Xiu, (2010)
	Pervaporação membrana PDMS (ZSM-5)	Meio sintético	5 %m/m	62,8	Shao; Kumar, (2009b)
	Eletrodialise	Caldo de fermentação	20	70	Gong et al. (2004)

Elaborada pelo autor deste trabalho (2020)

2.2.1 Sistemas aquosos bifásicos (SAB)

A extração líquido-líquido é uma operação unitária na qual a força motriz é a transferência de massa. Trata-se de uma operação em que um composto presente em uma fase líquida é transferido para um solvente de extração, resultando em duas fases, uma enriquecida (extrato) com o componente a ser separado e outra pobre (refinado). Para obter uma extração eficiente, é preciso avaliar uma série de fatores que influenciam esse processo. Na escolha do solvente é importante considerar alguns aspectos como a seletividade, miscibilidade, densidade, viscosidade, estabilidade térmica e química (TADINI et al., 2015).

Pesquisas sobre processo *downstream* do 2,3-BDO estão utilizando as extrações líquido-líquido tradicionais (extração por solvente à quente ou à frio) e as não convencionais (extração assistida por ultrassom e por micro-ondas). A extração utilizando solventes orgânicos, hexano e tolueno tem como desvantagem a toxicidade e a inflamabilidade. Os sistemas aquosos bifásicos (SAB's) são uma alternativa para reduzir esse problema, uma vez que podem ser constituídos por componentes que representam riscos ambientais significativamente menores que outros solventes orgânicos (LI et al., 2016; SÁNCHEZ-RAMÍREZ et al., 2019; XIU; ZENG, 2008).

Um sistema aquoso bifásico (SAB) é uma extração líquido-líquido, sendo formado quando dois componentes hidrossolúveis são misturados acima de determinadas concentrações críticas, resultando em duas fases imiscíveis em equilíbrio termodinâmico. As fases possuem propriedades intensivas diferentes como composição, densidade e índice de refração (SAMPAIO, 2016; SHIBATA; IWASHITA; SHIRAKI, 2019). O coeficiente de partição da molécula alvo no SAB depende das propriedades físico-químicas da molécula de interesse, como a hidrofobicidade, a massa molar e a carga de superfície da molécula. As variáveis do processo também interferem na partição, e é importante considerar a escolha dos constituintes do sistema e suas concentrações, a razão de volume do sistema (V_R), o pH e a temperatura (PHONG et al., 2018; RUIZ-RUIZ et al., 2012).

A formação dos sistemas aquosos bifásicos foi observada primeiramente por Martinus Beijerinck em 1896. O autor observou que ao misturar soluções aquosas de gelatina com ágar ou amido solúvel ocorria a separação espontânea e a formação de duas fases líquidas. Porém, apenas em meados de 1950 é que o potencial tecnológico do SAB começou a ser explorado; o pesquisador Per-Ake Albertsson constatou que ao misturar polímeros, polietileno glicol (PEG) e dextrana em meio aquoso também obtinha SAB capaz de purificar diferentes biomoléculas

como as proteínas. Desde então, diversos constituintes vêm sendo estudados pelo meio científico para obter SABs mais seletivos e eficientes para separar diferentes produtos, por exemplo, biomoléculas, íons metálicos, antibióticos e corantes naturais (CAI et al., 2019; PHONG et al., 2018; SHUKLA; PANDEY; PANDEY, 2018).

Os SABs podem ser classificados em sete grupos distintos de acordo com os constituintes que formam as fases do sistema. Essas combinações de constituintes conferem ao SAB características diferentes. A Tabela 4 apresenta alguns exemplos de tipos de SAB (LIMA; SANTANA, 2017).

Tabela 4: Exemplos de constituintes de sistemas aquosos bifásicos.

Grupo	Constituinte 1	Constituinte 2
Polímero – Polímero	Dextrana	Dextrana
	Dextrana	PEG
	PEG	PVA
Polímero – Sal	PEG	Fosfato
	PPG	Sulfato
	PVA	Fosfato
Solvente Orgânico – Sal	Álcool	Carbonato de sódio
	Acetonitrila	Fosfato
Líquidos iônicos – Sais	Imidazólios	Fosfato
	Amônios	Fosfato
	Fosfônios	Fosfato
Líquidos iônicos – Aminoácidos	Imidazólios	Prolina
	Imidazólios	Fenilalanina
Líquidos iônicos – Polímeros	Imidazólios	PEG
	Imidazólios	PVP

Fonte: Adaptado de Lima; Santana, (2017)

Sistemas polímero-polímero, por exemplo PEG-dextrana, têm uma boa eficiência para recuperação e purificação de componentes. Entretanto, o custo de polímeros como a dextrana é elevado, e sua utilização em escala industrial só é viável quando o soluto de interesse tem uma boa cotação no mercado. Além disso, a alta viscosidade desses sistemas dificulta a transferência de massa (BUARQUE et al., 2019).

Os SABs PEG-sais começaram a ser estudados para minimizar problemas de custo dos sistemas polímero-polímero. Além disso, esses sistemas têm outras vantagens, possuem baixa viscosidade e rápida separação de fases devido às diferenças consideráveis na densidade dos constituintes. Uma das limitações dos SABs PEG-sais é a desnaturação de biomoléculas devido

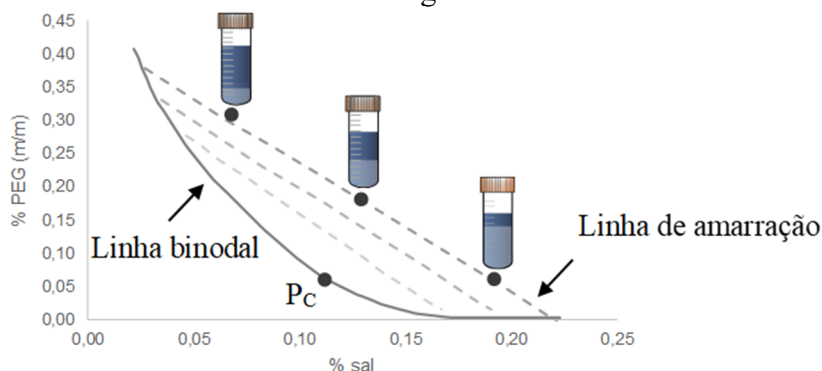
às altas concentrações de sais (3 mol L^{-1}) necessárias para formar o sistema (YANG et al., 2019).

Sistemas solvente orgânico-sais foram bastante explorados nos últimos anos para extração/purificação do 2,3-BDO. Algumas vantagens do sistema álcool/sais são a baixa viscosidade, alta polaridade e facilidade de recuperar o solvente orgânico por evaporação (BUARQUE et al., 2019; HUANG et al., 2019). A falta de especificidade dos SABs ainda é considerada uma desvantagem, pois mesmo sendo possível manipular alguns parâmetros físico-químicos do sistema para melhorar a extração do produto de interesse, etapas subsequentes para purificação são necessárias. (PHONG et al., 2018)

Pensando em melhorar a especificidade, pesquisas mais recentes passaram a utilizar os líquidos iônicos (LIs) como um dos constituintes do sistema. A colina é um exemplo de sal de amônio quaternário usado na síntese de LIs e com grande aplicação em estudos que utilizam o SABs para recuperação de biomoléculas. Entre as desvantagem de se trabalhar com líquidos iônicos, estão os elevados custos para a síntese desses compostos; logo, o uso de sistemas polímero-sal tornam-se economicamente mais vantajosos (RUIZ-RUIZ et al., 2012).

São as interações intermoleculares entre os constituintes do sistema que governam a formação das fases, interferindo em propriedades físico-químicas do SAB, por exemplo, na relação de volume entre as fases. Estas interações estão relacionadas à variação da energia de Gibbs e podem ser representadas pelos diagramas de equilíbrio de fases (GRILO; AIRES-BARROS; AZEVEDO, 2016). Nos diagramas de equilíbrio de fases é possível prever as fases em equilíbrio, sendo a representação gráfica da composição global dos constituintes do sistema em temperatura e pressão definidas. O diagrama da Figura 3 apresenta a ilustração de um sistema polímero-sal.

Figura 3: Exemplo de diagrama de fase de um sistemas aquosos bifásicos, expresso em coordenadas retangulares.



Fonte: Adaptado de Diederick et al., (2013)

No diagrama temos uma série de informações importantes para compreender o processo de extração, a representação da composição global do sistema é expressa em porcentagem massa/massa (% m/m). As composições globais da região monofásica e bifásica são separadas pela linha binodal, uma curva de solubilidade limitante. Os métodos mais usuais para sua obtenção são a titulação turbidimétrica e a análise da composição das fases. O ponto crítico, representado por (P_c) é o ponto da binodal no qual as propriedades físico-químicas das duas fases como volume e as composições são teoricamente iguais (ASENJO; ANDREWS, 2011).

As linhas pontilhadas são denominadas linhas de amarração. Elas descrevem a composição de duas fases em equilíbrio, ligam dois conjuntos de pontos sobre a linha binodal. As fases são regiões homogêneas química e fisicamente e qualquer conjunto de pontos sobre a mesma linha de amarração forma um sistema no qual as fases de topo ou de fundo têm propriedades intensivas iguais (concentração e massa específica), mas propriedades extensivas diferentes (massa e volume das fases) (ASENJO; ANDREWS, 2011; GRILO; AIRES-BARROS; AZEVEDO, 2016).

Através do comprimento de uma linha de amarração (TLL), é possível medir as diferenças das propriedades intensivas de duas fases em equilíbrio. Quanto maior o comprimento da linha de amarração, maiores serão estas diferenças, logo a partição de moléculas será favorecida para uma das fases do SAB (ASENJO; ANDREWS, 2011).

O cálculo do comprimento da linha de amarração é dado pela Equação 1:

$$TLL (\%) = \sqrt{(W_{s,1} - W_{i,1})^2 + (W_{s,2} - W_{i,2})^2} \quad (1)$$

Sendo:

$W_{s,1} - W_{i,1}$ a diferença da concentração de polímero nas fases de topo e fundo

$W_{s,2} - W_{i,2}$ a diferença da concentração de sal nas fases de topo e fundo

A inclinação das linhas de amarração (STL) mostra que a composição das fases varia com mudanças em propriedades extensivas do sistema, como temperatura e massa molar do polímero. O seu cálculo é dado pela Equação 2:

$$STL = \frac{W_{s,1} - W_{i,1}}{W_{s,2} - W_{i,2}} \quad (2)$$

O coeficiente de partição (K) no SAB, não se limita à correlação com o comprimento da linha de amarração (TLL). Vários outros fatores estão relacionados a esse parâmetro termodinâmico. As características físico-químicas da molécula alvo são um exemplo, a carga de sua superfície, o tamanho, a conformação (estruturas secundária, terciária), a hidrofobicidade e o ponto isoelétrico contribuem para criar diferentes interações entre a molécula alvo e os constituintes do sistema (FU et al., 2019). Os mecanismos que regem a partição no SAB ainda não foram totalmente esclarecidos, mas sabe-se que os diferentes tipos de interações como forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e iônicas contribuem com este parâmetro termodinâmico (GRILO; AIRES-BARROS; AZEVEDO, 2016).

O coeficiente de partição é dado pela razão entre a concentração da molécula alvo nas fases de topo e de fundo do sistema, Equação 3 (LIMA; SANTANA, 2017):

$$K = \frac{C_T}{C_F} \quad (3)$$

Sendo:

C_T a concentração na fase de topo

C_F a concentração na fase de fundo

As linhas de amarração descrevem a composição de duas fases em equilíbrio. Sobre a mesma linha de amarração, o SAB possui propriedades termodinâmicas extensivas diferentes, por exemplo, o volume das fases de topo e fundo, que interfere na partição das moléculas. A razão de volume de um sistema (V_R) pode ser calculada por meio da Equação 4 (LIMA; SANTANA, 2017):

$$V_R = \frac{V_T}{V_F} \quad (4)$$

Sendo que:

V_T corresponde ao volume da fase de topo em L;

V_F corresponde ao volume na fase de fundo em L.

A recuperação do produto de interesse na fase de topo ($Y_T\%$) ou na fase de fundo ($Y_F\%$) é calculada de acordo com a Equação 5 (LIMA; SANTANA, 2017):

$$Y_{fase} (\%) = \frac{C_{fase} \times V_{fase}}{C_i \times V_i} \times 100 \quad (5)$$

Sendo que:

C_{fase} corresponde a concentração do composto de interesse em $g L^{-1}$ na fase de topo ou de fundo;

C_i corresponde a concentração do composto de interesse em $g L^{-1}$ no extrato inicial;

V_{fase} corresponde ao volume da fase de topo ou de fundo em L;

V_i corresponde ao volume de extrato adicionado L.

A concentração inicial de extrato no SAB pode ser expressa de acordo com a Equação (6):

$$C_i \times V_i = (C_T \times V_T) + (C_F \times V_F) \quad (6)$$

Rearranjando a equação (5) vemos a relação inversa que há entre o $Y_T\%$ e o K .

$$Y_T (\%) = \frac{C_T \times V_T}{(C_T \times V_T) + (C_F \times V_F)} \times 100 \quad (7)$$

Sabendo que $K = C_T/C_F$ e que $V_R = V_T/V_F$, temos que

$$Y_T (\%) = \frac{100}{1 + 1/(K \times V_R)} \quad (8)$$

A eficiência da extração ($BM\%$) pode ser calculada por meio da Equação 9 (LIMA; SANTANA, 2017):

$$BM (\%) = \frac{C_T \times V_T + C_F \times V_F}{C_i \times V_i} \times 100 \quad (9)$$

Sendo que:

C_T corresponde a concentração do composto de interesse em $g L^{-1}$ na fase de topo;

C_F corresponde a concentração do composto de interesse em $g L^{-1}$ na fase de fundo;

C_i corresponde a concentração do composto de interesse em $g L^{-1}$ no extrato;

V_T corresponde ao volume da fase de topo em L;

V_F corresponde ao volume da fase de fundo em L.

V_i corresponde ao volume de extrato adicionado em L;

As variáveis relativas ao SAB, como tipo e concentração dos constituintes, pH, temperatura e massa molar do polímero têm sido o foco de vários estudos de extração, pois é possível manipulá-las e fazer um estudo estatístico de forma a se obter a melhor eficiência no processo (PHONG et al., 2018).

2.2.2 Constituintes do SAB

O polietilenoglicol (PEG) é um polímero sintético obtido da reação de polimerização de óxido de etileno. Este pode ser encontrado na forma líquida ou na forma sólida, dependendo da sua massa molar. O PEG tem uma ampla aplicação na indústria de alimentos, química e biomédica. Entre os fatores que o torna versátil, está sua estabilidade no ambiente, pressão de vapor desprezível e não libera compostos orgânicos voláteis (VOC's), sendo os riscos ambientais significativamente menores que de outros solventes orgânicos. Além disso, possui boa estabilidade em meio básico e ácido, é solúvel em solventes polares e apolares e insolúvel em solventes alifáticos e CO₂ supercrítico (VAFEEZADEH; HASHEMI, 2015).

A utilização de PEG em sistemas aquosos bifásicos para extração ou purificação de diferentes compostos, biomoléculas e íons metálicos, é um entre os vários empregos deste polímero. Na literatura os trabalhos que utilizaram sistemas PEG-sal evidenciam que este polímero contribui de diferentes formas para a partição do produto de interesse. O efeito da massa molar do PEG na partição do produto de interesse pode ser atribuído à redução do volume de solvente disponível no meio e conseqüentemente diminuição da solubilidade do produto nessa fase. O efeito de volume de exclusão do PEG depende da massa molar do produto sendo este relatado em estudos com proteínas. Ainda, o aumento da concentração de PEG afeta a viscosidade da fase o que pode influenciar a partição do produto (ASENJO; ANDREWS, 2011; GHAFARI et al., 2019).

Os sais inorgânicos em meio aquoso sofrem a dissociação iônica. Essa solvatação tem efeito sobre as propriedades da solução, alterando sua viscosidade, estabilidade térmica e energias em termos de temperaturas e pressões necessárias para transição de fase.

A adição de sais no SAB favorece interações hidrofóbicas devido à diferença de potencial elétrico criado entre as fases. Diferentes íons possuem diferentes afinidades pelas fases do SAB o que interfere de forma distinta na partição do produto. De maneira geral, ânions com maior valência têm maior capacidade de hidratar as moléculas de água. O aumento da hidrofobicidade está relacionado à diminuição da quantidade de água ligada. Logo, como a quantidade de água necessária para dissolver os sais no sistema é alta, os solutos a serem particionados são apenas parcialmente hidratados e tendem a ficar na fase polimérica (ASENJO; ANDREWS, 2011; GAI; WAN; CAO, 2019; GHAFARI et al., 2019).

O pH pode interferir na força iônica do meio uma vez que a constante de equilíbrio de dissociação pode ser deslocada para a formação de íons, afetando a partição da molécula nas fases do SAB (TRINDADE et al., 2006). Neste trabalho foram utilizados três sais com diferentes poderes de solvatação para avaliar o efeito da densidade de carga na partição.

2.2.3 Processos de separação por membranas

As membranas sintéticas são barreiras seletivas empregadas há algumas décadas nas etapas de separação, concentração e purificação de produtos na indústria biotecnológica, farmacêutica, química e de alimentos. Entre as vantagens das técnicas que utilizam membranas, estão a maior seletividade e menor custo energético quando se compara aos processos térmicos (MULDER, 1996).

Uma das formas de classificação das membranas é quanto a sua morfologia, sendo dividida em dois grandes grupos, densas ou porosas. Membranas densas não possuem poros em sua estrutura, portanto a seletividade ocorre pela afinidade entre os componentes presentes na alimentação e o material da membrana, desse modo o mecanismo de transporte ocorre primeiramente pela sorção da molécula na superfície da membrana, seguido de difusão e posterior dessorção para a corrente de permeado. Nas membranas porosas, a convecção é o principal mecanismo de transporte, a separação ocorre pela relação entre o tamanho de poro da membrana e o tamanho das moléculas da corrente de alimentação (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006; MULDER, 1996).

Características da membrana como porosidade, tamanho de poros e a permeabilidade são parâmetros importantes na escolha de uma membrana para uma determinada aplicação de separação (MULDER, 1996). Para atender os diferentes objetivos da indústria, foram desenvolvidas membranas com diferentes características. Os processos que envolvem a

filtração de líquidos por exemplo, usualmente empregam a microfiltração (MF), a ultrafiltração (UF), a nanofiltração (NF) ou a osmose inversa (OI), esses processos têm como força motriz a diferença de pressão através da membrana (PORTER, 1990).

A separação nas membranas de UF se dá pela exclusão por tamanho, ou seja, é definida pelo tamanho do poro da membrana e o tamanho das partículas da solução, essa relação é denominada de massa molar de corte (MMC) e é expressa em Dalton (Da). Nessas membranas o mecanismo de transferência de massa que prevalece é a convecção (MULDER, 1996). Diferentes polímeros podem ser empregados na síntese das membranas de UF; o fluoreto de polivinilideno (PVDF) é um exemplo, ele confere a membrana uma característica hidrofóbica e boa resistência a pH mais básicos. Por outro lado, a polietersulfona dá à membrana uma característica hidrofílica e resistência a temperaturas acima de 125 °C (KUCERA, 2010). A ultrafiltração pode ser utilizada na indústria de alimentos para a recuperação e concentração das proteínas do soro do leite, clarificação de sucos de frutas e pasteurização a frio. Outras aplicações desse processo incluem o tratamento de águas residuais e utilização como pré-tratamento do processo de osmose inversa para redução e concentração de sólidos suspensos e moléculas orgânicas com grande massa molar (KUCERA, 2010; MULDER, 1996).

As membranas de nanofiltração possuem poros menores que as membranas de ultrafiltração. A separação na nanofiltração envolve diferentes fenômenos, nesse processo a rejeição é baseada no tamanho, carga da partícula e carga da membrana. Numa membrana NF que tem grupos carregados negativamente ligados ao polímero, sais como o sulfato, que também possui carga negativa, têm uma rejeição maior que sais de cálcio que possuem raio hidratado maior e carga positiva. Esse fenômeno de interação entre membrana e soluto em função das cargas e polaridade da partícula é denominado efeito de exclusão de Donnan (BAKER, 2007; KUCERA, 2010). Entre as diferentes aplicações da NF estão o tratamento de águas residuais, recuperação de produtos de menor peso molecular nas indústrias farmacêutica, têxtil e de alimentos. Como pré-tratamento da osmose inversa, a NF normalmente é usada para remoção da cor e redução da dureza da água (NATH; DAVE; PATEL, 2018).

Nas membranas de osmose inversa, que são densas, o mecanismo de transferência de massa que prevalece é a solubilização e difusão (lei de Fick), ou seja, ocorre a sorção da molécula na superfície da membrana, seguido de difusão e posterior desorção para a corrente de permeado. No geral, a seletividade das membranas de OI sofre interferência de alguns fatores como a carga do sal, íons multivalentes são mais retidos do que os monovalentes. A rejeição de solutos neutros geralmente aumenta com a massa molar ou diâmetro do soluto (KUCERA,

2010). Uma das aplicações mais conhecidas da osmose inversa é a dessalinização da água do mar. Atualmente, os sistemas de OI podem ser encontrados em uma ampla variedade de instalações: hospitais, refinarias, usinas de energia, indústrias de papel e celulose. A OI é bastante empregada como uma etapa de concentração, particularmente em indústrias de alimentos e indústria de laticínios (WENTEN; KHOIRUDDIN, 2016).

De um modo geral, os processos de separação por membranas, restringem total ou parcialmente o transporte de uma ou várias espécies químicas presentes na alimentação. A fase que atravessa a membrana é conhecida como permeado e a fase que permanece na alimentação, que contém os solutos (ou sólidos suspensos) se chama concentrado ou retido. O desempenho ou eficiência da membrana pode ser determinado por meio do fluxo e da seletividade. O fluxo de permeado (J) é definido como o volume de solução (V_p) que atravessa a membrana por unidade de área (A) e por unidade de tempo (t) ($L\ m^{-2}\ h^{-1}$) Equação 10 (MULDER, 1996).

$$J = \frac{V_p}{t \times A} \quad (10)$$

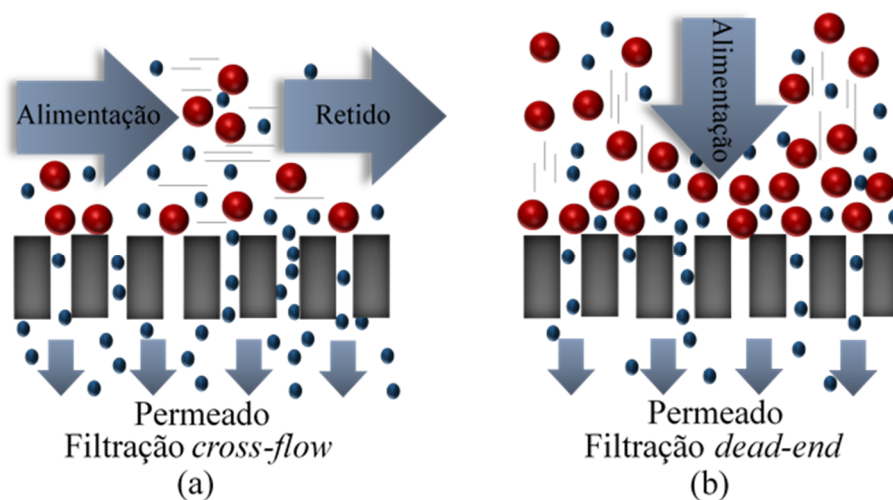
A seletividade é expressa pela rejeição observada (R_{obs}), Equação 11 (BAKER, 2007).

$$R_{obs} = 1 - \frac{C_p}{C_b} \quad (11)$$

Sendo, C_p a concentração do soluto no permeado e C_b a concentração do soluto na alimentação.

Os processos de separação por membrana podem ser classificados de acordo com o perfil de escoamento da alimentação que pode ser perpendicular (*dead-end*) ou tangencial (*cross-flow*). A filtração *dead-end* é um processo em batelada em que a solução esco perpendicularmente a superfície da membrana levando a um acúmulo mais rápido de material retido sobre sua superfície, favorecendo assim a formação da camada polarizada e *fouling*. Na filtração *cross-flow*, a alimentação esco tangencialmente à superfície da membrana, o soluto que tende a se depositar na superfície é arrastado devido à tensão cisalhante formada na superfície, fator que retarda a formação da polarização por concentração e *fouling* (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006; BAKER, 2012).

Figura 4: Esquema ilustrativo da filtração tipo *cross-flow* (a) e *dead-end* (b).



Fonte: Adaptado de Tsibranska; Tylkowski (2013)

O declínio no fluxo de permeado durante a filtração é resultado de diferentes fenômenos que criam resistências adicionais ao sistema e dificultam a permeação dos compostos presentes na corrente de alimentação, são eles a polarização por concentração, a formação da camada gel e a incrustação (*fouling*) (MULDER, 1996). A polarização por concentração ocorre devido ao acúmulo de soluto na superfície da membrana, conseqüentemente há uma redução no fluxo de permeado. A formação da camada gel ocorre quando a concentração de solutos na superfície da membrana excede seu limite de solubilidade no solvente, levando à precipitação de macromoléculas e à formação de uma resistência adicional ao fluxo de permeado. O *fouling* é um fenômeno irreversível e ocorre devido às interações físicas e químicas entre a alimentação e a membrana. Os diferentes tipos de incrustação irreversível são os depósitos inorgânicos (*scaling*), a adsorção de moléculas orgânicas na superfície ou interior dos poros da membrana, a deposição de partículas (coloidal) e o crescimento microbiano (*biofouling*) (BAKER, 2012).

Apesar de ser um processo consolidado, são poucos os estudos que utilizam os processos de separação por membranas na purificação do 2,3-BDO obtido por síntese biotecnológica. Recentemente, Davey et al. (2016) estudaram o uso de membranas comerciais de nanofiltração (NF270 e NF 90) e osmose inversa (BW30) para recuperação do 2,3-BDO. Boa rejeição foi obtida (NF 90 80,8 % e BW30 96%). Os autores concluíram que a NF e a OI podem substituir parcialmente o processo de destilação de compostos orgânicos de baixa volatilidade, proporcionando um menor consumo de energia. Porém, concentrações de 2,3-BDO acima de 20 g L⁻¹ inviabilizam o uso dessas membranas em decorrência das baixas

permeabilidades, além disso, os autores observaram rápida formação de *fouling* devido à viscosidade elevada do caldo de fermentação e a presença de sólidos solúveis resultaram em baixo fluxo de permeado, logo seria interessante utilizar previamente outra operação unitária para remover do caldo fermentativo macromoléculas e outras impurezas.

Gong et al. (2004) utilizaram membranas de eletrodialise para remoção de sais do meio fermentado contendo 1,3-propanodiol. Houve rápida formação de *fouling* devido à complexidade do meio fermentado, que contém proteínas e polissacarídeos em quantidades significativas. Logo, os processos de eletrodialise são mais adequados para serem aplicados nas etapas finais de purificação (*polishing steps*) do composto de interesse.

Shao & Kumar (2009a) avaliaram a técnica de pervaporação para a recuperação do 2,3-BDO. Membranas de polidimetilsiloxano (PDMS) foram modificadas com partículas de zeolita ZSM-5 (80 %m/m). Foi observado um incremento de 19,4 % na recuperação do 2,3-BDO em comparação com a membrana de PDMS sem a modificação. Os mesmos pesquisadores propuseram um método integrado de separação baseado na extração por solvente e pervaporação para recuperar o 2,3-BDO de uma mistura composta por água, 2,3-BDO e 1-butanol (SHAO; KUMAR, 2009b). Para a etapa de extração utilizou-se 1-butanol, na sequência foi realizada a desidratação da fase orgânica com membrana de quitosana/PVDF. O 2,3-BDO da fase orgânica desidratada foi posteriormente enriquecido utilizando uma membrana de polidimetilsiloxano (PDMS) que se mostrou eficaz na recuperação do 2,3-BDO na corrente do retido com pureza maior que 98 %. No que se refere ao uso de membranas no *downstream* do 2,3-BDO, é necessário estudos que proponham formas de minimizar problemas observados como o inchamento da membrana (*membrane swelling*) e a redução do seu desempenho ao longo do tempo devido à complexidade do caldo de fermentação (SÁNCHEZ-RAMÍREZ et al., 2019).

2.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento da produção biotecnológica de 2,3-BDO deve ser combinado com um processo de extração e purificação eficaz e competitivo, pois sua aplicação na indústria de alimentos e de biopolímeros exige alta pureza o que torna a etapa *downstream* um desafio devido à complexidade do meio fermentado e as propriedades físico-químicas do 2,3-BDO.

Com base no exposto, a separação do 2,3-BDO é uma tarefa desafiadora que requer diferentes operações unitárias para obter um produto com alto grau de pureza. Até o momento

não foram encontrados estudos sobre a extração por SAB combinada aos processos de separação por membranas na etapa *downstream* do 2,3-BDO. É fundamental a compreensão e elucidação dos mecanismos inerentes a esses processos para aprimoramento da extração e purificação do 2,3-BDO.

3 EXTRAÇÃO DO 2,3-BUTANODIOL EM SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO

Este capítulo apresenta uma análise da eficiência de extração do 2,3-butanodiol por meio de diferentes SAB's constituídos de PEG-sal. Para esse fim, os experimentos foram realizados buscando responder os objetivos específicos citados na seção 1.2.

3.1 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.1 Reagentes e soluções

Nos ensaios com solução modelo foi utilizado 2,3-butanodiol (B84904) adquirido da Sigma-Aldrich (EUA). Trata-se de uma mistura de estereoisômeros contendo majoritariamente o meso-2,3-butanodiol (969,45 g L⁻¹). Formas opticamente ativas do 2,3-butanodiol também foram quantificadas nessa mistura (319 g L⁻¹), porém não foi possível determinar se é um isômero dextrogiro (S,S) ou levogiro (R,R), o fabricante não tem essa informação disponível. Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico. O polietilenoglicol, de massa molar 4000 Da e 6000 Da, foram adquiridos da Neon (BR). Os sais citrato de sódio, sulfato de amônio, fosfato de potássio monobásico e fosfato de potássio bibásico foram adquiridos na Synth (BR).

No preparo de soluções estoque de PEG para formar o SAB as concentrações dessas soluções podem variar de 30 a 70 % (m/m) (DOS SANTOS et al., 2020; HATTI-KAUL, 2000). Nesse estudo, para explorar várias composições de SAB, ou seja, analisar diferentes regiões do diagrama de fases, foram preparadas com água ultrapura (Milli-Q, Milipore Inc., EUA) soluções estoque mais concentradas de PEG 4000 (60 % m/m), PEG 6000 (60 % m/m). Neste trabalho utilizou-se três sais com diferentes poderes de solvatação para avaliar o efeito da densidade de carga na partição. As soluções estoque de sais foram preparadas em concentrações mais elevadas, de acordo com o limite de solubilidade de cada sal, o que dá mais flexibilidade de trabalhar em diferentes regiões do diagrama de fases e formar o SAB. Soluções de tampão

citrate pH 6,4 (27 % m/m), sulfato de amônio pH 6,5 (40 % m/m) e tampão fosfato pH 7,0 (27 % m/m), foram preparadas com água ultrapura (Milli-Q, Milipore Inc., EUA). A concentração da solução estoque de 2,3-butanodiol (40 g L^{-1}) foi baseada em dados da literatura sobre sua produção em meios fermentados obtidos de substratos como glicose, frutas e resíduos vegetais (LIAKOU et al., 2018).

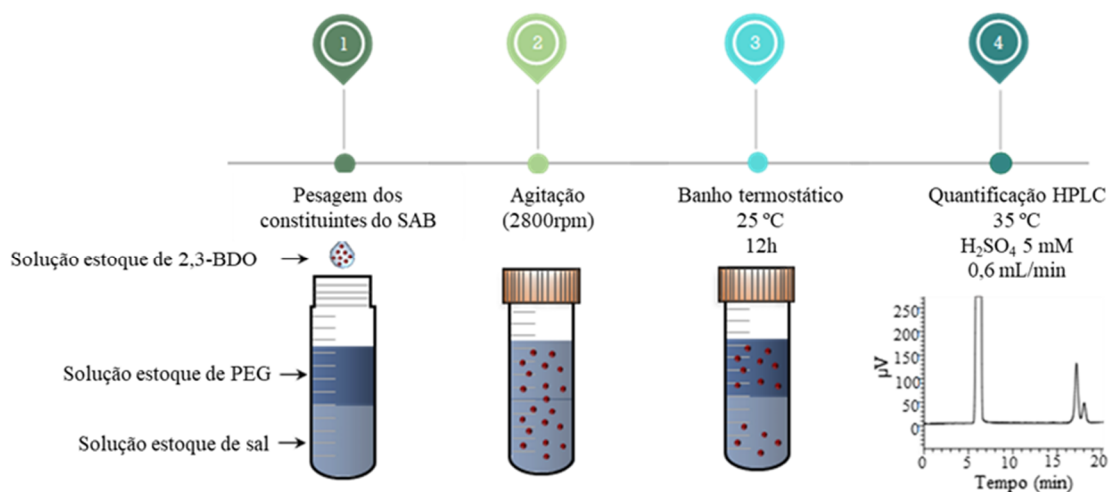
3.1.2 Dados de equilíbrio de fase e definição da composição global dos sistemas aquosos bifásicos (SAB's)

Os dados de equilíbrio de fase para os diferentes SAB's utilizados neste trabalho foram embasados em informações disponíveis na literatura, obtidas por diferentes pesquisadores (Anexo A) (HAGHTALAB; MOKHTARANI, 2004; SHANG et al., 2004; WYSOCZANSKA; MACEDO, 2016; YUN-LONG GAO, QIN-HUA PENG, 1991; ZHOU et al., 2013). As composições globais dos SABs utilizados nas extrações do 2,3-BDO foram estudadas por meio de ensaios preliminares (APÊNDICE A) em diferentes regiões dos diagramas de fase (Figura 3). A partir desses resultados de extração, foi definida a melhor região para delinear o planejamento experimental (Figura 6).

3.1.3 Procedimento experimental para extração do 2,3-BDO por sistema aquoso bifásico (SAB)

Soluções estoque de cada constituinte do SAB foram preparadas previamente nas concentrações descritas na seção 3.1.1 desse trabalho. Em seguida cada SAB foi preparado pesando-se os seus respectivos constituintes em um tubo falcon de 15 mL. A pesagem de cada constituinte do SAB foi realizada de acordo com o planejamento experimental exibido nas Tabelas 5 e 6. A massa total do SAB foi fixada em 10 g, sendo a fração mássica do 2,3-BDO 20 % (m/m) da massa total. A fração mássica do PEG e do sal no sistema variou de acordo com a matriz do DCCR. Após a pesagem, as amostras foram homogeneizadas em um agitador tipo vórtex a 2800 rpm por 1 minuto, sendo em seguida colocados no banho termostático a $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ por 12 horas, até o equilíbrio termodinâmico. Os volumes das fases de topo e fundo foram medidos. Alíquotas de cada uma das fases do SAB foram coletadas para quantificar o 2,3-BDO por meio da cromatografia líquida (HPLC). Os experimentos de extração foram conduzidos como ilustrado na Figura 5.

Figura 5: Fluxograma do processo de extração do 2,3-BDO em SAB.



Fonte: Adaptado de FU et al. (2019).

3.1.4 Quantificação do 2,3-butanodiol

A concentração de 2,3-BDO no extrato e nas fases de topo e de fundo do SAB foi determinada por cromatografia líquida (HPLC LC-Prominence 20A Shimadzu) equipado com detector de índice de refração e coluna Aminex HPX-87H 300 x 7,8 mm. A fase móvel utilizada foi água acidificada com H_2SO_4 5mM na vazão de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$, e a temperatura do forno foi mantida em $35 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.1.5 Desempenho da extração do 2,3-BDO no SAB

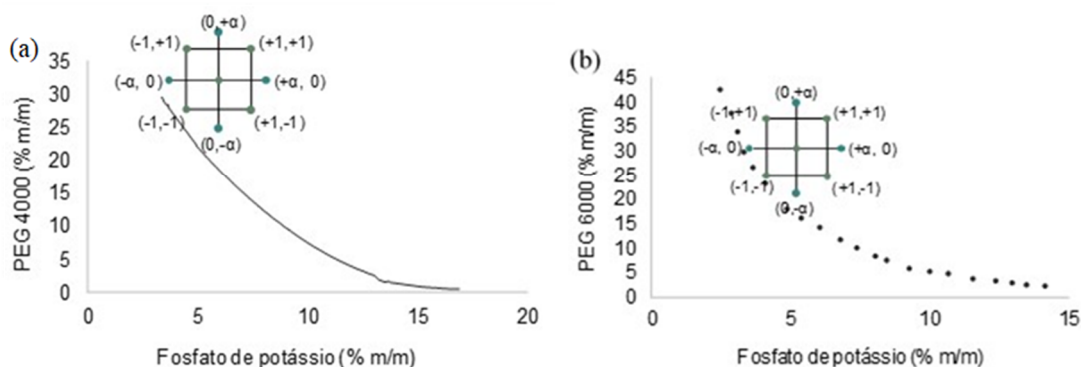
Por meio da quantificação do 2,3-BDO em ambas as fases do SAB, foi possível calcular o coeficiente de partição, a recuperação e o rendimento da extração do 2,3-BDO, como descrito na seção 2.2.1 por meio das Equações 3, 4 e 5 respectivamente.

3.1.6 Análise estatística

Para maximizar a extração de 2,3-BDO, utilizou-se o delineamento composto central rotacional (DCCR) contendo 3 pontos centrais e 4 axiais. Os resultados foram avaliados por meio do software STATISTICA 13.5 (TIBCO StatisticaTM). As faixas de variação entre o limite inferior e o superior de cada variável independente foram estabelecidas de acordo com os dados dos diagramas de fase de cada sistema PEG-sal (Anexo A). A Figura 6 ilustra os diagramas de

fases do sistema PEG-fosfato contendo a região de estudo (níveis do DCCR proposto), o mesmo estudo foi realizado para os sistemas constituídos por PEG-citrato e PEG-sulfato.

Figura 6: Planejamento experimental (DCCR) para SAB PEG 4000-fosfato (a) e PEG 6000-fosfato (b) criado a partir dos diagramas de fases.



Fonte: Adaptado de Haghtalab; Mokhtarani, (2004); Shang et al.,(2004)

As Tabelas 5 e 6 mostram os DCCR adotados para os diferentes SAB's. As variáveis quantitativas analisadas foram a concentração de PEG, a concentração de sal e a razão de volume entre as fases. As variáveis qualitativas analisadas foram a massa molar de PEG e o tipo de sal. As variáveis resposta foram a recuperação e o coeficiente de partição do 2,3-butanodiol.

Tabela 5: Níveis codificados e reais das variáveis independentes utilizados no DCCR sistemas PEG 4000-citrato, PEG 6000-citrato, PEG 4000-fosfato e PEG 6000-fosfato.

Variáveis independentes	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Concentração de PEG (% m/m)	27,43	28,95	32,58	36,22	37,72
Concentração de sal (% m/m)	3,89	4,47	5,87	7,27	7,84

Fonte: Elaborada pelo autor deste trabalho (2020)

Tabela 6: Níveis codificados e reais das variáveis independentes utilizados no DCCR para os SAB PEG 4000-sulfato e PEG 6000-sulfato.

Variáveis independentes	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Concentração de PEG (% m/m)	28,69	30,00	32,36	34,72	35,80
Concentração de sal (% m/m)	4,46	5,04	6,35	7,65	8,34

Fonte: Elaborada pelo autor deste trabalho (2020)

A análise de variância (ANOVA) dos DCCR foi realizada para verificar quais os fatores do SAB (principais e de interação) produziram efeito significativo nas respostas estudadas, coeficiente de partição (K) e a recuperação (Y_T %) do 2,3-BDO. Os modelos matemáticos obtidos na ANOVA de cada um dos SAB's foram validados estatisticamente e utilizados para obtenção de superfície de resposta, dessa forma foi possível constatar quais as condições para se maximizar a extração do 2,3-BDO.

A validação do DCCR foi realizada a partir da escolha nas superfícies de resposta, de dois pontos na região de ótimo de cada SAB estudado. Realizou-se experimentos em triplicata nos pontos escolhidos. As respostas obtidas experimentalmente foram comparadas, por meio do erro percentual, com as respostas calculadas para o coeficiente de partição (K) e recuperação (Y_T %) a partir dos modelos codificados de cada SAB (APÊNDICE B).

A ANOVA dá evidências de que existe pelo menos duas médias que são diferentes em um SAB. Para determinar quais médias foram diferentes entre si, o teste de Tukey ($p < 0,05$) foi realizado com os ensaios que tiveram a melhor resposta para Y_T % e K em cada um dos seis SABs estudados. Dessa forma, foi possível avaliar se o tipo de sal interferiu na recuperação e partição do 2,3-BDO. Posteriormente, realizou-se um breve estudo sobre a influência do tempo de agitação do sistema sobre a extração do 2,3-BDO variando-se o tempo de agitação em 1, 2, 4 e 8 minutos em um agitador tipo vórtex a 2800 rpm.

3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A extração no SAB é influenciada por vários fatores, por isso o delineamento composto central rotacional (DCCR) contendo 3 pontos centrais e 4 axiais foi proposto para otimizar a extração do 2,3-BDO. Os resultados do DCCR são mostrados nas Tabelas 7, 8 e 9.

Tabela 7: Matriz do delineamento e respostas obtidas na extração do 2,3-BDO em SAB constituído de PEG 4000-citrato e PEG 6000-citrato.

Ensaio	Composição global do SAB		PEG 4000					PEG 6000				
	PEG (% m/m)	Citrato de sódio (% m/m)	V _T (mL)	V _F (mL)	V _R	K	Y _T (%)	V _T (mL)	V _F (mL)	V _R	K	Y _T (%)
1	28,95	4,47	8,8	0,4	22,0	0,6	93,2	8,6	0,9	10,1	2,7	96,5
2	28,95	7,27	6,5	2,5	2,6	1,3	77,6	7,1	2,3	3,1	1,5	82,5
3	36,22	4,47	7,0	2,0	3,5	1,2	80,7	8,6	0,8	10,8	1,8	95,2
4	36,22	7,27	7,6	2,4	3,2	1,6	83,1	7,7	2,3	3,4	1,4	81,9
5	26,96	5,87	7,5	1,7	4,4	1,0	81,8	7,9	1,5	5,3	1,1	85,4
6	37,99	5,87	8,0	1,5	5,3	1,5	88,6	8,3	1,6	5,2	1,5	88,7
7	32,58	3,76	8,9	0,3	31,9	1,0	96,9	9,1	0,4	25,9	2,2	98,2
8	32,58	7,82	7,2	2,3	3,1	1,5	82,3	7,2	2,4	3,0	1,5	81,9
9	32,58	5,87	7,7	1,5	5,1	1,3	86,9	7,8	1,5	5,2	1,5	88,6
10	32,58	5,87	7,6	1,6	4,8	1,2	84,8	7,7	1,6	4,8	1,4	87,3
11	32,58	5,87	7,7	1,5	5,1	1,2	86,3	7,8	1,5	5,2	1,5	88,4

Fonte: Elaborada pelo autor deste trabalho (2020)

Notas: V_T - volume de topo; V_F - volume de fundo; V_R - razão de volume; K - coeficiente de partição; Y_T% - recuperação do 2,3-BDO na fase de topo

Na Tabela 7 observa-se que a variação da concentração de PEG e de citrato de sódio no SAB interferiu tanto na recuperação (Y_T %), quanto no coeficiente de partição do 2,3-BDO. Para o sistema com PEG 4000, no ensaio 1, em que a composição do SAB foi de 28,95 % (m/m) de PEG e 4,47 % (m/m) de citrato de sódio, a recuperação foi de 93,2 % e o coeficiente de partição foi 0,6. No ensaio 2, no qual o SAB foi composto por 28,95 % (m/m) de PEG e 7,27 % (m/m) de citrato de sódio, a recuperação do 2,3-BDO foi menor 77,6 %, porém o coeficiente de partição teve uma melhora significativa, chegando a 1,3; valor duas vezes maior que o resultado obtido no ensaio 1. Os melhores valores de recuperação do 2,3-BDO foram obtidos no ensaio 7 do SAB constituído por 32,58 % (m/m) de PEG e 3,76 % (m/m) de citrato de sódio, nesse ensaio os valores de Y_T % foram 96,9 % e 98,2 % nos sistemas formados com o PEG 4000 e PEG 6000 respectivamente.

Bons resultados de recuperação do 2,3-BDO também foram observados no ensaio 1 (96,5 %) e ensaio 2 (95,2 %) do sistema PEG 6000-citrato, sistemas nos quais as concentrações de sal citrato utilizadas foram menores. Quando se trabalha com menores concentrações de sal na composição do SAB, restringimos a extração 2,3-BDO a regiões do diagrama de equilíbrio onde a razão de volume (V_R) entre as fases é maior, isso resulta em uma melhora na recuperação (Y_T %) devido ao volume livre disponível na fase além de evidenciar a afinidade do produto de interesse pela fase de topo (BENAVIDES; RITO-PALOMARES, 2008; SAMPAIO, 2016).

Tanto no sistema formado por PEG 4000-citrato, quanto no PEG 6000-citrato, observou-se a tendência de favorecer a recuperação do 2,3-BDO (Y_T %) ao se reduzir a concentração de sal no sistema. No SAB PEG 6000-citrato por exemplo, quando comparamos os ensaios 1 e 2, o Y_T % aumentou de 82,4 % para 96,5 % ao se aumentar o V_R de 3,1 para 10,1. No SAB PEG 4000-citrato, o Y_T % aumentou de 77,6 % para 93,2 % ao se aumentar o V_R de 2,6 para 22,0. Nos resultados exibidos nas Tabelas de ANOVA (APÊNDICE C), pode-se afirmar com 95,0 % de confiança que os dados se ajustaram bem aos modelos obtidos para descrever a recuperação do 2,3-BDO, ou seja, não apresentaram falta de ajuste. Outros estudos têm evidenciado que o aumento do V_R contribui de forma significativa para melhorar a recuperação dos produtos de interesse nos SAB's (HEMAVATHI; RAGHAVARAO, 2011). Fan et al. (2017) estudaram a extração da capsaicina em SAB constituído por polímero-sal e etanol e observaram que o rendimento da extração aumentou de 85,6 % para 93,1 % com o aumento do V_R do sistema. Em seu estudo Blatkiewicz et al. (2018) também observaram uma melhora considerável da recuperação e do coeficiente de partição da enzima lacase ao aumentar o V_R do SAB constituído por PEG-fosfato.

No sistema PEG 6000-citrato não foi possível explicar a variação do coeficiente de partição do 2,3-BDO em função das concentrações de PEG 6000 e de citrato no sistema, pois os dados não se ajustaram bem ao modelo, Tabela C3 (APÊNDICE C). No sistema formado por PEG 4000-citrato os dados se ajustaram bem ao modelo que descreve a variação do coeficiente de partição do 2,3-BDO em função das concentrações de PEG 4000 e de sal no sistema, como mostrado na Tabela de ANOVA C4 (APÊNDICE C). Observou-se uma propensão de melhor coeficiente de partição do 2,3-BDO nos sistemas em que as concentrações de PEG e de sal foram maiores, ensaios 4, 6 e 8. No ensaio 4 por exemplo, em que a concentração de PEG 4000 foi 36,22 %m/m de citrato de sódio 7,27 % (m/m), o valor de K foi 1,6. No ensaio 1 e 7, que correspondem aos sistemas com menor concentração de citrato, os valores de K foram 0,6 e 1,0 respectivamente. Ao trabalhar em regiões onde a razão de volume (V_R) no sistema é muito grande, o coeficiente de partição reduz significativamente, pois ocorre a diluição do 2,3-BDO na fase de topo. Foi o que ocorreu nos ensaios 1 e 7 em que os V_R foram de 22,0 e 31,9 respectivamente, os valores de K reduziram para 0,6 e 1,0. No ensaio 4 o SAB tem uma composição global que resulta em um V_R de 3,2, logo o coeficiente de partição foi 1,6.

Tabela 8: Matriz do delineamento e respostas obtidas na extração do 2,3-BDO em SAB constituído de PEG 4000-sulfato e PEG 6000-sulfato.

Ensaio	Composição global do SAB		PEG 4000					PEG 6000				
	PEG (% m/m)	Sulfato de amônio (% m/m)	V _T (mL)	V _F (mL)	V _R	K	Y _T (%)	V _T (mL)	V _F (mL)	V _R	K	Y _T (%)
1	30,00	5,04	8,4	0,8	10,5	1,2	92,6	8,2	0,8	10,3	1,3	93,1
2	30,00	7,65	6,2	2,8	2,2	1,5	77,1	6,7	2,5	2,7	1,7	81,6
3	34,72	5,04	7,8	1,4	5,6	1,5	89,3	8,0	1,2	6,7	1,4	90,1
4	34,72	7,65	6,6	2,4	2,8	1,8	83,2	6,8	2,4	2,8	1,9	84,0
5	28,69	6,35	7,5	1,9	4,0	1,3	83,7	7,5	2,0	3,8	1,3	83,2
6	35,80	6,35	7,0	2,2	3,2	1,8	84,9	7,0	2,0	3,5	1,8	86,6
7	32,36	4,46	8,5	1,0	8,5	1,0	89,6	8,5	1,0	8,5	1,2	91,1
8	32,36	8,34	6,4	2,6	2,5	1,6	80,1	6,5	2,5	2,6	1,8	82,7
9	32,36	6,35	7,4	1,6	4,6	1,4	86,7	7,4	2,0	3,7	1,5	84,7
10	32,36	6,35	7,4	1,6	4,6	1,5	87,2	7,4	2,0	3,7	1,6	85,6
11	32,36	6,35	7,5	1,6	4,7	1,3	85,9	7,2	2,0	3,6	1,6	85,6

Fonte: Elaborada pelo autor deste trabalho (2020)

Notas: V_T - volume de topo; V_F - volume de fundo; V_R - razão de volume; K - coeficiente de partição; Y_T % - recuperação do 2,3-BDO na fase de topo

Na Tabela 8 observa-se que tanto a concentração de PEG quanto a concentração de sulfato interferiram na recuperação (Y_T %) e no coeficiente de partição do 2,3-BDO no SAB. Ao comparar os ensaios 1 e 2, que têm a mesma concentração de PEG 30,00 % (m/m) e concentrações diferentes de sulfato 5,04 e 7,65 % (m/m), respectivamente, observa-se uma mudança considerável na recuperação do 2,3-BDO na fase de topo (Y_T %). No SAB formado por PEG 4000-sulfato e PEG 6000-sulfato houve um aumento na recuperação de 15 % e 11 % respectivamente, ao reduzir a concentração do sulfato de 7,65 para 5,04 % (m/m). Nos ensaios 3 e 4 em que a concentração de PEG é 34,72 % (m/m), ao reduzir a concentração de sal de 7,65 para 5,04 % (m/m), houve um aumento de 6 % na recuperação do 2,3-BDO em ambos sistemas, PEG 6000-sulfato e PEG 4000-sulfato. Essa tendência foi observada em vários outros sistemas, nos ensaios 7, 8 e 9 que possuem a mesma concentração de PEG 32,36 % (m/m), a recuperação do 2,3-BDO aumentou à medida que a concentração de sal no sistema diminuiu $8,34 > 6,35 > 4,46$ % (m/m) sendo os valores de recuperação igual a 80,1 %; 86,7 % e 89,6 %, no sistema PEG 4000-sulfato e de 82,7 %; 85,6 % e 91,1 % no sistema PEG 6000-sulfato.

A massa molar do PEG não afetou a recuperação do 2,3 BDO no sistema PEG-sulfato. Ao comparar SAB's com mesma composição e razão de volume conclui-se que os valores de Y_T % são muito próximos ou iguais, como é o caso do ensaio 1 em que a recuperação do 2,3-BDO foi de 92,6 % no sistema formado com PEG 4000 e 93,1% no sistema formado com PEG 4000, essa mesma tendência pode ser observada nos ensaios 4, 5 e 7. Nos SABs existe um fenômeno denominado volume de exclusão, no qual o aumento da concentração do polímero e ou de sua massa molecular resulta na redução do volume livre para a molécula alvo na fase polimérica forçando então a recuperação e partição do produto na fase salina. Esse fenômeno foi observado apenas em estudos envolvendo macromoléculas como as proteínas (SILVA; DE FRANÇA; PORTO, 2018; YÜCEKAN; ÖNAL, 2011). Uma vez que o 2,3-BDO é uma molécula pequena, 90 g mol^{-1} é provável que o fenômeno do volume de exclusão não seja representativo para a recuperação (Y_T %).

Ao analisar a Equação (8) referente ao cálculo de Y_T %, observa-se que um dos principais fatores que contribuem para a recuperação do produto no SAB é a razão de volume do sistema (V_R), a análise dos dados obtidos na Tabela 8, também levam a essa conclusão. Nos ensaios 7, 8 e 9 do sistema PEG 4000-sulfato observa-se que a recuperação do 2,3-BDO aumentou em 80,1 %, 86,7% e 89.6 %, com o aumento do V_R do sistema em 2,5; 4,6 e 8,5 respectivamente. No SAB PEG 6000-sulfato ao aumentar o valor de V_R de 2,6 para 8,5 ensaio 8 e 7 respectivamente, obteve-se um acréscimo de 8 % na recuperação do 2,3-BDO. Esses

resultados evidenciam que a afinidade do 2,3-BDO pelo PEG é maior, além disso como o volume de topo da fase polimérica é maior, há mais volume livre disponível para a molécula interagir. Nos resultados exibidos nas Tabelas de ANOVA (APÊNDICE C), pode-se afirmar com 95 % de confiança que os dados se ajustaram bem aos modelos obtidos para descrever a recuperação do 2,3-BDO, ou seja, não apresentaram falta de ajuste.

Outro fator que também interfere no valor de Y_T % é o coeficiente de partição (equação 8) sendo que essas duas propriedades são inversas, quanto maior o valor de K menor será o Y_T %. O coeficiente de partição (K) do 2,3-BDO no sistema formado por PEG-sulfato sofreu interferência tanto da concentração do PEG quanto do sulfato como podemos observar nos modelos obtidos para descrever a partição do 2,3-BDO nesses sistemas. Nas Tabelas de ANOVA C7 e C8 (APÊNDICE C), podemos afirmar com 95 % de confiança que os dados se ajustaram bem aos modelos.

Os melhores valores do coeficiente de partição do 2,3-BDO foram obtidos nos ensaios 4, 6 e 8 em ambos sistemas, formados com PEG 4000 e PEG 6000. Esses ensaios com maiores valores de K têm em comum as altas concentrações de sulfato no SAB. No ensaio 4 em que o sistema é formado por PEG 34,72 % (m/m), e sulfato 7,65 % (m/m), o K foi de 1,8 e 1,9 com o PEG 4000 e PEG 6000 respectivamente, logo nesses sistemas a concentração de 2,3-BDO na fase de topo é quase duas vezes maior que sua concentração na fase de fundo. Nos ensaios 7 e 8 que apresentam a mesma concentração de PEG 32,36 %, ao dobrar a concentração de sulfato de 4,46 % para 8,34 % (m/m), houve um acréscimo no valor do coeficiente de partição de 60 % no sistema formado com PEG 4000 e 52 % no sistema formado com PEG 6000. Quando se trabalha com maiores concentrações de sal na composição do SAB, ocorre a redução da quantidade de água livre para solvatar outras moléculas na fase de fundo, logo o soluto de interesse é parcialmente hidratado e portanto tendem a ficar na fase polimérica (BOLAR; BELUR; IYYASWAMI, 2013).

Ao analisar os ensaios 1, 7 e 8, é possível inferir que a massa molar do PEG é um fator que altera o coeficiente de partição do 2,3-BDO no sistema. No ensaio 1, no qual a razão de volume dos sistemas formados por PEG 4000 e PEG 6000 são similares, o coeficiente de partição do 2,3-BDO no sistema formado por PEG 6000 foi 10 % maior que no sistema formado por PEG 4000. No ensaio 7 o coeficiente de partição do 2,3-BDO foi 19 % maior no SAB formado com o PEG 6000, já no ensaio 8 foi 12 % maior. O coeficiente de transferência de massa no SAB depende de propriedades das fases como a viscosidade, que pode mudar em função da massa molar do PEG. Segundo Quental et al. (2015), a viscosidade da fase de topo

geralmente aumenta com o aumento da massa molecular do PEG, baixas viscosidades melhoram a transferência de massa no SAB. Os resultados obtidos para a recuperação do 2,3-BDO no SAB PEG 4000-fosfato e PEG 6000-fosfato mostram um comportamento oposto ao observado por Quental et al. (2015). Mei et al. (1995) estudaram SAB formado por PEG com diferentes massas molares, PEG 1000, PEG 2000, PEG 4000, PEG 6000 e PEG 20000 com sal fosfato de potássio ou sulfato de amônio. A fase de topo formada com PEG 1000, apresentou viscosidade menor que a fase de topo formada com PEG 4000 e 6000. Os autores observaram que não houve diferença na viscosidade da fase de topo ao comparar o PEG 4000 com o PEG 6000, no entanto houve uma diferença considerável na viscosidade ao variar a concentração de PEG na fase de topo do SAB.

Tabela 9: Matriz do delineamento e respostas obtidas na extração do 2,3-BDO em SAB constituído de PEG 4000-fosfato e PEG 6000-fosfato.

Ensaio	Composição global do SAB		PEG 4000					PEG 6000				
	PEG (% m/m)	Fosfato de potássio (%m/m)	V _T (mL)	V _F (mL)	V _R	K	Y _T (%)	V _T (mL)	V _F (mL)	V _R	K	Y _T (%)
1	28,95	4,47	8,3	0,9	9,2	1,2	91,6	8,0	1,4	5,7	1,5	89,8
2	28,95	7,27	6,9	2,1	3,3	1,7	85,1	6,5	2,5	2,60	2,1	84,5
3	36,22	4,47	8,0	1,0	8,0	2,2	94,5	8,0	1,2	6,7	1,5	91,0
4	36,22	7,27	7,8	1,7	4,6	2,1	90,7	7,7	2,0	3,9	3,3	92,8
5	26,96	5,87	7,6	1,4	5,4	1,3	87,5	7,2	1,8	4,0	1,5	86,1
6	37,99	5,87	8,0	1,5	5,3	2,0	91,4	7,7	1,8	4,3	1,9	89,1
7	32,58	3,76	8,5	0,7	12,1	1,3	94,0	8,2	0,8	10,3	1,9	95,0
8	32,58	7,82	7,0	2,4	2,9	1,9	84,9	7,0	2,5	2,8	2,5	87,3
9	32,58	5,87	7,4	1,6	4,6	1,8	89,3	7,5	1,9	4,0	1,4	84,5
10	32,58	5,87	7,5	1,7	4,4	1,7	88,3	7,4	2,0	3,7	1,6	85,9
11	32,58	5,87	7,5	1,7	4,4	1,8	88,6	7,4	1,8	4,1	1,6	86,7

Fonte: Elaborada pelo autor deste trabalho (2020)

Notas: V_T - volume de topo; V_F - volume de fundo; V_R - razão de volume; K - coeficiente de partição; Y_T % - recuperação do 2,3-BDO na fase de topo

Na Tabela 9 e nos modelos gerados a partir do DCCR observa-se que ambos constituintes do SAB, PEG e sal fosfato, interferiram na recuperação do 2,3-BDO ($Y_T\%$). As Tabelas de ANOVA (APÊNDICE C), mostram que os dados se ajustaram bem aos modelos, sendo o intervalo de confiança de 95 %. As melhores recuperações foram obtidas no SAB constituído por PEG 4000 36,22 % (m/m) e fosfato 4,47 % (m/m), no qual o $Y_T\%$ foi de 94,5 %, e no sistema PEG 6000 32,58 % (m/m) e fosfato 3,76 % (m/m), com $Y_T\%$ de 95,0 %. Esses sistemas com melhor recuperação do 2,3-BDO têm em comum a baixa concentração de sal fosfato usada na composição. Dessa forma conclui-se que em todos os seis SAB's estudados nesse trabalho, há uma tendência em melhorar a recuperação do 2,3-BDO nos sistemas com menor concentração de sal. Esses resultados evidenciam a relevância da razão de volume (V_R) do sistema e da afinidade do 2,3-BDO pelo PEG sobre sua recuperação. Ao analisar os ensaios 7, 9 e 8 nos quais a concentração de PEG 4000 é a mesma 32,58 % (m/m), e as concentrações de fosfato são 3,76 % (m/m), 5,87 % (m/m) e 7,82 % (m/m) respectivamente, conclui-se que a medida que a concentração de sal aumenta no SAB, a recuperação do 2,3-BDO reduz em 94 %, 89 % e 84 % no sistema pois a razão de volume do SAB também diminui de 12,1; 4,6 e 2,9.

No SAB PEG 6000-fosfato, ao aumentar a concentração de sal de 3,76 % (m/m) para 7,82 % (m/m), ensaios 7 e 8, a recuperação do 2,3-BDO teve um declínio de 8 %, porém o coeficiente de partição teve um aumento notável de 33 %. No SAB PEG 4000-fosfato, o aumento da concentração de sal de 3,76 % (m/m) para 7,82 % (m/m), também resultou no declínio da recuperação em 10 % e no aumento do coeficiente de partição do 2,3-BDO em 47 %. Em todos os seis SAB's estudados nesse trabalho, observou-se essa propensão do aumento do coeficiente de partição do 2,3-BDO no SAB à medida que se acrescenta sal no sistema. O 2,3-butanodiol é uma molécula polar e possui característica hidrofílica ($\log P = -0,59$) (FoodDB, 2019; WISHART et al., 2018). A adição de sais no SAB promove interações hidrofóbicas, cujo aumento está relacionado à redução da quantidade de água disponível para solvatar as moléculas, logo a partição do 2,3-BDO é favorecida para a fase PEG ($K > 1$) que é mais hidrofílica ($\log P = -2,0$) que as fases salinas de sulfato de amônio ($\log P = -0,84$), fosfato de potássio ($\log P = -1$) e citrato de sódio ($\log P = -1,3$).

O coeficiente de partição é influenciado por vários fatores, carga de superfície da molécula alvo, seu tamanho além dos diferentes tipos de interações como forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e iônicas que contribuem com este parâmetro termodinâmico (PORTO et al., 2010). No SAB formado por PEG-fosfato, a concentração de PEG no sistema também interferiu no coeficiente de partição do 2,3-BDO. Nos

ensaios 2 e 4 em que a concentração de sal é a mesma, 7,27 % (m/m) e a de PEG aumenta de 28,95 % (m/m) para 36,22 % (m/m), o coeficiente de partição aumentou 22 % no SAB formado com PEG 4000-fosfato e 59% no PEG 6000. Nos ensaios 5 e 6, que também possuem mesma concentração de sal, 5,87 % (m/m), houve um incremento na concentração de PEG de 26,96 % (m/m) para 37,99 % (m/m) e o K do 2,3-BDO aumentou em 56 % e 24 % nos sistemas formados por PEG 4000 e 6000 respectivamente. Os ensaios 4 e 6, que tiveram maiores valores de coeficiente de partição do 2,3-BDO correspondem a sistemas nos quais as composições estão em regiões mais afastadas da linha binodal. No SAB, quando se trabalha em regiões mais afastadas do ponto crítico, ou em linhas de amarração com maior comprimento, existe uma maior diferença entre as propriedades físico-químicas das fases de topo e fundo, logo o coeficiente de partição da molécula alvo no sistema é melhor. Por meio da análise de variância (APÊNDICE C), pode-se afirmar com 95 % de confiança que os dados se ajustaram bem aos modelos obtidos para descrever o coeficiente de partição do 2,3-BDO.

O coeficiente de transferência de massa depende de algumas propriedades físicas como viscosidade das fases. É possível que a variação da concentração do PEG tenha contribuído para mudanças na viscosidade das fases do sistema e conseqüentemente na transferência de massa e coeficiente de partição do 2,3-BDO no SAB. Mei et al., 1995, concluiu que as viscosidades das fases do SAB geralmente aumentam com um aumento da concentração de PEG no sistema. O autor mediu as viscosidades da fase de topo de um sistema formado por PEG 4000-fosfato de potássio e PEG 6000-fosfato de potássio. Observou-se que ao aumentar a fração mássica do PEG 4000 de 9 % para 12 %, houve um incremento na viscosidade de 6,0 para 18,2 mPa.s. No sistema formado com PEG 6000, o aumento de 9 % para 11 % na fração mássica de polímero no sistema resultou em um aumento de viscosidade de 9,3 para 19,6 mPa.s.

A Tabela 10 mostra os valores dos coeficientes de determinação e os modelos obtidos para recuperação e coeficiente de partição do 2,3-BDO em cada SAB analisado nesse trabalho.

Tabela 10: Modelos obtidos para a recuperação e coeficiente de partição do 2,3-BDO nos diferentes SAB's estudados.

SAB	Modelos obtidos para Y_T (%)	R^2	Modelos obtidos para K	R^2
PEG 6000-citrato	$Y_T = 87,69 - 6,31x_2 + 1,22x_2^2$	0,97	-	*
PEG 6000-sulfato	$Y_T = 85,17 - 7,34x_2 + 2,50x_2^2 + 2,67x_1x_2$	0,89	$K = 1,56 + 0,12x_1 + 0,21x_2$	0,90
PEG 6000-fosfato	$Y_T = 85,66 + 1,72x_1 + 0,98x_1^2 - 1,81x_2 + 2,78x_2^2 + 1,76x_1x_2$	0,89	$K = 1,53 + 0,21x_1 + 0,13x_1^2 + 0,39x_2 + 0,35x_2^2 + 0,31x_1x_2$	0,86
PEG 4000-citrato	$Y_T = 87,38 - 1,97x_1^2 - 4,22x_2 + 4,49x_1x_2$	0,75	$K = 1,20 + 0,17x_1 + 0,22x_2 - 0,09x_1x_2$	0,95
PEG 4000-sulfato	$Y_T = 86,62 - 1,46x_1^2 - 8,77x_2 + 4,72x_1x_2$	0,92	$K = 1,38 + 0,15x_1 + 0,09x_1^2 + 0,19x_2$	0,93
PEG 4000-fosfato	$Y_T = 88,73 + 1,76x_1 + 0,60x_1^2 - 2,90x_2 + 0,61x_2^2 + 0,65x_1x_2$	0,95	$K = 1,71 + 0,29x_1 + 0,17x_2 - 0,14x_1x_2$	0,91

Fonte: Elaborada pelo autor deste trabalho (2020)

Notas: *dados não se ajustaram ao modelo; x_1 concentração de PEG; x_2 concentração de sal

A validação do DCCR foi realizada apenas para os DCCR dos SABs formados com PEG 4000-sal, uma vez que apresentaram um bom potencial de extração do 2,3-BDO. Obteve-se valores satisfatórios para as respostas $Y_T\%$ e K, além disso as ANOVAs apresentaram bom coeficiente de correlação ($>$ que 75,2 %). O APÊNDICE D exibe os gráficos de valores preditos *versus* observado e o APÊNDICE B exibe as tabelas de comparação entre os valores preditos e experimentais de $Y_T\%$ e K para cada SAB estudado. Os erros entre o $Y_T\%$ predito e o $Y_T\%$ experimental foram relativamente baixos, com valor máximo de 2,9 % entre o valor predito, 92,4 % e experimental, 95,2 % para o sistema PEG 4000-fosfato. Alguns sistemas como PEG 4000-sulfato e PEG 4000-fosfato também apresentaram erros relativamente baixos para o coeficiente de partição. No sistema PEG 4000-fosfato por exemplo o K predito = 1,71 o K experimental foi $1,94 \pm 0,25$, erro de 11,0 %. Regupathi et al., 2009, estudaram um SAB constituído por PEG 6000-citrato de amônio e também concluíram que o aumento da concentração de PEG 6000 no sistema resultou no incremento da viscosidade da fase de topo, rica em polímero.

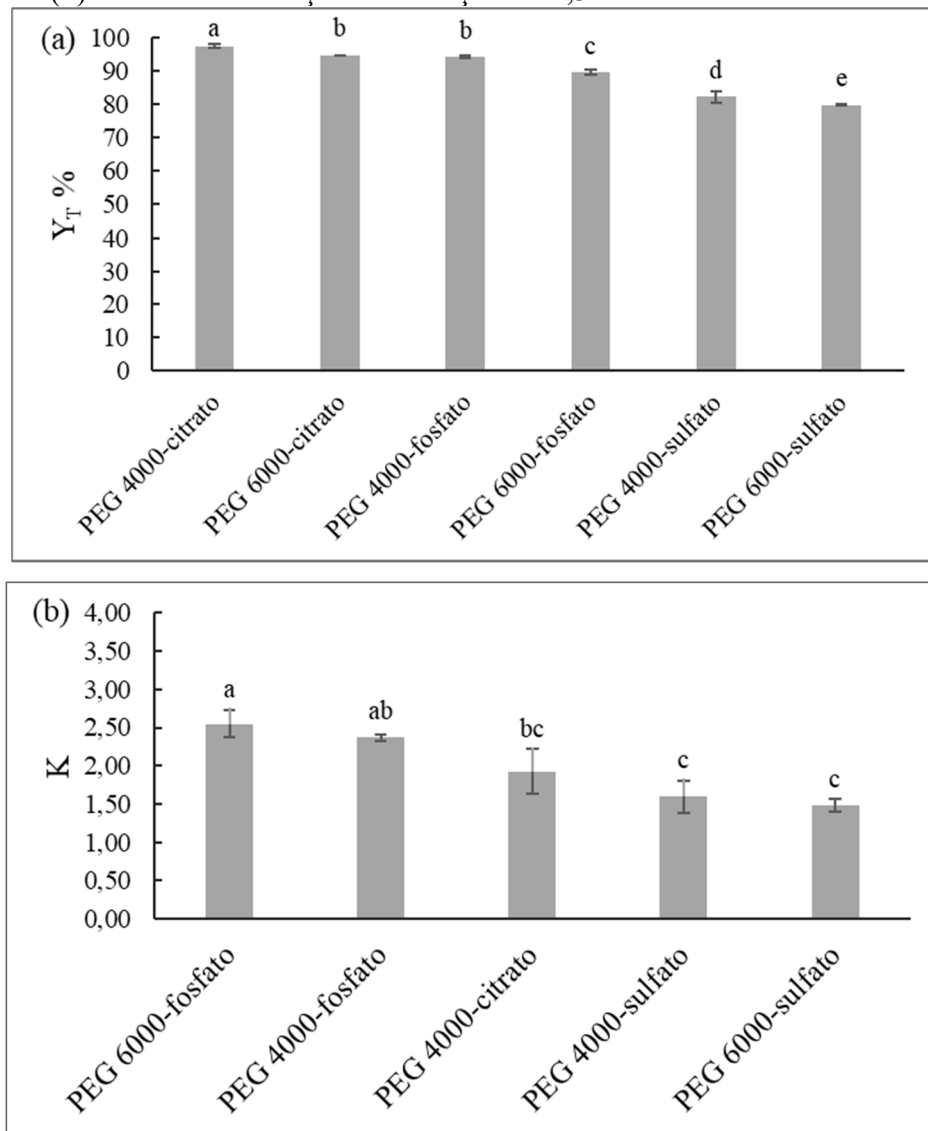
Analisando as tabelas de ANOVA de cada SAB conclui-se que houve diferença na recuperação e na partição do 2,3-BDO nos sistemas estudados. Para mostrar quais médias foram diferentes entre si, um teste de Tukey ($p < 0,05$) foi realizado; para isso, em cada um dos seis SABs estudados foi escolhido um único ensaio que teve a melhor resposta para $Y_T\%$ e K. Dessa forma, foi possível comparar os seis SAB's e avaliar se o tipo de sal interferiu na recuperação e partição do 2,3-BDO. A Tabela 11 mostra os ensaios utilizados no teste de Tukey e a Figura 7 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 11: SAB's utilizados no teste de Tukey para análise da influência do tipo de sal sobre K e $Y_T\%$.

SAB	Ensaio	Variáveis codificadas		Variáveis reais	
		PEG	Sal	PEG (% m/m)	Sal (% m/m)
PEG 6000-citrato	1	-1	-1	28,95	4,47
PEG 6000-sulfato	1	-1	-1	30,00	5,04
PEG 6000-fosfato	4	1	1	36,22	7,27
PEG 4000-citrato	7	0	-1,41	32,58	3,89
PEG 4000-sulfato	1	-1	-1	30,00	5,04
PEG 4000-fosfato	3	1	-1	36,22	4,47

Fonte: Elaborada pelo autor deste trabalho (2020)

Figura 7: Médias referentes à recuperação (Y_T %) (a) e ao coeficiente de partição (K) do 2,3-BDO (b) na melhor condição de extração do 2,3-BDO de cada SAB estudado.



Fonte: Elaborada pelo autor deste trabalho (2020)

Notas: Colunas identificadas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 95% de confiança.

A partir da Figura 7 (a) conclui-se que o tipo de sal utilizado para compor o SAB foi um fator significativo na recuperação do 2,3-BDO, pois apenas os sistemas constituídos por PEG 4000-fosfato e PEG 6000-citrato não apresentaram diferença significativa entre si. O sistema formado por PEG 4000-citrato apresentou média superior aos demais, ou seja, foi o mais eficiente para recuperar o 2,3-butanodiol, sendo o Y_T % igual a $97,32 \pm 0,65$. O SAB formado por PEG 6000-sulfato foi o que apresentou menor desempenho na recuperação do 2,3-BDO, $79,82 \pm 0,02$. O tipo de sal também interferiu no coeficiente de partição nos sistemas, pois o SAB constituído de PEG 6000-fosfato, apresentou diferença estatística em relação aos

sistemas formados por PEG 4000-citrato e PEG-sulfato, Figura 7 (b). Os SAB's que exibiram os melhores coeficientes de partição do 2,3-BDO foram o PEG 6000-fosfato $2,55 \pm 0,18$ (155,0 %) e o PEG 4000-fosfato $2,37 \pm 0,04$ (137,0 %), esses dois sistemas não diferiram estatisticamente entre si ($p < 0,05$). O menor valor de K, $1,49 \pm 0,08$ (49 %) foi observado no SAB PEG 6000-sulfato. No SAB PEG 6000-citrato os dados não se ajustaram bem ao modelo (APÊNDICE C) que descreve a variação do coeficiente de partição do 2,3-BDO, logo não se realizou o teste de diferença de média nesse sistema.

Os sais citrato, sulfato e fosfato, utilizados no preparo do SAB foram escolhidos em função do poder de solvatação. Os três sais promovem o efeito *salting-out*, sendo que de maneira geral ânions com maior valência têm maior capacidade de hidratar as moléculas de água, ou seja, de promover o *salting-out* direcionando a recuperação e a partição do 2,3-BDO para a fase de topo, polimérica. A valência do ânion do sal fosfato de potássio é similar ao citrato de sódio que por sua vez é maior que do sulfato de amônio ($\text{PO}_4^{3-} > \text{C}_6\text{H}_4\text{O}_7^{3-} > \text{SO}_4^{2-}$). Os sistemas formados por fosfato e citrato, sais que possuem maior poder de solvatação, foram aqueles nos quais obteve-se os melhores valores de recuperação e coeficiente de partição do 2,3-BDO. O SAB formado por sulfato de amônio, sal que possui o menor poder de solvatação entre os três estudados, foi o que apresentou as menores médias para a recuperação e coeficiente de partição do 2,3-BDO.

Na Figura 7 (a), os resultados obtidos para a recuperação do 2,3-BDO no SAB formado por PEG-sulfato e PEG-fosfato indicam que a massa molar do polímero interferiu na recuperação do 2,3-BDO. Ao analisar o sistema PEG 4000-sulfato e PEG 6000-sulfato, que possuem a mesma composição, 30,00 % (m/m) de PEG e 5,40% (m/m) sal, observou-se que a recuperação foi maior no SAB constituído com o PEG 4000. No sistema PEG 4000-fosfato e PEG 6000-fosfato a melhor recuperação do 2,3-BDO também foi no sistema com polímero de menor massa molar. Esses resultados corroboram com conclusões de alguns autores que afirma que sistemas formados por polímeros com massa molar menor possuem uma viscosidade menor, o que facilita a transferência de massa no sistema e melhora a recuperação e coeficiente de partição do produto de interesse (MEI et al., 1995; QUENTAL et al., 2015). Nesses ensaios a massa molar do polímero não afetou o coeficiente de partição do 2,3-BDO.

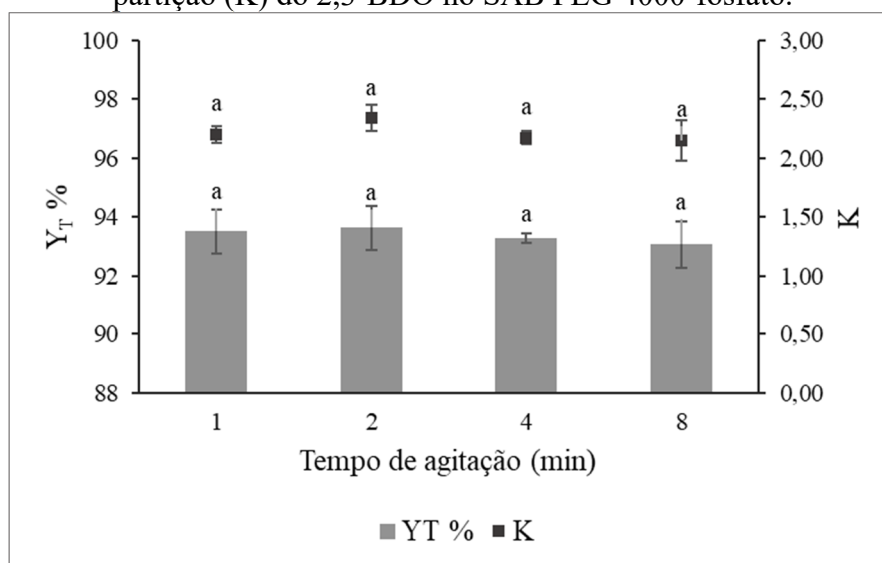
O SAB PEG 4000-citrato constituídos por 32,58 % (m/m) de PEG e 3,89 % (m/m) de sal e o SAB PEG 4000-fosfato formado por 36,22 % (m/m) de PEG e 4,47 % (m/m) de sal foram identificados como os melhores sistemas para extrair o 2,3-BDO, pois apresentaram as melhores respostas para a recuperação 97,3 % e 95,2 % e coeficiente de partição 1,93 (ou 93,0

%) e 2,37 (ou 137,0 %) respectivamente. Esses resultados evidenciam que recuperação e partição do 2,3-BDO no SAB formado por PEG-sal é um fenômeno complexo, que depende de vários fatores intrínsecos ao sistema como concentração dos constituintes, viscosidade das fases, força iônica dos sais, interações entre 2,3-BDO e o PEG razão de volume no sistema e depende também das propriedades do 2,3-BDO como a hidrofiliicidade, tamanho e carga de superfície da molécula. Li; Teng; Xiu, (2010) estudaram a partição e recuperação do 2,3-BDO em SAB formado por álcool-sal. No sistema formado por metanol-fosfato de potássio os autores tiveram uma recuperação de 97,17 % e coeficiente de partição de 20,0 %. No sistema formado por etanol-sulfato de amônio o K foi de 8,19 % e a recuperação 99,1 %. Ao tentar recuperar o 2,3-BDO de um meio fermentado filtrado o maior valor de coeficiente de partição obtido foi 7,1 % e a recuperação foi de 91,7 % em um SAB constituído de 32 % (m/m) etanol e 16 % (m/m) de sulfato de amônio.

Considerando outros fatores relevantes na extração do 2,3-BDO, como o volume de fase a ser tratado em etapas posteriores do processo *downstream*, pode-se indicar que o melhor sistema é o de PEG 4000-fosfato, pois o volume de topo é menor $V_T = 8,0$ mL. Além disso esse sistema apresentou o melhor coeficiente de partição $2,37 \pm 0,04$ (137,0 %) e um valor considerável para a recuperação do 2,3-BDO, $94,63\% \pm 0,09$. Em comparação, no sistema PEG-4000-citrato, o volume de topo foi igual a 9 mL, a média obtida para o K foi $1,93 \pm 0,29$ (93 %) e para o Y_T % foi $97,32 \pm 0,65$. Portanto, o SAB PEG 4000-fosfato foi eleito como o melhor sistema para extrair o 2,3-butanodiol.

Uma vez que a transferência de massa pode ser afetada pelo tempo em que o sistema permanece em agitação e, conseqüentemente, apresentar diferenças na extração do 2,3-BDO, um breve estudo foi realizado utilizando um vórtex de 2800 rpm e tempos de agitação de 1 à 8 min no SAB PEG 4000-fosfato. A Figura 8 apresenta o resultado obtido com relação à recuperação e ao coeficiente de partição.

Figura 8: Estudo do efeito do tempo de agitação sobre recuperação (Y_T %) e o coeficiente de partição (K) do 2,3-BDO no SAB PEG 4000-fosfato.



Fonte: Elaborada pelo autor deste trabalho (2020)

Notas: Colunas identificadas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 95% de confiança.

Durante a agitação o sistema se torna homogêneo e a concentração de 2,3-BDO é a mesma em toda a solução, após o sistema atingir o equilíbrio, a tensão superficial muda, assim como a viscosidade, a densidade e a tensão interfacial, logo o 2,3-BDO começa a direcionar para uma das fases do SAB. Na Figura 8 observa-se que os tempos de agitação estudados não interferiram na partição e recuperação do 2,3-BDO. A dispersão de dois líquidos imiscíveis pode ser alcançada através de agitação mecânica, essa dispersão é influenciada tanto pelo tempo quanto pela intensidade da agitação. Quanto maior o cisalhamento, menores são as gotas formadas e maior é a velocidade de difusão dessas gotas, o que facilita a mistura da solução com o solvente e melhora a transferência de massa no sistema (OLIVEIRA, 2010). Portanto, como o tempo de agitação não interferiu na extração do 2,3-BDO, elegeu-se o menor tempo, que corresponde a 1 minuto, para o preparo do SAB constituído por 36,22 % (m/m) de PEG 4000 e 4,47 % (m/m) de fosfato.

3.3 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS

O objetivo desse capítulo foi analisar o desempenho da extração do 2,3-BDO em diferentes sistemas aquosos bifásicos formados por polímero e sal. Para esse fim foi analisado se o tipo de sal, a massa molar do PEG e as concentrações desses constituintes no SAB mudariam os valores do coeficiente de partição (K) e da recuperação do 2,3-BDO (Y_T %) no sistema.

Os resultados obtidos para a recuperação do 2,3-BDO na fase de topo dos SAB's PEG-citrato, PEG-sulfato e PEG-fosfato mostram que de uma maneira geral a concentração de sal no sistema foi um fator que interferiu na recuperação do 2,3-BDO. Os melhores valores de $Y_T\%$ foram obtidos nos sistemas formados com menor concentração de sal, ou seja, que apresentaram um maior volume livre na fase de topo para o 2,3-BDO interagir. A variação da concentração de PEG no SAB não afetou a recuperação do 2,3-BDO na fase de topo. Os resultados obtidos no Teste de Tukey dos sistemas PEG-sulfato e PEG-fosfato, mostraram que a massa molar do PEG influenciou o valor de $Y_T\%$. Os sistemas formados com PEG 4000 tiveram melhores valores de $Y_T\%$, no geral polímeros com menor massa molar possuem viscosidade mais baixa, essa condição favorece a transferência de massa no SAB. O tipo de sal foi um fator significativo na recuperação do 2,3-BDO, os maiores de valores de $Y_T\%$ foram obtidos no SAB PEG 4000-citrato 97,3 % e PEG 400-fosfato 94,2 %, esses dois sais possuem maior poder *salting-out*, logo aumentaram a recuperação do 2,3-BDO na fase de topo.

Outro parâmetro utilizado para avaliar o desempenho da extração do 2,3-BDO no SAB foi o coeficiente de partição. A concentração de sal influenciou o coeficiente de partição do 2,3-BDO no SAB. Os melhores valores de K foram obtidos nos sistemas com maior concentração de sal, isso devido ao aumento o efeito *salting-out*. A concentração de PEG afetou o coeficiente de partição do 2,3-BDO apenas no SAB formado por PEG-fosfato, nesse sistema o aumento da concentração de PEG resultou num incremento no valor de K em 22% no SAB formado com PEG 4000-fosfato e de 59 % no PEG 6000. O tipo de sal utilizado no preparo do SAB também interferiu no valor de K. Os sistemas formados pelos sais fosfato e citrato, que possuem maior poder de solvatação, foram os que apresentaram melhores valores para o coeficiente de partição do 2,3-BDO.

A partir análise de todos os dados obtidos no estudo do desempenho da extração do 2,3-BDO no SAB polímero-sal, conclui-se que a melhor condição para a extração do 2,3-butanodiol foi no SAB constituído por 36,22 % (m/m) de PEG 4000 e 4,47 % (m/m) de fosfato de potássio e preparado com 1 minuto de agitação. Nesse sistema, os valores médios de $Y_T\%$ e K foram iguais a 94,2 % e 2,37 (137 %).

4 SEPARAÇÃO DO 2,3-BUTANODIOL CONTIDO NO SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO

Este capítulo apresenta o estudo da separação e concentração do 2,3-butanodiol extraído na fase de topo do sistema SAB PEG 4000-fosfato de potássio utilizando membranas comerciais de ultrafiltração, nanofiltração e osmose inversa.

4.1 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.1 Reagentes e soluções

Etanol PA 99% (Synth) foi utilizado para condicionar as membranas. Nos ensaios de rejeição de componentes pelas membranas, foram utilizadas soluções modelo de PEG 4000 Da e de 2,3-butanodiol 90 g mol^{-1} adquiridos na Synth (Brasil) e Sigma-Aldrich (Brasil) respectivamente.

A alimentação utilizada nos ensaios de permeação do SAB consistiu na fase de topo do sistema PEG 4000-fosfato diluída 10 vezes, sendo as concentrações médias dos constituintes as seguintes: $0,8 \text{ g L}^{-1}$ de 2,3-BDO e 30 g L^{-1} de PEG 4000.

4.1.2 Membranas utilizadas

Membranas comerciais de ultrafiltração, nanofiltração e osmose inversa foram estudadas para as etapas de separação e concentração do 2,3-BDO contido no SAB. As principais características de cada membrana estão descritas na Tabela 12. As membranas foram escolhidas com base nas características da alimentação, a massa molar do PEG 4000 Da e do 2,3-BDO, $90,12 \text{ g mol}^{-1}$. Além disso, poucos estudos abordam o uso de membranas na separação do 2,3-BDO contido em SAB ou em meios fermentados.

Tabela 12: Características das membranas utilizadas nos ensaios de permeação.

(continua)

Membrana	UH004	NP010	BW30
Fabricante	Microdyn-Nadir	Microdyn-Nadir	Dow Filmtec
Material	PESH	PES	PA
MMC (kDa)	4,0	1,2*	n.d

Permeância ($L h^{-1} m^{-2} bar^{-1}$)	$\geq 7,0$	$\geq 5,0$	n.d
Retenção %	92-99 ^a	35 -75 ^b	99,5 ^c

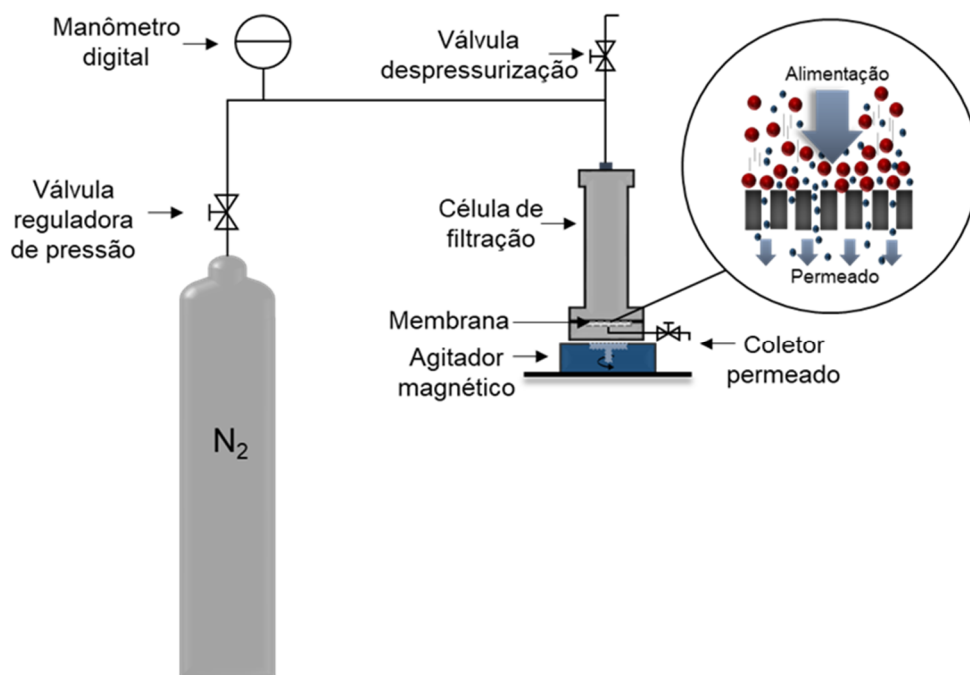
Fonte: Elaborada pelo autor deste trabalho (2020)

Notas: PESH - Poliétersulfona hidrófila; PES – Poliétersulfona; PA – Poliamida; a - soluto teste Dextran 10 %; b- soluto teste Na_2SO_4 ; c - soluto teste NaCl; n.d – não disponível; *após operar com 40 bar

4.1.3 Aparato experimental

Os ensaios de permeação foram realizados em uma célula de filtração *dead-end* confeccionada com aço inoxidável, com capacidade volumétrica de 200 mL e área filtrante útil de $0,00145 m^2$. Para minimizar a formação da camada polarizada e do *fouling*, uma barra magnética foi colocada no interior da célula de filtração a uma distância de 0,5 cm da superfície da membrana, que foi mantida sob agitação durante todo o experimento (500 rpm). A força motriz dos ensaios de permeação foi a pressão exercida pela injeção de gás nitrogênio na parte superior da célula. A pressão foi regulada por um manômetro (0-15 bar) acoplado a um cilindro de gás. O permeado foi coletado por uma válvula micrométrica coletora *on-off* (Swagelok, modelo SS-42GS4). A Figura 9 representa o diagrama esquemático do aparato experimental utilizado nesse trabalho.

Figura 9: Esquema do sistema de filtração *dead-end* utilizado nos ensaios de permeação.



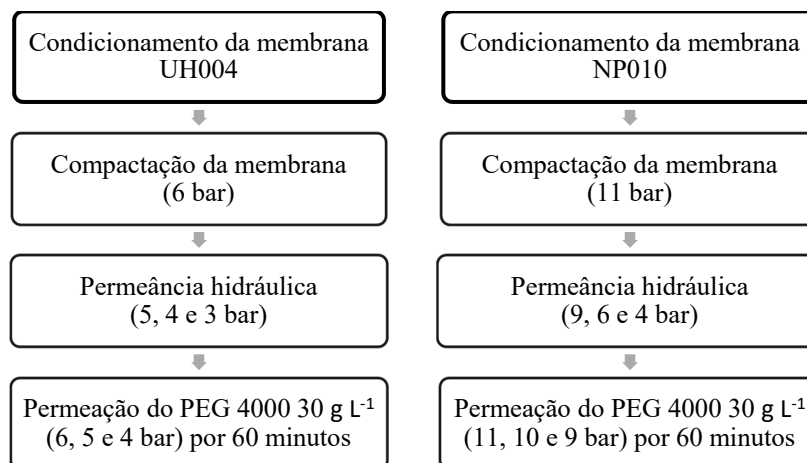
Fonte: Adaptado de Proner, 2018.

4.1.4 Estudo da rejeição das membranas ao PEG 4000

Para determinar qual membrana seria mais adequada para separar o PEG e o 2,3-BDO, foram realizados ensaios de rejeição do PEG pelas membranas UH004 e NP010. Nessa etapa utilizou-se soluções aquosas de PEG 4000 numa concentração média de 30 g L^{-1} , é importante salientar que essa concentração do PEG 4000 nos ensaios de rejeição foi definida a partir de testes preliminares de filtração do SAB. A fase de topo do SAB possui uma concentração elevada, aproximadamente 300 g L^{-1} . Devido a limitações operacionais, a máxima pressão atingida pelo aparato experimental era de 11 bar. Para reduzir a pressão osmótica da alimentação e assim permitir a operação do sistema a uma pressão mais baixa, a fase de topo do SAB foi diluída em 10 vezes ficando com uma concentração média de 30 g L^{-1} .

As membranas utilizadas nos ensaios de rejeição foram previamente condicionadas em etanol PA 99% por 2 horas, enxaguadas com água destilada e posteriormente mantidas submersas em água destilada por 12 horas. Em seguida, realizou-se o procedimento de compactação de cada membrana, UH004 a 6 bar por 1 hora e NP010 a 11 bar por 2 horas. A Figura 10 mostra um fluxograma das etapas seguidas na determinação da rejeição das membranas ao PEG.

Figura 10: Fluxograma do estudo de rejeição do PEG 4000 pelas membranas UH004 (a) e NP010 (b).



Fonte: Elaborada pelo autor deste trabalho (2020)

O fluxo de permeado (J) corresponde à vazão do permeado por unidade de área ($\text{L h}^{-1} \text{ m}^{-2}$), calculado de acordo com a Equação 10:

$$J = \frac{V_p}{t \times A} \quad (10)$$

Sendo: V_p o volume de permeado coletado por um tempo t (horas), e A a área de permeação da membrana (m^2).

Após a compactação, foi determinada a permeância hidráulica a partir do coeficiente angular resultante do ajuste linear dos valores de fluxo de permeado *versus* pressão de operação. Os fluxos de permeado foram medidos a cada dez minutos até obtenção de valores constantes (três medidas consecutivas com diferença menor ou igual a 5 % entre elas).

Definida a permeância hidráulica da membrana, iniciou-se a etapa de permeação da solução aquosa de PEG 4000 para o estudo de sua rejeição pelas membranas. Nessa etapa avaliou-se o efeito da variação da pressão sobre a rejeição do PEG. Três diferentes pressões foram estudadas para cada uma das membranas. Para os cálculos da rejeição da membrana ao PEG 4000, foram coletadas alíquotas do permeado a cada 10 minutos. A rejeição observada foi calculada de acordo com a Equação 11:

$$R_{obs} = 1 - \frac{C_p}{C_b} \quad (11)$$

Sendo: C_p a concentração do soluto no permeado e C_b a concentração do soluto na alimentação.

4.1.5 Quantificação do PEG 4000

A concentração do PEG foi determinada por refratometria. Utilizou-se o refratômetro manual da Quimis Q767A1 para medir o índice de refração das soluções (em °Brix). Uma curva de calibração foi construída para tornar possível a determinação da concentração de PEG.

4.1.6 Estudo da rejeição das membranas ao 2,3-butanodiol

Para avaliar a rejeição das membranas ao 2,3-BDO, foram reproduzidas as etapas de condicionamento das membranas, compactação e permeância hidráulica nas mesmas condições descritas na Seção 4.1.4. As etapas estão esquematizadas na Figura 11.

Figura 11: Fluxograma do estudo de rejeição do 2,3-BDO pelas membranas UH004 (a) e NP010 (b) e BW30 (c).



Fonte: Elaborada pelo autor deste trabalho (2020)

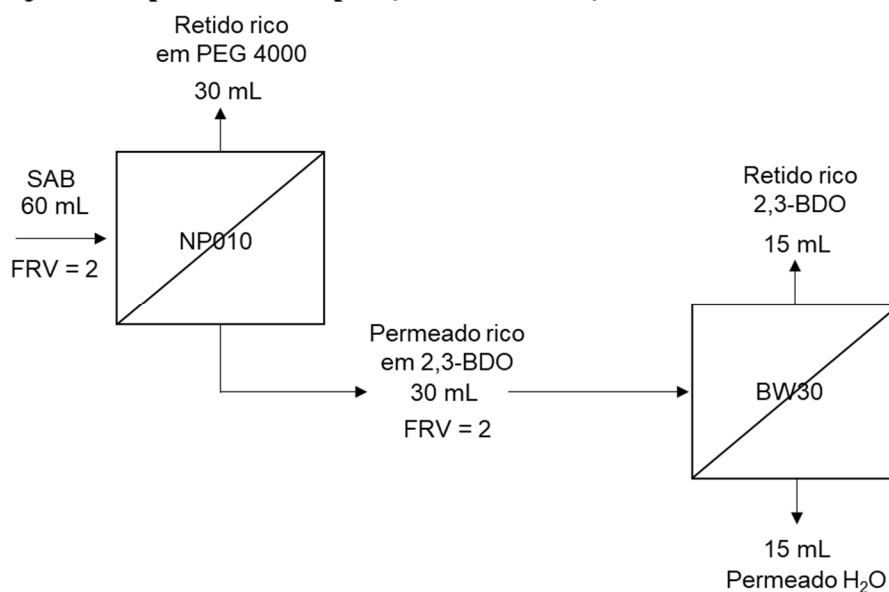
As membranas UH004 e NP010 foram caracterizadas para avaliar o possível uso na etapa de separação, na qual se deseja uma baixa rejeição ao 2,3-BDO e alta rejeição ao PEG. Além dessas duas membranas, uma membrana de osmose inversa (BW30) foi testada buscando seu uso na etapa de concentração caso tivesse alta rejeição ao 2,3-BDO.

Para esse estudo, utilizou-se soluções aquosas de 2,3-BDO numa concentração média de 2 g L⁻¹, essa concentração foi determinada a partir de testes preliminares de filtração do SAB. Como descrito na seção 4.1.4, a fase de topo do SAB possui uma concentração elevada de PEG 4000, foi necessário a diluição da fase de topo do SAB em 10 vezes para reduzir a pressão osmótica da alimentação e possibilitar a filtração do SAB. O 2,3-BDO no permeado foi quantificado de acordo com o procedimento descrito na seção 3.1.6.

4.1.7 Separação e concentração do 2,3-butanodiol a partir do sistema PEG 4000-fosfato

Após os testes de rejeição de PEG e 2,3-BDO selecionou-se a membrana NP010, que apresentou a melhor rejeição ao PEG e uma baixa rejeição para o 2,3-BDO. Posteriormente, o 2,3-BDO foi concentrado pela membrana de osmose inversa BW30. A Figura 12 ilustra o processo separação e concentração do 2,3-DO proposto nesse trabalho.

Figura 12: Diagrama do processo de separação e concentração do 2,3-BDO extraído no SAB.



Fonte: Elaborada pelo autor deste trabalho (2020)

Os procedimentos de compactação, determinação do fluxo de permeado e da permeância hidráulica da membrana NP010 foram realizados conforme descrito na seção 4.1.4. A alimentação utilizada nos ensaios consistiu na fase de topo do sistema PEG 4000-fosfato diluída 10 vezes, totalizando um volume de 60 mL. As concentrações médias dos constituintes na alimentação foram iguais a $0,8 \text{ g L}^{-1}$ de 2,3-BDO e 30 g L^{-1} de PEG 4000.

A etapa de separação foi realizada sob agitação, 500 rpm e pressão constantes a 9 bar. Utilizou-se fator de redução volumétrico (FRV) igual a 2. Os ensaios foram realizados em triplicata. Para a obtenção da curva de fluxo permeado da solução ao longo do tempo de filtração, alíquotas de permeado foram coletadas a cada 10 minutos. Ao final do processo alíquotas de permeado e retido foram coletadas e analisadas para determinar a concentração de PEG e 2,3-BDO.

Para a etapa de concentração do 2,3-BDO, a membrana BW30 foi previamente condicionada conforme descrito na seção 4.1.4. Em seguida, realizou-se o procedimento de compactação a 11 bar. O fluxo permeado foi medido a cada 10 minutos até obtenção de valores constantes (três medidas consecutivas com diferença entre elas menor ou igual a 5%) e foram calculados de acordo com a Equação 10. A permeância hidráulica foi obtida a partir do coeficiente angular resultante do ajuste linear dos valores de fluxo de permeado *versus* pressão.

A alimentação utilizada nos ensaios de concentração do 2,3-BDO consistiu nos 30 mL de permeado da NP010 obtido na etapa anterior. A concentração média do 2,3-BDO na alimentação foi de $0,8 \text{ g L}^{-1}$. A permeação foi realizada sob agitação de 500 rpm e pressão

constante a 9 bar. Utilizou-se fator de redução volumétrico (FRV) igual a 2. Os ensaios foram realizados em duplicata. Ao final do processo alíquotas de permeado e retido foram coletadas e analisadas para determinar a concentração de PEG e 2,3-BDO.

4.1.8 Determinação do *fouling*

Ao final das permeações, foi realizado o procedimento de limpeza física que consistiu na utilização de 30 mL de água ultrapura, sob agitação, 500 rpm, por 10 minutos, mantendo a membrana acoplada na célula, sem pressurizar. Após o procedimento de limpeza, mediu-se a permeância hidráulica para obter a recuperação do fluxo permeado (R_f) de água em relação ao inicial, conforme Equação 12.

$$R_f (\%) = \frac{P_f}{P_i} \times 100 \quad (12)$$

Sendo P_f a permeância após a limpeza física e P_i a permeância inicial.

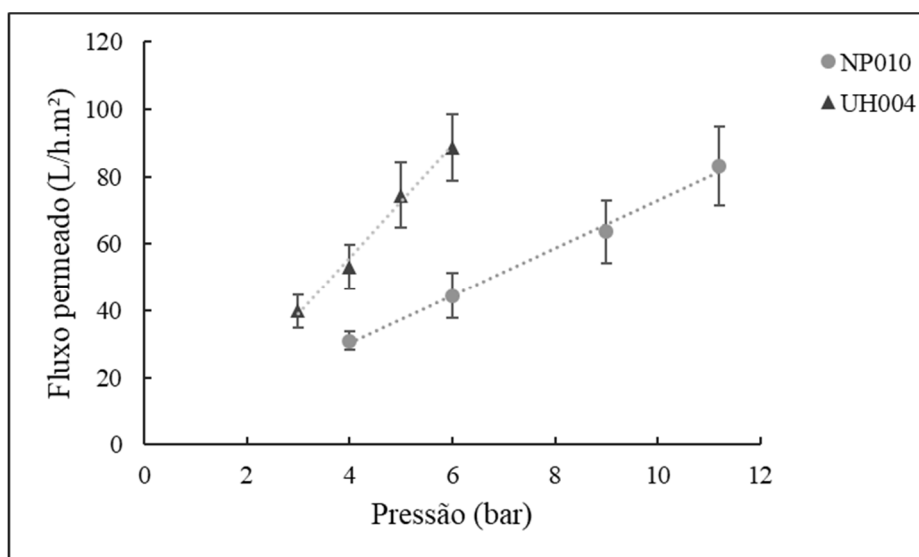
4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2.1 Rejeição das membranas UH004 e NP010 ao PEG 4000

As membranas NP010 e UH004 foram selecionadas com base na massa molar do PEG 4000 Da. A membrana UH004 possui MMC de 4000 Da, ou seja, 92 a 99 % do soluto é retido pela membrana de acordo com os dados do fabricante (Tabela 12). A membrana NP010 possui massa molar de corte (MMC) 1200 Da quando compactada em pressões maiores que 40 bar, porém devido a limitações operacionais a pressão máxima alcançada nos ensaios de compactação foi de 11 bar.

A Figura 13 apresenta o comportamento do fluxo de permeado com a variação da pressão para as duas membranas. Os dados foram utilizados para obter a permeância hidráulica das membranas novas, ou seja, antes de realizar os testes com o sistema SAB.

Figura 13: Permeância hidráulica inicial das membranas UH004 e NP010.

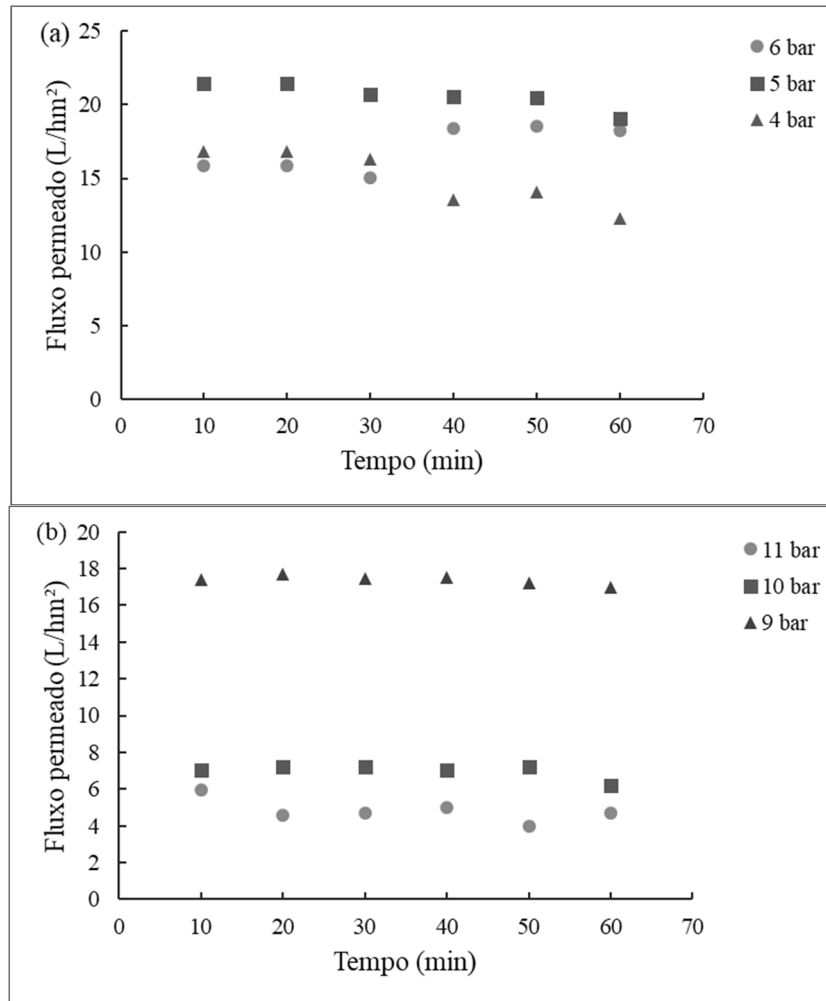


Fonte: Elaborada pelo autor deste trabalho (2020)

A permeância hidráulica das membranas UH004 e NP010 são iguais a 14,39 e 7,34 L m⁻² h⁻¹, respectivamente. O maior valor de permeância para a membrana de ultrafiltração era esperado, uma vez que esse parâmetro depende, dentre outros fatores, das características morfológicas da membrana. Como a UH004 apresenta maior massa molar de corte (relacionada ao tamanho dos poros), o fluxo de água por essa membrana é maior porque há uma menor resistência ao transporte de água.

O desempenho das membranas UH004 e NP010 com relação à rejeição ao PEG 4000 foi investigado sob diferentes pressões, para analisar se a variação do fluxo de permeado interferiria na rejeição do soluto. A Figura 14 mostra o perfil do fluxo de permeado ao longo do tempo para diferentes pressões.

Figura 14: Fluxo permeado obtido nas membranas UH004 (a) e NP010 (b) durante os ensaios de rejeição do PEG 4000 (30g/L) em diferentes pressões.



Fonte: Elaborada pelo autor deste trabalho (2020)

A membrana UH004 apresentou fluxo permeado entre 12 e 23 $\text{L m}^{-2} \text{h}^{-1}$ para as três pressões de alimentação avaliadas, enquanto a NP010 apresentou fluxo de permeado igual a 15 $\text{L m}^{-2} \text{h}^{-1}$ nos ensaios com pressão a 9 bar, e próximo a 7 $\text{L m}^{-2} \text{h}^{-1}$ para as pressões de 10 e 11 bar. Nota-se que o único caso em que houve variação do fluxo permeado com o tempo é o da membrana de ultrafiltração operando a 4 bar, a qual apresentou redução do fluxo de cerca de 30 % do início até o final do teste. Apesar dessa redução ser considerável, não é possível relacionar com alguma alteração do processo, uma vez que a concentração de soluto na alimentação se manteve constante em 10,37 g L^{-1} . A Tabela 13 apresenta os resultados obtidos com relação à rejeição das membranas ao longo do tempo e para cada pressão testada.

Tabela 13: Rejeição observada (R_{obs} %) nas membranas UH004 e NP010 para o PEG 4000 (30 g L^{-1}) nas diferentes pressões estudadas.

Tempo de permeação (min)	Membrana UH004			Membrana NP10			
	6 bar	5 bar	4 bar	11 bar	10 bar	9 bar	9 bar
	R_{obs} (%)	R_{obs} (%)	R_{obs} (%)	R_{obs} (%)	R_{obs} (%)	R_{obs} (%)	R_{obs} (%)
10	20,0	57,0	64,0	80,0	50,0	93,0	87,0
20	13,0	64,0	64,0	67,0	38,0	87,0	87,0
30	13,0	64,0	64,0	60,0	31,0	87,0	80,0
40	33,0	64,0	64,0	60,0	31,0	87,0	80,0
50	33,0	64,0	57,0	53,0	38,0	87,0	80,0
60	33,0	64,0	64,0	53,0	38,0	87,0	80,0

Fonte: Elaborada pelo autor deste trabalho (2020)

Pode-se observar que a rejeição das membranas UH004 e NP010 variou consideravelmente ao utilizar pressões diferentes. Para a membrana UH004, a rejeição ao PEG 4000 aos 60 minutos foi de 33 % na pressão de 6 bar, e de 64 % nas pressões de 4 e 5 bar. Assim, não há indícios de que o aumento do fluxo permeado pelo aumento da pressão tenha afetado a rejeição da membrana de ultrafiltração. Provavelmente, um dos motivos para a baixa seletividade das membranas ao PEG 4000 seja a variação do tamanho molecular do soluto. O PEG adquirido para os experimentos possui massa molar média de 4000 Da, mas essa massa molar pode ser dispersa, apresentando frações de tamanhos menores que 4000 Da. No PEG 6000 por exemplo, adquirido na mesma empresa, a massa molar do produto varia de 5400 a 6600. No caso do PEG 4000 Da o fabricante não informa quanto é essa dispersão de massa molar. A estrutura da molécula também é um fator importante na rejeição do soluto pela membrana. O PEG 4000 é um polímero linear, o que pode facilitar seu transporte através da membrana. Se um soluto tem uma menor massa molar e uma conformação globular, esse pode apresentar uma rejeição maior pela membrana (BAKER, 2012).

A rejeição da membrana NP010 aos 60 minutos foi igual a 87 % e 80 % na pressão de 9 bar, e igual a 38 % e 53 % nas pressões de 10 e 11 bar. O processo de nanofiltração tem como força motriz a diferença de pressão através da membrana (ΔP). O aumento do ΔP favorece o fluxo convectivo de soluto e solvente através da membrana e também pode intensificar o aumento da concentração de soluto próximo a superfície da membrana, criando uma resistência ao escoamento e levando à formação de fenômenos como a polarização por concentração. Tanto o aumento do fluxo convectivo de soluto quanto a formação da camada polarizada, são fatores

que interferem no desempenho da membrana pois podem reduzir sua seletividade, que é medida através da R_{obs} , e o seu fluxo permeado. Na Figura 14 (b) observou-se que o melhor desempenho da NP010 foi no menor ΔP (9bar) sendo a R_{obs} de 87 % e o fluxo permeado de $15 \text{ L h}^{-1} \text{ m}^{-2}$. O aumento ΔP na NP010 resultou na redução do desempenho da membrana, o fluxo permeado para as pressões de 10 e 11 bar foi próximo a $7 \text{ L h}^{-1} \text{ m}^{-2}$. Mesmo que não tenha sido observada uma relação direta entre aumento ΔP e o valor de R_{obs} , houve a redução da seletividade da NP010 nas pressões maiores, de 10 e 11 bar, a R_{obs} foi de 38 % e 53 % respectivamente. Os resultados obtidos são indícios de que o aumento do ΔP na NP010 pode ter favorecido o fluxo convectivo de PEG 4000 através da membrana, reduzindo sua seletividade.

A rejeição relativamente melhor da NP010 era esperada, uma vez que a membrana possui massa molar de corte menor que a de ultrafiltração. Nesse caso, mesmo não realizando a compactação a 40 bar, para trabalhar com MMC 1200 Da como informado pelo fabricante, obteve-se uma boa seletividade para o PEG 4000. O transporte de solutos pela membrana de nanofiltração é complexo, diferentes mecanismos estão envolvidos. A convecção é um deles, e ocorre devido a diferença de pressão aplicada no processo. A difusão ocorre devido ao gradiente de concentração através da membrana. Outros mecanismos estariam ligados às repulssões eletrostáticas que podem existir entre a superfície de uma membrana e o soluto. As propriedades do soluto como hidrofobicidade, massa molar, e constante de ionização também interferem na rejeição e transporte de soluto pela membrana (MULDER, 1996). É provável que as interações entre soluto e membrana não tenham grandes contribuições sobre a rejeição do PEG na membrana de nanofiltração, pois ela é de polietersulfona, na qual os grupos sulfônicos conferem uma ligeira carga negativa para essa membrana, enquanto o PEG 4000 é um composto não iônico, neutro.

4.2.2 Rejeição das membranas UH004, NP010 e BW30 ao 2,3-BDO

Os ensaios de rejeição das membranas UH004 e NP010 ao 2,3-BDO foram realizados nas melhores condições de processo obtida na rejeição do PEG 4000, ou seja, aquele com maior retenção de PEG. A seletividade do 2,3-BDO na membrana de osmose inversa BW30 também foi analisada, conforme proposto (Figura 11), o processo envolve a separação e concentração do 2,3-BDO extraído no SAB. A rejeição observada das membranas ao 2,3-BDO é apresentada na Tabela 14.

Tabela 14: Rejeição observada (R_{obs}) nas membranas UH004 (5 bar), NP010 (9 bar) e BW30 (9 bar) para o 2,3-BDO (2 g L^{-1}).

Tempo de permeação (min)	UH004	NP010	BW30
	R_{obs} (%)	R_{obs} (%)	R_{obs} (%)
10	0,0	2,0	88,0
20	0,0	4,0	88,0
30	0,0	4,0	88,0
40	0,0	2,0	88,0
50	2,0	4,0	88,0
60	0,0	0,0	88,0

Fonte: Elaborada pelo autor deste trabalho (2020)

Observa-se que as membranas UH004 e NP010 apresentaram bons resultados para a rejeição do 2,3-BDO, sendo os valores de R_{obs} igual ou muito próxima a zero, resultado condizente, considerando que a massa molar do 2,3-BDO é pequena, 90 g mol^{-1} , comparada à massa molar de corte das membranas. Como discutido anteriormente, os mecanismos de transporte nas membranas de nanofiltração são mais complexos e dependem de vários fatores, entre eles carga de superfície da membrana e as propriedades do soluto, por exemplo, hidrofobicidade e constante de ionização. Numa membrana NF que tem grupos carregados negativamente ligados ao polímero, moléculas que também possui carga negativa, têm uma rejeição maior que aquelas que possuem carga positiva. Esse fenômeno de interação entre membrana e soluto em função das cargas e polaridade da partícula é denominado efeito de exclusão de Donnan (BAKER, 2007; KUCERA, 2010). A constante de ionização do 2,3-BDO é baixa $pK_a = 14,9$ (Tabela 1) e a solução aquosa de 2,3-BDO (2 g L^{-1}) utilizada nas permeações possui $pH = 4,4$. Se o pH da solução é menor que o pK_a do 2,3-BDO, uma fração muito pequena do 2,3-BDO se encontra na forma ionizada, de base conjugada. Essa pequena fração ionizada, que apresenta carga negativa pode ter sido repelida pela membrana que também possui carga negativa, o que pode ter contribuído para a rejeição de 2,6 % da NP010.

A membrana BW30, é uma membrana de osmose inversa (OI), cuja rejeição ao NaCl ($58,44 \text{ g/mol}$) é igual a 99,5 % de acordo com o fabricante. Para o 2,3-BDO, a membrana apresentou rejeição igual a 88 %, um pouco abaixo do verificado na literatura. Davey et al., (2016) trabalharam com a purificação e concentração de 2,3-BDO de meio fermentado. Nos estudos de seletividade de membranas, os autores observaram uma rejeição de 96 % e permeância hidráulica de $1,27 \text{ kg h}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ bar}$ para o mesmo tipo de membrana (BW30). A permeância é calculada a partir do coeficiente angular resultante do ajuste linear dos valores de fluxo de permeado *versus* pressão de operação. O valor de permeância hidráulica obtida nesse

trabalho foi três vezes maior ($3,87 \text{ L h}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ bar}$). Esse fato pode estar relacionado à menor pressão de compactação e operação utilizada nos testes, interferindo nas medidas de permeabilidade hidráulica e seletividade. A Tabela 15 mostra uma síntese do desempenho das membranas na permeação do PEG 4000 e do 2,3-BDO.

Tabela 15: Comparativo da permeância e rejeição observada nas membranas UH004, NP010 e BW30 para o PEG 4000 (30 g L^{-1}) e 2,3-DBO (2 g L^{-1}).

Membrana	Pressão (bar)	Permeância ($\text{L/h m}^2 \text{ bar}$)	PEG 4000	2,3-BDO
			R _{obs} (%)	R _{obs} (%)
UH004	5,0	13,9	64,0	0,0
NP010	9,0	7,3	87,0	2,6
BW30	9,0	3,9	-	88,0

Fonte: Elaborada pelo autor deste trabalho (2020)

Assim, dentro das condições investigadas, as membranas com melhor desempenho para o *downstream* do 2,3-BDO extraído no SAB são: a membrana NP010 para etapa de separação do 2,3-BDO do PEG e a membrana BW30 para a etapa de concentração do 2,3-BDO.

4.2.3 Separação e concentração do 2,3-butanodiol contido na fase de topo do SAB

Após avaliar a rejeição individual dos solutos presentes na fase de topo do SAB e escolhida a condição de operação, foram realizados os ensaios de permeação dessa mistura de constituintes como descrito na seção 4.1.7 e na Figura 11. Os resultados obtidos nas etapas de separação e concentração do 2,3-BDO são apresentados na Tabela 16.

Tabela 16: Rejeição observada nas membranas NP010 e BW30 na separação e concentração do 2,3-DBO extraído no SAB PEG 4000-fosfato.

Solute	NP010				BW30		
	Alimentação (g L^{-1})	Permeado (g L^{-1})	Retido (g L^{-1})	R _{obs} (%)	Permeado (g L^{-1})	Retido (g L^{-1})	R _{obs} (%)
2,3-BDO	$0,93 \pm 0,02$	$0,82 \pm 0,01$	$0,73 \pm 0,02$	11,92	$0,00 \pm 0,00$	$1,32 \pm 0,00$	100,00
PEG 4000	$42,87 \pm 2,40$	$17,98 \pm 3,17$	$68,46 \pm 3,59$	58,07	$0,00 \pm 0,00$	$31,11 \pm 5,49$	100,00

Fonte: Elaborada pelo autor deste trabalho (2020)

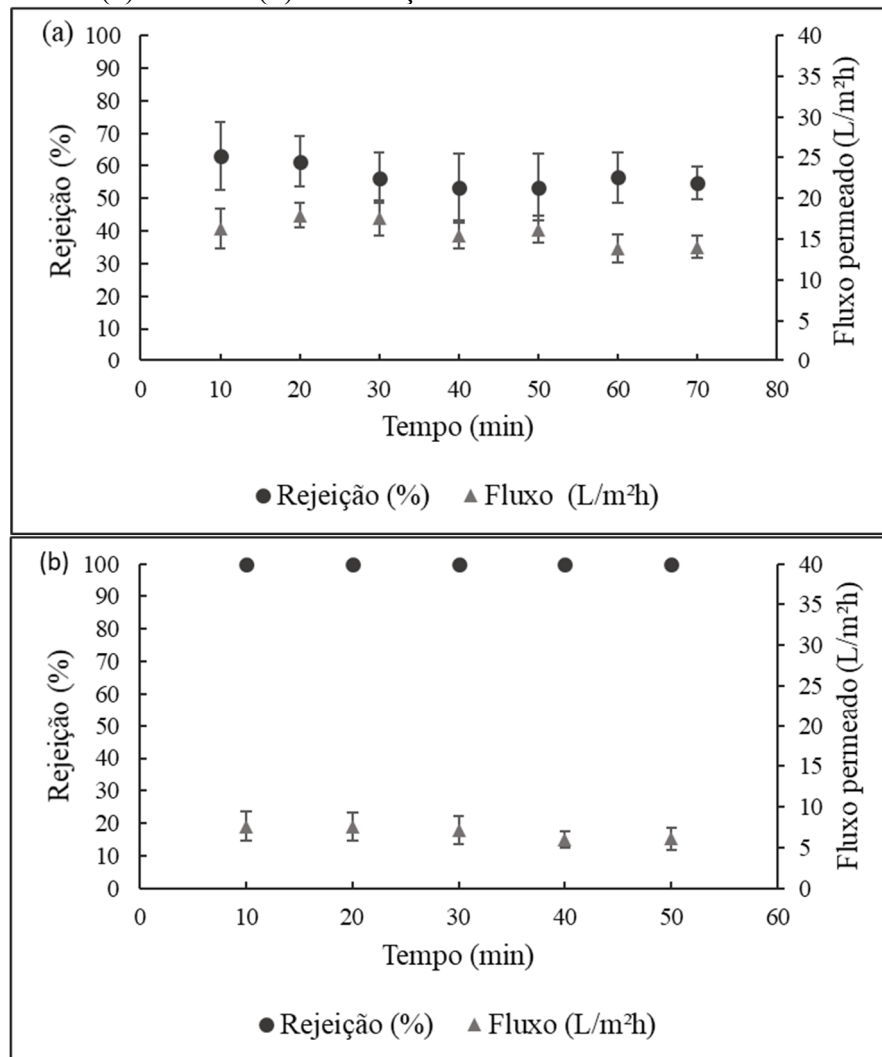
É importante salientar que, conforme comentado nos materiais e métodos, a alimentação consistiu na fase de topo do sistema SAB, diluída em 10 vezes. Esse ajuste foi necessário para reduzir a pressão osmótica da alimentação e assim permitir a operação do

sistema a uma pressão mais baixa. Devido a limitações operacionais, a máxima pressão atingida pelo aparato experimental era de 11,2 bar. Além disso, quando se aumenta muito a concentração de soluto na alimentação há o favorecimento da formação de camada gel e do *fouling*. Esses fenômenos prejudicam o desempenho da membrana, pois levam ao decréscimo de fluxo permeado, devido ao aumento da pressão osmótica na superfície da membrana, e também promovem a redução da seletividade, devido ao aumento da passagem de soluto através da membrana.

Na Tabela 16 observa-se que a rejeição do 2,3-BDO na NP010 ficou acima dos 2,6 % obtidos no teste com o soluto puro. A presença de sais fosfato na fase de topo do SAB pode ter interferido na rejeição do 2,3-BDO, assim como as interações entre PEG e 2,3-BDO também podem ter contribuído para esse comportamento. Nos ensaios de extração utilizando o SAB observou-se a afinidade que há entre o 2,3-BDO e o PEG. O 2,3-butanodiol é um diálcool, possui duas hidroxilas ligadas a cadeia de carbono, portanto é uma molécula polar, solúvel em água, assim como o PEG. O sal fosfato de potássio utilizado no preparo do SAB sofre dissociação quando dissolvido em água, liberando uma determinada quantidade (mol) de cátion e ânion. É provável que esses íons afetem as interações entre soluto-soluto e as interações entre soluto membrana (MORITA, 2007).

Por outro lado, a rejeição da membrana NP010 ao PEG 4000 ficou abaixo dos 87 % observados nos ensaios de rejeição com esse o soluto puro. É provável que, por ter sido determinada por refratometria (seção 4.1.5), a concentração de PEG tenha sido afetada pela presença do 2,3-BDO, tanto na alimentação como no permeado. Mesmo em pequenas concentrações de 2,3-BDO ($0,2 \text{ g L}^{-1}$), o refratômetro apresenta sensibilidade a sua presença por atuar a partir do índice de refração. Portanto, nesse ensaio de filtração da fase de topo do SAB, é possível que os valores de concentração de PEG estejam superestimados. Para investigar melhor esse fato, a área relativa do PEG foi medida em HPLC e uma comparação entre as amostras foi feita. Foi possível observar que houve uma redução de 73 % da área relativa do PEG no permeado, o que condiz mais com os estudos de rejeição individual desse soluto. A Figura 15 mostra o comportamento do fluxo permeado e da rejeição das membranas NP010 e BW30 ao PEG.

Figura 15: Fluxo de permeado e rejeição observada para o PEG 4000 nas membranas NP010 (a) e BW30 (b) na filtração do SAB PEG 4000-fosfato.



Fonte: Elaborada pelo autor deste trabalho (2020)

Notas: Condições de operação: 25 °C, 9 bar, agitação magnética 500 rpm.

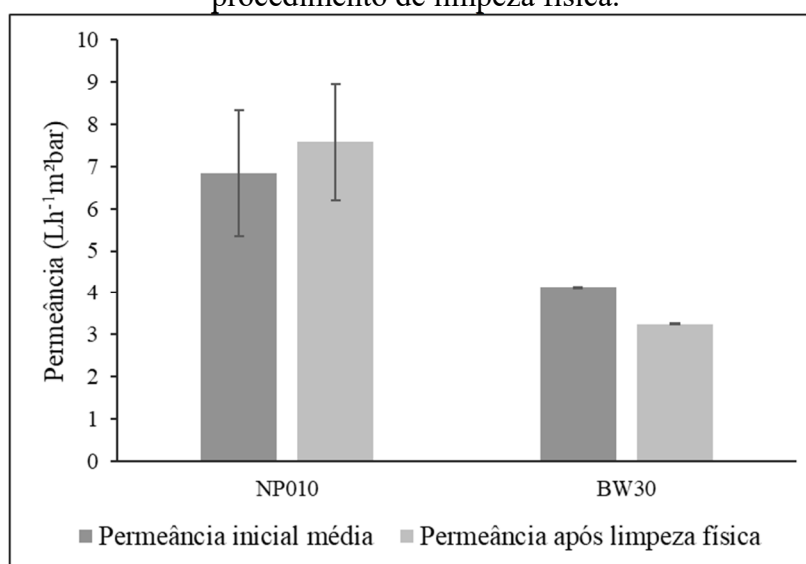
Tanto a membrana NP010 quanto a BW30 não apresentaram quedas relevantes no fluxo de permeado e na rejeição ao longo do tempo, o que indica que não houve polarização por concentração acentuada e *fouling*. As membranas de NF são mais fechadas e estão menos suscetíveis à incrustação. De acordo com Baker (2004), a queda de fluxo nas membranas de MF é mais acentuada que nas membranas de UF e NF, porque as membranas de MF apresentam maior diâmetro de poro o que facilita a entrada de solutos de vários tamanhos e contribui para o aumento da incrustação.

4.2.4 Recuperação do desempenho das membranas após permeação do SAB

Após os experimentos de permeação do SAB, as membranas foram lavadas com água destilada e o fluxo de água pura foi medido. A Figura 16 mostra os resultados de recuperação da permeância hidráulica das membranas.

Os resultados apresentados na Figura 16 mostram que a membrana NP010 não foi afetada pelo *fouling*, pois após a limpeza física, a permeância foi totalmente recuperada. Por outro lado, a BW30 foi mais afetada pelo *fouling*, uma vez que após sua limpeza, apenas 80% do fluxo inicial foi recuperado. A presença dos sais fosfato de potássio na alimentação podem ter contribuído para a formação da incrustação nessa membrana. A polarização por concentração, explicada na seção 2.2.3, é inerente a todo processo de separação por membranas; esse fenômeno é reversível, porém, a sua ocorrência pode dar origem a outros tipos de fenômenos irreversíveis como o *fouling* (HABERT et al., 2006). Vela et al. (2008) utilizaram o modelo de Hermia para filtração *dead-end* e analisaram os mecanismos de incrustação em membrana de ultrafiltração com MMC de 15 kg mol^{-1} na permeação de PEG 35 kg mol^{-1} . Os autores observaram que durante os experimentos de ultrafiltração do PEG, diferentes mecanismos de incrustação ocorreram, foi observado o bloqueio completo, o bloqueio intermediário e a formação da camada de torta.

Figura 16: Recuperação da permeância hidráulica das membranas NP010 e BW30 após procedimento de limpeza física.



Fonte: Elaborada pelo autor deste trabalho (2020)

A formação das incrustações aumenta os custos operacionais, pois gera uma maior demanda de energia devido ao aumento da pressão de operação necessário para

compensar a redução do fluxo de permeado. Limpezas mais frequentes também são necessárias, o que aumenta os gastos com produtos químicos e reduz significativamente o tempo de vida útil das membranas (MULDER, 1996). Nesse trabalho, apenas a limpeza física utilizando água destilada foi suficiente para recuperar 100 % da permeância inicial da NP010, um indício de que o processo de separação tenha sido mais brando, o que talvez acarrete numa maior vida útil dessa membrana.

4.3 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS

O objetivo desse capítulo foi investigar o desempenho de diferentes membranas poliméricas na etapa de purificação do 2,3-BDO extraído em sistema aquoso bifásico formado por PEG-fosfato de potássio. O desempenho das membranas UH004, NP010 e BW30 foi analisado em função das seletividades e fluxos.

Para etapa de separação foram eleitas as membranas UH004 e NP010. Os resultados obtidos, mostram que a membrana NP010 apresentou um desempenho melhor que a UH004 na separação do 2,3-BDO extraído no SAB, pois além de apresentar alta rejeição ao PEG, R_{obs} de 87 % contra R_{obs} de 64% na UH004, a NP010 teve um fluxo permeado ($15 \text{ L h}^{-1} \text{ m}^{-2}$ a 9 bar) próximo a UH004 ($23 \text{ L h}^{-1} \text{ m}^{-2}$ a 5 bar).

Constatou-se que na membrana UH004 a separação do PEG e do 2,3-BDO ocorreram principalmente em função da massa molar de corte da membrana (MMC), enquanto para a membrana NP010 há indícios de que fenômenos de interação entre soluto-soluto e soluto-membrana, o efeito de exclusão de Donnan, também tenham contribuído com a rejeição do 2,3-BDO uma vez que a membrana escolhida tem carga negativa assim como a solução de 2,3-BDO a pH 4,4. Também foi observado que a variação do fluxo de permeado, feita através da aplicação de diferentes pressões transmembrana, interferiu na seletividade da NP010, enquanto que nenhuma correlação entre variação de fluxo e rejeição do PEG foi observada para a membrana UH004.

Os resultados mostraram que a NP010 é uma membrana com potencial para separação do 2,3-BDO extraído no SAB, pois além de apresentar uma boa seletividade, alta rejeição ao PEG e baixa rejeição ao 2,3-BDO, a NP010 também exibiu um bom fluxo permeado, que não sofreu redução expressiva ao longo do tempo. Na membrana NP010 houve recuperação de 100 % do fluxo permeado inicial após a limpeza física.

Para etapa de concentração foi eleita a BW30, essa membrana apresentou uma boa

seletividade ao 2,3-BDO extraído no SAB, a R_{obs} foi de 100 %. Durante a concentração do 2,3-BDO, não foi observada a redução expressiva do fluxo permeado ao longo do tempo, porém após realizar a limpeza física dessa membrana, apenas 80 % do fluxo permeado inicial foi recuperado, indício da formação de *fouling*.

5 CONCLUSÕES

O objetivo desse trabalho foi avaliar se o sistema aquoso bifásico, formado por PEG-sal, associado à tecnologia de separação por membranas seriam eficazes na extração e purificação do 2,3-BDO.

Os resultados obtidos para a recuperação e coeficiente de partição do 2,3-BDO no SAB formado por PEG-sal, demonstram que esses sistemas foram eficazes na extração do 2,3-BDO. A extração de moléculas em SAB é um fenômeno complexo, nesse estudo conclui-se que vários foram os fatores que contribuíram para a extração do 2,3-BDO. Os resultados obtidos evidenciam a afinidade do 2,3-BDO pela fase polimérica do SAB, uma vez que $K > 1,0$ em 87,0 % dos ensaios realizados. O sistema que apresentou melhor desempenho na extração do 2,3-BDO foi o SAB constituído por PEG 4000-fosfato. Nesse sistema o coeficiente de partição obtido foi 2,37, ou seja, a concentração de 2,3-BDO na fase de topo foi quase três vezes maior que a concentração na fase de fundo, a recuperação também foi expressiva, chegando a 94,2 %. Entre os fatores identificados que possibilitaram o melhor desempenho do SAB PEG 4000-fosfato estão o poder de solvatação desse sal, que é maior que os demais, a concentração dos constituintes no sistema e a menor massa molar do PEG 4000 que podem ter interferido na viscosidade das fases e conseqüentemente na transferência de massa do 2,3-BDO no sistema.

Para a etapa seguinte, de purificação do 2,3-BDO extraído no SAB, a proposta foi utilizar diferentes processos de separação por membranas e investigar qual deles apresentaria o melhor desempenho na separação e concentração do 2,3-BDO. Os resultados de desempenho da permeação, como permeância hidráulica inicial, seletividade da membrana e fluxo permeado mostraram que a membrana de nanofiltração NP010 apresentou um desempenho melhor que a membrana de ultrafiltração UH004 na etapa de separação do 2,3-BDO dos demais solutos presentes no SAB. O melhor desempenho da membrana NP010 pode ser atribuído a sua menor massa molar de corte 1200 Da e a outros fenômenos de interação entre soluto-soluto e soluto-membrana que possivelmente contribuíram para a separação dos solutos presentes na alimentação. A membrana BW30, utilizada na etapa de concentração do 2,3-BDO também

apresentou um bom desempenho, pois além de apresentar uma alta seletividade, também exibiu um bom fluxo permeado, que não sofreu redução expressiva ao longo do tempo. Os resultados mostraram que as membranas NP010 e BW30 são uma boa alternativa para separação e concentração do 2,3-BDO extraído no SAB.

Por fim, com este estudo foi possível concluir a associação do SAB com a tecnologia de separação por membranas é uma proposta promissora de processo *downstream* do 2,3-BDO, uma vez que ambas operações unitárias apresentaram resultados efetivos dentro das aplicações propostas por esse trabalho.

REFERÊNCIAS

- ASENJO, J. A.; ANDREWS, B. A. Aqueous two-phase systems for protein separation: A perspective. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 49, p. 8826–8835, 9 dez. 2011.
- BAKER, R. W. **Membrane Technology and Applications**. [s.l: s.n.].
- BIRAJDAR, S. D. et al. Continuous predispersed solvent extraction process for the downstream separation of 2,3-butanediol from fermentation broth. **Separation and Purification Technology**, v. 151, p. 115–123, 2015.
- BLATKIEWICZ, M. et al. Partitioning of laccases derived from *Cerrena unicolor* and *Pleurotus sapidus* in polyethylene glycol – phosphate aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**, v. 67, p. 165–174, 1 abr. 2018.
- BOLAR, S.; BELUR, P. D.; IYYASWAMI, R. Partitioning studies of glutaminase in polyethylene glycol and salt-based aqueous two-phase systems. **Chemical Engineering and Technology**, 2013.
- BUARQUE, F. S. et al. Simultaneous concentration and chromatographic detection of water pesticides traces using aqueous two-phase system composed of tetrahydrofuran and fructose. **Microchemical Journal**, v. 147, p. 303–310, 1 jun. 2019.
- CAI, C. et al. Deep eutectic solvents used as adjuvants for improving the salting-out extraction of ursolic acid from *Cynomorium songaricum* Rupr. in aqueous two-phase system. **Separation and Purification Technology**, 2019.
- CAMARGO, B. R. DE. **Genômica funcional de *Clostridium thermocellum* em diferentes condições de cultivo**. [s.l.] UNB, 2017.
- CELIŃSKA, E.; GRAJEK, W. Biotechnological production of 2,3-butanediol—Current state and prospects. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 6, p. 715–725, 2009.
- CHATZIFRAGKOU, A. et al. Biorefinery development through utilization of biodiesel industry by-products as sole fermentation feedstock for 1,3-propanediol production. **Bioresource Technology**, v. 159, p. 167–175, 2014.
- CORSETTI, A.; PERPETUINI, G.; TOFALO, R. Biopreservation effects in fermented foods. In: **Advances in Fermented Foods and Beverages**. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 311–332.
- DA SILVA, G. P.; DE LIMA, C. J. B.; CONTIERO, J. Production and productivity of 1,3-propanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* GLC29. **Catalysis Today**, v. 257, p. 259–266, 2015.
- DAHIYA, S. et al. Food waste biorefinery: Sustainable strategy for circular bioeconomy. **Bioresource Technology**, v. 248, p. 2–12, 1 jan. 2018.
- DAI, J.-Y.; LIU, C.-J.; XIU, Z.-L. Sugaring-out extraction of 2,3-butanediol from

fermentation broths. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 11, p. 1951–1957, 2015.

DAI, J.; ZHANG, Y.; XIU, Z. Salting-out Extraction of 2,3-Butanediol from Jerusalem artichoke-based Fermentation Broth. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 19, n. 4, p. 682–686, ago. 2011.

DAVEY, C. J. et al. Nanofiltration and reverse osmosis membranes for purification and concentration of a 2,3-butanediol producing gas fermentation broth. **Journal of Membrane Science**, v. 518, p. 150–158, 2016.

DIAS, B. DO C. et al. 2,3-Butanediol production by the non-pathogenic bacterium *Paenibacillus brasiliensis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 20, p. 8773–8782, 2018.

DIEDERICH, P. et al. Evaluation of PEG/phosphate aqueous two-phase systems for the purification of the chicken egg white protein avidin by using high-throughput techniques. **Chemical Engineering Science**, v. 104, p. 945–956, 18 dez. 2013.

DOS SANTOS, K. A. et al. Partitioning of amylase produced by *Aspergillus niger* in solid state fermentation using aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**, abr. 2020.

DUDEFOI, W. et al. Nanoscience and nanotechnologies for biobased materials, packaging and food applications: New opportunities and concerns. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 15 set. 2017.

FAN, Y. et al. Extraction and purification of capsaicin from capsicum oleoresin using an aqueous two-phase system combined with chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 1063, p. 11–17, 15 set. 2017.

FU, H. et al. Quantifying hydrophobicity of natural organic matter using partition coefficients in aqueous two-phase systems. **Chemosphere**, v. 218, p. 922–929, 1 mar. 2019.

GAI, Z.; WAN, J.; CAO, X. Synthesis of pH-responsive polymers forming recyclable aqueous two-phase systems and application to the extraction of demeclocycline. **Biochemical Engineering Journal**, v. 142, p. 89–96, 15 fev. 2019.

GHAFFARI, S. et al. Partitioning of cefazolin in aqueous two-phase systems containing poly (ethylene glycol) and sodium salts (citrate, tartrate, and sulphate). **Fluid Phase Equilibria**, v. 488, p. 54–61, 1 jun. 2019.

GIRARDI, V. **EMPREGO DO GLICEROL COMO FONTE DE CARBONO NA PRODUÇÃO FERMENTATIVA DE 2,3-BUTANODIOL POR *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048**. [s.l: s.n.].

GONG, Y. et al. The possibility of the desalination of actual 1,3-propanediol fermentation broth by electrodialysis. **Desalination**, v. 161, n. 2, p. 169–178, fev. 2004.

GRILO, A. L.; AIRES-BARROS, M. R.; AZEVEDO, A. M. Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems: Fundamentals, Applications and Trends. **Separation and Purification**

Reviews, v. 45, n. 1, p. 68–80, 2016.

HAGHTALAB, A.; MOKHTARANI, B. The new experimental data and a new thermodynamic model based on group contribution for correlation liquid–liquid equilibria in aqueous two-phase systems of PEG and (K₂HPO₄ or Na₂SO₄). **Fluid Phase Equilibria**, v. 215, n. 2, p. 151–161, fev. 2004.

HATTI-KAUL, R. **Aqueous two-phase systems. Methods and protocols**. vol. 11. ed. New Jersey: [s.n.].

HAZEENA, S. H. et al. Simultaneous saccharification and fermentation of oil palm frond for the production of 2,3-butanediol. **Bioresource Technology**, v. 278, p. 145–149, 1 abr. 2019a.

HAZEENA, S. H. et al. Simultaneous saccharification and fermentation of oil palm frond for the production of 2,3-butanediol. **Bioresource Technology**, v. 278, p. 145–149, 1 abr. 2019b.

HEMAVATHI, A. B.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Differential partitioning of β -galactosidase and β -glucosidase using aqueous two phase extraction. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 3, p. 649–655, mar. 2011.

HONG, J. et al. Design and optimization of multi-effect-evaporation-assisted distillation configuration for recovery of 2,3-butanediol from fermentation broth. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 136, p. 107–115, 1 fev. 2019.

HUANG, A. et al. Hexafluoroisopropanol-salt aqueous two-phase system for extraction and purification of chlorogenic acid from ramie leaves. **Journal of Chromatography A**, v. 1597, p. 196–201, 19 jul. 2019.

J. BENAVIDES; M. RITO-PALOMARES. Practical experiences from the development of aqueous two-phase processes for the recovery of high value biological products. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 83, p. 133–142, 2008.

JI, X.-J.; HUANG, H.; OUYANG, P.-K. Microbial 2,3-butanediol production: A state-of-the-art review. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 3, p. 351–364, 2011a.

JI, X.-J.; HUANG, H.; OUYANG, P.-K. Microbial 2,3-butanediol production: A state-of-the-art review. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 351–364, 2011b.

JUNG, M.-Y. et al. Engineered *Enterobacter aerogenes* for efficient utilization of sugarcane molasses in 2,3-butanediol production. **Bioresource technology**, v. 139, p. 21–7, jul. 2013.

KARAN, H. et al. Green Bioplastics as Part of a Circular Bioeconomy. **Trends in Plant Science**, v. 24, n. 3, p. 237–249, mar. 2019.

KIM, S.-J. et al. Production of 2,3-butanediol by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource technology**, v. 146, p. 274–81, out. 2013.

KOUTINAS, A. A. et al. Valorization of industrial waste and by-product streams via fermentation for the production of chemicals and biopolymers. **Chem. Soc. Rev. Chem. Soc. Rev.**, v. 43, n. 43, p. 2587–2627, 2014.

KOUTINAS, A. A. et al. Techno-economic evaluation of a complete bioprocess for 2,3-butanediol production from renewable resources. **Bioresource Technology**, v. 204, p. 55–64, 2016.

KUCERA, J. Reverse Osmosis, Industrial Applications and Processes. **John Wiley&Sons, New Jersey, USA**, p. 416, 2010.

LANCIOTTI, R. et al. Evaluation of diacetyl antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. **Food Microbiology**, 2003.

LEE, J. H.; LEE, E. Y. Biobutanediol-mediated liquefaction of empty fruit bunch saccharification residues to prepare lignin biopolyols. **Bioresource Technology**, v. 208, p. 24–30, maio 2016.

LI, Y. et al. Separating 2,3-butanediol from fermentation broth using n-butylaldehyde. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 20, p. S495–S502, 2016.

LI, Z.; TENG, H.; XIU, Z. Aqueous two-phase extraction of 2,3-butanediol from fermentation broths using an ethanol/ammonium sulfate system. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 5, p. 731–737, 2010.

LI, Z.; TENG, H.; XIU, Z. Extraction of 1,3-propanediol from glycerol-based fermentation broths with methanol/phosphate aqueous two-phase system. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 2, p. 586–591, fev. 2011.

LIAKOU, V. et al. Valorisation of fruit and vegetable waste from open markets for the production of 2,3-butanediol. **Food and Bioproducts Processing**, v. 108, p. 27–36, 1 mar. 2018a.

LIAKOU, V. et al. Valorisation of fruit and vegetable waste from open markets for the production of 2,3-butanediol. **Food and Bioproducts Processing**, v. 108, p. 27–36, 1 mar. 2018b.

MA, K. et al. Improvement of (R,R)-2,3-butanediol production from corn stover hydrolysate by cell recycling continuous fermentation. **Chemical Engineering Journal**, v. 332, p. 361–369, 15 jan. 2018a.

MA, K. et al. Improvement of (R,R)-2,3-butanediol production from corn stover hydrolysate by cell recycling continuous fermentation. **Chemical Engineering Journal**, v. 332, p. 361–369, 15 jan. 2018b.

MAINA, S. et al. Bioprocess development for (2R,3R)-butanediol and acetoin production using very high polarity cane sugar and sugarcane molasses by a *Bacillus amyloliquefaciens* strain. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 94, n. 7, p. 2167–2177, 2019a.

MAINA, S. et al. Improvement on bioprocess economics for 2,3-butanediol production from very high polarity cane sugar via optimisation of bioreactor operation. **Bioresource**

Technology, v. 274, p. 343–352, 1 fev. 2019b.

MEI, L.-H. et al. **Densities and Viscosities of Polyethylene Glycol + Salt + Water Systems at 20 °C**. *J. Chem. Eng. Data*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/sharingguidelines>>. Acesso em: 10 maio. 2020.

MULDER, M. **Basic Principles of Membrane Technology**. second ed. ed. [s.l.] Springer, 1996.

NATH, K.; DAVE, H. K.; PATEL, T. M. Revisiting the recent applications of nanofiltration in food processing industries: Progress and prognosis. **Trends in Food Science & Technology**, v. 73, p. 12–24, 1 mar. 2018.

OLIVEIRA, A. G. DE. **Caracterização da Distribuição do Tamanho de Gotas em Emulsões Água e Óleo Utilizando Diferentes Técnicas de Medição**. [s.l: s.n.].

PEELMAN, N. et al. Application of bioplastics for food packaging. **Trends in Food Science & Technology**, v. 32, n. 2, p. 128–141, 1 ago. 2013.

PHONG, W. N. et al. Recovery of biotechnological products using aqueous two phase systems. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 126, n. 3, p. 273–281, 1 set. 2018.

PORTER, M. C. **HANDBOOK OF INDUSTRIAL MEMBRANE TECHNOLOGY**. Westwood, New Jersey, U.S.A.: [s.n.].

PORTO, C. S. et al. Partition of lectin from *Canavalia grandiflora* Benth in aqueous two-phase systems using factorial design. **Biochemical Engineering Journal**, v. 53, p. 165–171, 2010.

PRONER, M. C. **CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANAS DE ULTRAFILTRAÇÃO MODIFICADAS PELO MÉTODO MUSSEL-INSPIRED**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA, 2018.

QUENTAL, M. V et al. Aqueous Biphasic Systems Composed of Ionic Liquids and AcetateBased Salts: Phase Diagrams, Densities, and Viscosities. **J. Chem. Eng. Data**, v. 60, p. 1674–1682, 2015.

REDDY, M. M. et al. Biobased plastics and bionanocomposites: Current status and future opportunities. **Progress in Polymer Science**, v. 38, n. 10–11, p. 1653–1689, 1 out. 2013.

REGUPATHI, I. et al. Densities and Viscosities of Polyethylene Glycol 6000 + Triammonium Citrate + Water Systems. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 54, n. 12, p. 3291–3295, 2009.

RUIZ-RUIZ, F. et al. Aqueous two-phase affinity partitioning systems: Current applications and trends. **Journal of Chromatography A**, v. 1244, p. 1–13, 2012.

SAMPAIO, D. D. A. Aqueous two-phase (polyethylene glycol + sodium sulfate) system for caffeine extraction: Equilibrium diagrams and partitioning study. 2016.

- SÁNCHEZ-RAMÍREZ, E. et al. Synthesis, design and optimization of alternatives to purify 2, 3-Butanediol considering economic, environmental and safety issues. **Sustainable Production and Consumption**, v. 17, p. 282–295, 1 jan. 2019.
- SHANG, Q. K. et al. Partitioning behavior of amino acids in aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol and phosphate buffer. **Fluid Phase Equilibria**, v. 219, n. 2, p. 195–203, 2004.
- SHAO, P.; KUMAR, A. Recovery of 2,3-butanediol from water by a solvent extraction and pervaporation separation scheme. **Journal of Membrane Science**, v. 329, p. 160–168, 2009a.
- SHAO, P.; KUMAR, A. Separation of 1-butanol/2,3-butanediol using ZSM-5 zeolite-filled polydimethylsiloxane membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 339, p. 143–150, 2009b.
- SHI, Y. et al. Butanediol-enhanced heat tolerance in *Agrostis stolonifera* in association with alteration in stress-related gene expression and metabolic profiles. **Environmental and Experimental Botany**, v. 153, p. 209–217, 1 set. 2018.
- SHIBATA, C.; IWASHITA, K.; SHIRAKI, K. Salt-containing aqueous two-phase system shows predictable partition of proteins with surface amino acids residues. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 133, p. 1182–1186, 15 jul. 2019.
- Showing Compound 2,3-Butanediol (FDB011934) - FoodDB**. Disponível em: <<https://foodb.ca/compounds/FDB011934>>. Acesso em: 22 maio. 2020.
- SHUKLA, S. K.; PANDEY, S.; PANDEY, S. Applications of ionic liquids in biphasic separation: Aqueous biphasic systems and liquid–liquid equilibria. **Journal of Chromatography A**, v. 1559, p. 44–61, 20 jul. 2018.
- SILVA, J. DE C.; DE FRANÇA, P. R. L.; PORTO, T. S. Optimized extraction of polygalacturonase from *Aspergillus aculeatus* URM4953 by aqueous two-phase systems PEG/Citrate. **Journal of Molecular Liquids**, v. 263, p. 81–88, 1 ago. 2018.
- TADINI, C. C.; NICOLETTI, V. R.; DE ALMEIDA MEIRELLES, ANTONIO JOSÉ; PESSOA FILHO, P. D. A. **Operações Unitárias na Indústria de Alimentos**. 1. ed. [s.l: s.n.].
- THAPA, L. P. et al. Metabolic engineering of *Enterobacter aerogenes* to improve the production of 2,3-butanediol. **Biochemical Engineering Journal**, v. 143, p. 169–178, 15 mar. 2019.
- TIAN, Y. et al. Effect of nitrogen, carbon sources and agitation speed on acetoin production of *Bacillus subtilis* SF4-3. **EJBT**, v. 19, p. 41–49, 2016.
- TRINDADE, J. R. et al. Salting-Out Effects in Aqueous Ionic Liquid Solutions: Cloud-Point Temperature Shifts. **The Journal of Physical Chemistry B**, 2006.
- TSIBRANSKA, I. H.; TYLKOWSKI, B. Concentration of ethanolic extracts from *Sideritis*

- ssp. L. by nanofiltration: Comparison of dead-end and cross-flow modes. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, n. 2, p. 169–174, 1 abr. 2013.
- VAFAEZADEH, M.; HASHEMI, M. M. Polyethylene glycol (PEG) as a green solvent for carbon–carbon bond formation reactions. **Journal of Molecular Liquids**, v. 207, p. 73–79, 1 jul. 2015.
- VELA, M. C. V. et al. Analysis of membrane pore blocking models applied to the ultrafiltration of PEG. **Separation and Purification Technology**, v. 62, n. 3, p. 489–498, 22 set. 2008.
- WENTEN, I. G.; KHOIRUDDIN. Reverse osmosis applications: Prospect and challenges. **Desalination**, v. 391, p. 112–125, 1 ago. 2016.
- WISHART, D. S. ET AL; **HMDB 4.0 — The Human Metabolome Database for 2018. Nucleic Acids Res. 2018. Jan 4.** Disponível em: <<https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0003156>>. Acesso em: 22 maio. 2020.
- WYSOCZANSKA, K.; MACEDO, E. A. Effect of molecular weight of polyethylene glycol on the partitioning of DNP-amino acids: PEG (4000, 6000) with sodium citrate at 298.15 K. **Fluid Phase Equilibria**, v. 428, p. 84–91, 2016.
- XIAO, Z.; LU, J. R. Strategies for enhancing fermentative production of acetoin: A review. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 2, p. 492–503, 2014.
- XIU, Z. L.; ZENG, A. P. Present state and perspective of downstream processing of biologically produced 1,3-propanediol and 2,3-butanediol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, n. 6, p. 917–926, 2008.
- YANG, T. et al. Synthesis of two pH-responsive copolymers in pilot scale and its application in aqueous two-phase system. **Process Biochemistry**, v. 79, p. 185–194, 1 abr. 2019.
- YANG, X. et al. Current states and prospects of organic waste utilization for biorefineries. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 49, p. 335–349, 2015.
- YÜCEKAN, İ.; ÖNAL, S. Partitioning of invertase from tomato in poly(ethylene glycol)/sodium sulfate aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 226–232, 1 jan. 2011.
- YUN-LONG GAO, QIN-HUA PENG, Z.-C. L. AND Y.-G. L. Thermodynamics of ammonium sulfate-polyethylene glycol aqueous two-phase systems. Part 1. Experiment and correlation using extended UNIQUAC equation. **Fluid Phase Equilibria Elsevier Science Publishers B.V.**, v. 63, p. 157–171, 1991.
- ZHANG, L. et al. Microbial production of 2,3-butanediol by a mutagenized strain of *Serratia marcescens* H30. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 6, p. 1961–1967, 1 mar. 2010.
- ZHOU, Y.-J. et al. Purification of porcine pancreatic lipase by aqueous two-phase systems of polyethylene glycol and potassium phosphate. **Journal of Chromatography B**, v. 926, p. 77–82, 2013.

APÊNDICE A - Ensaios preliminares de extração em sistema aquoso bifásico em diferentes regiões dos diagramas de fase

Tabela A1: Ensaios preliminares em diferentes regiões do diagrama do sistema constituído de PEG 4000-citrato e PEG 6000-citrato.

Composição global do SAB			PEG 4000					PEG 6000				
Ensaio	PEG (% m/m)	citrato de sódio (% m/m)	V _T (mL)	V _F (mL)	V _R	K	Y _T (%)	V _T (mL)	V _F (mL)	V _R	K	Y _T (%)
1	20,91	9,51	0,0063	0,0032	1,97	1,36	72,82	-	-	-	-	-
2	15,69	10,93	0,0050	0,0045	1,11	1,02	53,04	-	-	-	-	-
4	8,39	10,93	0,0037	0,0055	0,67	0,43	22,52	-	-	-	-	-
6	20,05	8,84	-	-	-	-	-	0,0055	0,0035	1,57	1,47	69,80
7	15,87	10,57	-	-	-	-	-	0,0045	0,0045	1,00	1,51	60,09
8	9,61	10,57	-	-	-	-	-	0,0037	0,0055	0,67	0,77	34,03

- não foi mensurado; nd: não formou sab

Tabela A2: Ensaios preliminares em diferentes regiões do diagrama do sistema constituído de PEG 4000-sulfato e PEG 6000-sulfato

Composição global do SAB			PEG 4000					PEG 6000				
Ensaio	PEG (% m/m)	sulfato de amônio (% m/m)	V _T (mL)	V _F (mL)	V _R	K	Y _T (%)	V _T (mL)	V _F (mL)	V _R	K	Y _T (%)
1	16,00	9,00	0,0041	0,0054	0,80	1,20	47,60	-	-	-	-	-
2	11,50	10,90	0,0024	0,007	0,30	1,30	31,40	-	-	-	-	-
3	7,00	12,80	0,006	0,0035	1,70	1,10	65,40	-	-	-	-	-
4	23,00	6,00	0,0087	0,0008	10,88	1,21	92,95	-	-	-	-	-
5	15,00	9,00	0,0058	0,0037	1,57	1,01	61,31	-	-	-	-	-
6	7,50	12,00	0,0027	0,0065	0,42	0,99	29,19	-	-	-	-	-
7	12,21	11,99	0,0040	0,0055	0,73	1,20	46,51	-	-	-	-	-
8	15,88	14,05	0,0037	0,0055	0,67	1,47	49,76	-	-	-	-	-
9	20,00	16,12	0,0040	0,0050	0,80	1,77	58,61	-	-	-	-	-
10	18,00	8,00	-	-	-	-	-	0,0070	0,0030	2,70	1,10	75,30
11	12,75	10,00	-	-	-	-	-	0,0050	0,0050	1,10	0,90	49,70
12	7,50	12,00	-	-	-	-	-	0,0030	0,0070	0,50	1,50	40,70

- não foi mensurado; nd: não formou sab

Tabela A3: Ensaio preliminares em diferentes regiões do diagrama do sistema constituído de PEG 4000-fosfato e PEG 4000-fosfato.

Composição global do SAB			PEG 4000					PEG 6000				
Ensaio	PEG (% m/m)	fosfato de potásio (% m/m)	V _T (mL)	V _F (mL)	V _R	K	Y _T (%)	V _T (mL)	V _F (mL)	V _R	K	Y _T (%)
1	25,68	13,93	nd	nd	nd	nd	nd	-	-	-	-	-
2	23,33	16,08	nd	nd	nd	nd	nd	-	-	-	-	-
3	16,84	13,93	0,0040	0,0045	0,89	1,68	59,95	-	-	-	-	-
4	11,28	11,86	0,0037	0,0055	0,67	1,02	40,77	-	-	-	-	-
5	8,48	13,93	0,0027	0,0060	0,45	1,11	33,36	-	-	-	-	-
6	38,22	4,04	-	-	-	-	-	0,0080	0,0010	8,00	2,05	94,26
7	38,22	6,6	-	-	-	-	-	0,0080	0,0015	5,33	1,95	91,23
8	33,16	5,31	-	-	-	-	-	0,0078	0,0012	6,50	1,42	90,22
9	28,14	4,04	-	-	-	-	-	0,0085	0,0010	8,50	1,08	90,17

- não foi mensurado; nd: não formou sab

APÊNDICE B - Validação dos modelos do DCCR nos SABs constituídos por PEG 4000-sal

Tabela B1: Valores preditos *versus* experimentais de Y_T % e K no SAB PEG 4000-citrato de sódio.

Composição global do SAB		$Y_T (\%) = 87,38 - 1,97x_1^2 - 4,22x_2 + 4,49x_1x_2$			$K = 1,20 + 0,17x_1 + 0,22x_2 - 0,09x_1x_2$		
PEG (% m/m)	Citrato (%m/m)	Y_T % predito	Y_T % experimental	% Erro	K predito	K experimental	% Erro
28,20	5,10	94,1	92,7 ± 0,15	1,5	0,84	1,36 ± 0,03	38,2
32,60	5,90	87,3	88,2 ± 1,15	1,1	1,20	1,58 ± 0,08	23,6

x_1 concentração de PEG 4000; x_2 concentração de sal

Tabela B2: Valores preditos *versus* experimentais de Y_T % e K no SAB PEG 4000-sulfato de amônio.

Composição global do SAB		$Y_T (\%) = 86,62 + 0,56x_1 - 0,91x_1^2 - 4,38x_2 - 0,64x_2^2 + 2,36x_1x_2$			$K = 1,38 + 0,15x_1 + 0,09x_1^2 + 0,19x_2$		
PEG (% m/m)	Sulfato (%m/m)	Y_T % predito	Y_T % experimental	% Erro	K predito	K experimental	% Erro
30,53	5,41	90,7	91,9 ± 0,53	1,3	1,18	1,40 ± 0,02	15,5
32,40	6,30	86,8	86,0 ± 0,17	0,9	1,37	1,60 ± 0,03	14,0

x_1 concentração de PEG 4000; x_2 concentração de sal

Tabela B3: Valores preditos *versus* experimentais de Y_T % e K no SAB PEG 4000-fosfato de potássio.

Composição global do SAB		$Y_T (\%) = 88,73 + 1,76x_1 + 0,60x_1^2 - 2,90x_2 + 0,61x_2^2 + 0,65x_1x_2$			$K = 1,71 + 0,29x_1 + 0,17x_2 - 0,14x_1x_2$		
PEG (% m/m)	Fosfato (%m/m)	Y_T % predito	Y_T % experimental	% Erro	K predito	K experimental	% Erro
28,20	4,20	92,4	95,2 ± 0,72	2,9	0,98	1,61 ± 0,02	37,0
32,60	5,90	88,7	87,7 ± 2,00	1,1	1,71	1,94 ± 0,25	11,0

x_1 concentração de PEG 4000; x_2 concentração de sal

APÊNDICE C - Tabelas da Análise de Variância (ANOVA) do DCCR para a recuperação e coeficiente de partição nos diferentes sistemas estudados, PEG-citrato, PEG-sulfato e PEG-fosfato.

Tabela C1: Análise de variância (ANOVA) do planejamento experimental para a recuperação do 2,3-BDO (Y_T %) em sistema PEG 6000/citrato de sódio.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F
Regressão	327,92	2	163,96	119,14
Resíduos	11,01	8	1,38	
Erro Puro	0,89	2	0,44	
Total	338,93	10		
$Y_T \% = 87,69 - 6,31x_2 + 1,22x_2^2$				$F_{8,2} = 4,46$
$R^2 = 96,75\%$				

Tabela C2: Análise de variância (ANOVA) do planejamento experimental para a recuperação do 2,3-BDO (Y_T %) em sistema PEG 4000/citrato de sódio.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F
Regressão	247,75	3	82,58	7,06
Resíduos	81,91	7	11,70	
Erro Puro	11,69	2	5,84	
Total	329,66	10		
$Y_T \% = 87,38 - 1,97x_1^2 - 4,22x_2 + 4,49x_1x_2$				$F_{7,3} = 4,35$
$R^2 = 75,15\%$				

Tabela C3: Análise de variância (ANOVA) do planejamento experimental para o coeficiente de partição do 2,3-BDO (K) em sistema PEG 6000/citrato de sódio.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F
Regressão	1,42	4	0,36	3,61
Resíduos	0,59	6	0,10	
Erro Puro	0,002	2	0,00	
Total	2,01	10		
$K = 1,45 - 0,12x_1 - 0,65x_2 + 0,51x_2^2 + 0,36x_1x_2$				$F_{6,4} = 4,53$
$R^2 = 71,49\%$				

Tabela C4: Análise de variância (ANOVA) do planejamento experimental para o coeficiente de partição do 2,3-BDO (K) em sistema PEG 4000/citrato de sódio.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F
Regressão	0,67	3	0,22	39,08
Resíduos	0,04	7	0,01	
Erro Puro	0,003	2	0,001	
Total	0,71	10		
$K = 1,20 + 0,17x_1 + 0,22x_2 - 0,09x_1x_2$				$F_{7,3} = 4,35$
$R^2 = 95,76\%$				

Tabela C5: Análise de variância (ANOVA) do planejamento experimental para a recuperação do 2,3-BDO (Y_T %) em sistema PEG 6000/sulfato de amônio.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F
Regressão	124,59	3	41,53	19,86
Resíduos	14,64	7	2,09	
Erro Puro	0,91	2	0,45	
Total	139,23	10		
$Y_T\% = 85,17 - 7,34x_2 + 2,50x_2^2 + 2,67x_1x_2$				$F_{7,3} = 4,35$
$R^2 = 89,50\%$				

Tabela C6: Análise de variância (ANOVA) do planejamento experimental para a recuperação do 2,3-BDO (Y_T %) em sistema PEG 4000/sulfato de amônio.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F
Regressão	179,71	3	59,90	26,17
Resíduos	16,02	7	2,29	
Erro Puro	0,88	2	0,44	
Total	195,73	10		
$Y_T\% = 86,62 - 1,46x_1^2 - 8,77x_2 + 4,72x_1x_2$				$F_{7,3} = 4,35$
$R^2 = 91,82$				

Tabela C7: Análise de variância (ANOVA) do planejamento experimental para o coeficiente de partição do 2,3-BDO (K) em sistema PEG 6000/sulfato de amônio.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F
Regressão	0,48	2	0,24	32,00
Resíduos	0,06	8	0,01	
Erro Puro	0,012	2	0,009	
Total	0,54	10		
$K = 1,56 + 0,12x_1 + 0,21x_2$				$F_{8,2} = 4,46$
$R^2 = 90,24\%$				

Tabela C8: Análise de variância (ANOVA) do planejamento experimental para o coeficiente de partição do 2,3-BDO (K) em sistema PEG 4000/sulfato de amônio.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F
Regressão	0,53	3	0,18	30,92
Resíduos	0,04	7	0,01	
Erro Puro	0,016	2	0,008	
Total	0,57	10		
$K = 1,38 + 0,15x_1 + 0,09x_1^2 + 0,19x_2$				$F_{7,3} = 4,35$
$R^2 = 93,62\%$				

Tabela C9: Análise de variância (ANOVA) do planejamento experimental para a recuperação do 2,3-BDO (Y_T %) em sistema PEG 6000/fosfato de potássio.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F
Regressão	111,72	5	22,34	15,43
Resíduos	7,24	5	1,45	
Erro Puro	2,4	2	0,27	
Total	118,96	10		
$Y_T \% = 85,66 + 1,72x_1 + 0,98x_1^2 - 1,81x_2 + 2,78x_2^2 + 1,76x_1x_2$				$F_{5,5} = 5,05$
$R^2 = 89,47\%$				

Tabela C10: Análise de variância (ANOVA) do planejamento experimental para a recuperação do 2,3-BDO (Y_T %) em sistema PEG 4000/fosfato de potássio.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F
Regressão	98,23	5	19,65	25,65
Resíduos	3,83	5	0,77	
Erro Puro	0,58	2	0,02	
Total	102,06	10		
$Y_T \% = 88,73 + 1,76x_1 + 0,60x_1^2 - 2,90x_2 + 0,61x_2^2 + 0,65x_1x_2$				$F_{5,5} = 5,05$
$R^2 = 95,33\%$				

Tabela C11: Análise de variância (ANOVA) do planejamento experimental para o coeficiente de partição do 2,3-BDO (K) em sistema PEG 6000/fosfato de potássio.

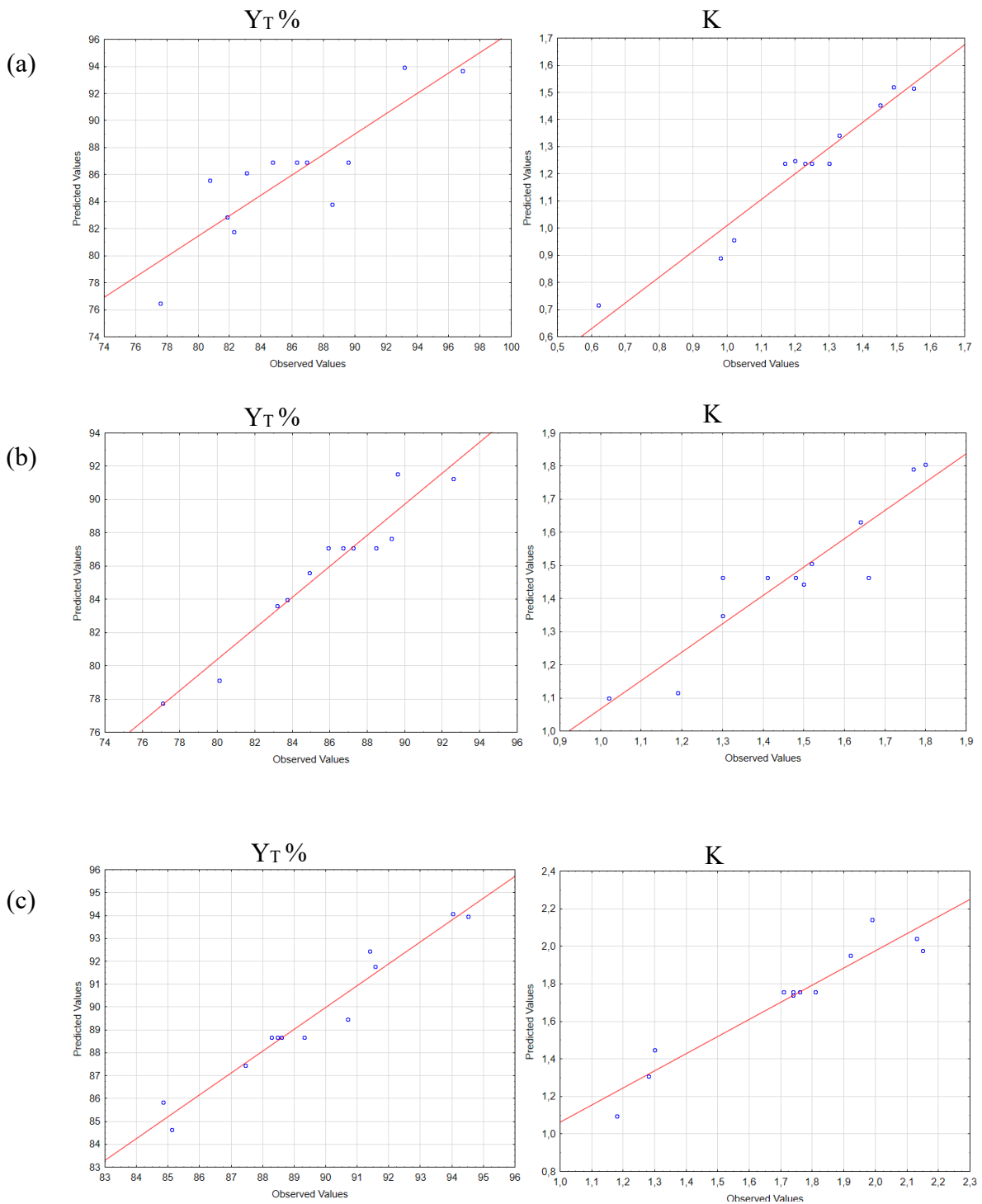
Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F
Regressão	2,873	5	0,57	8,53
Resíduos	0,337	5	0,07	
Erro Puro	0,037	2	0,02	
Total	3,21	10		
$K = 1,53 + 0,21x_1 + 0,13x_1^2 + 0,39x_2 + 0,35x_2^2 + 0,31x_1x_2$				$F_{5,5} = 5,05$
$R^2 = 86,32\%$				

Tabela C12: Análise de variância (ANOVA) do planejamento experimental para o coeficiente de partição do 2,3-BDO (K) em sistema PEG 4000/fosfato de potássio.

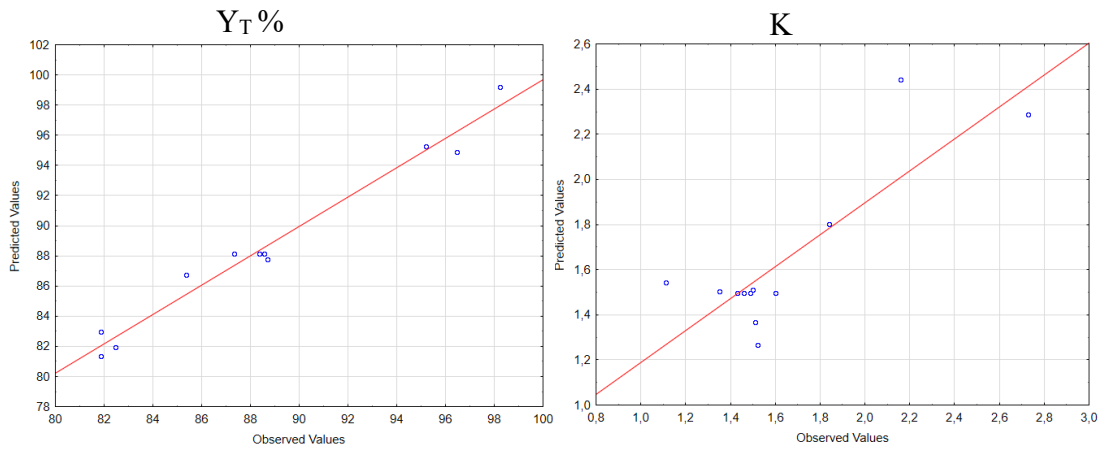
Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F
Regressão	1,033	3	0,34	25,11
Resíduos	0,096	7	0,01	
Erro Puro	0,001	2	0,00	
Total	1,129	10		
$K = 1,71 + 0,29x_1 + 0,17x_2 - 0,14x_1x_2$				$F_{7,3} = 4,35$
$R^2 = 91,47\%$				

APÊNDICE D - Comparação entre valores preditos pelos modelos e os valores observados experimentalmente.

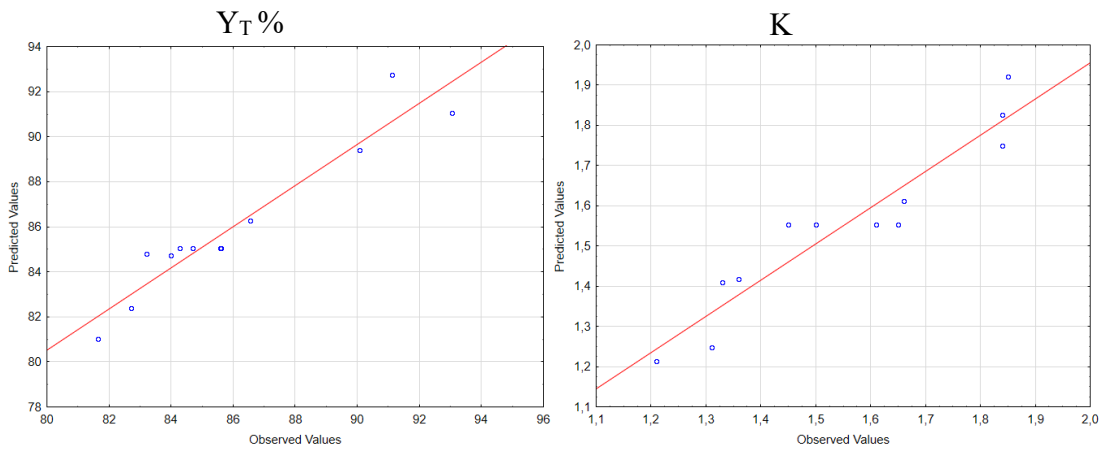
Figura D1: Valores preditos vs observados para os sistemas PEG 4000-citrato (a), PEG 4000-sulfato (b), PEG 4000-fosfato (c), PEG 6000-citrato (d), PEG 6000-sulfato (e), PEG 6000-fosfato (f).



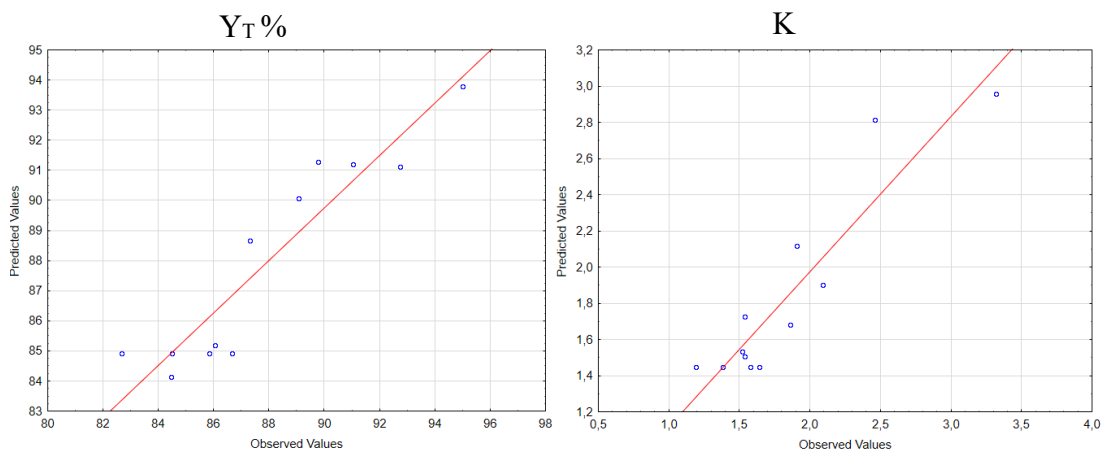
(d)



(e)

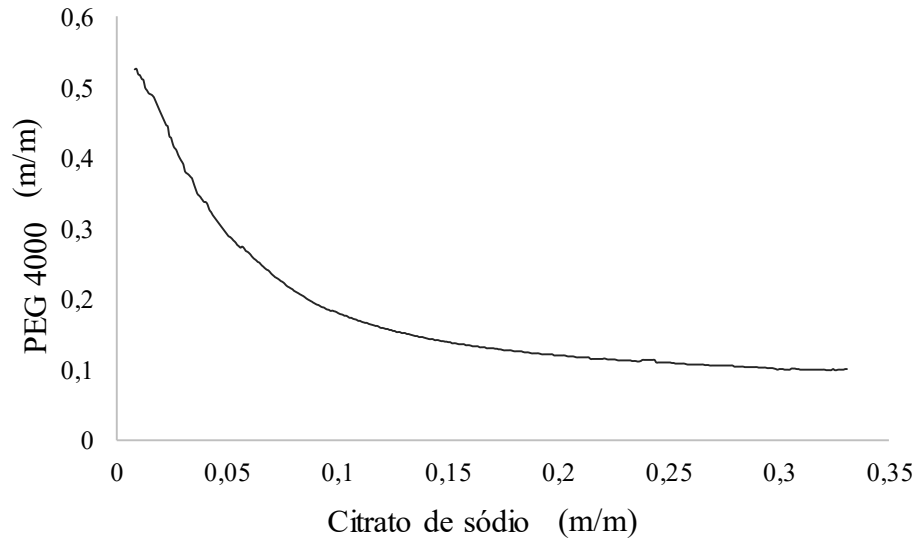


(f)



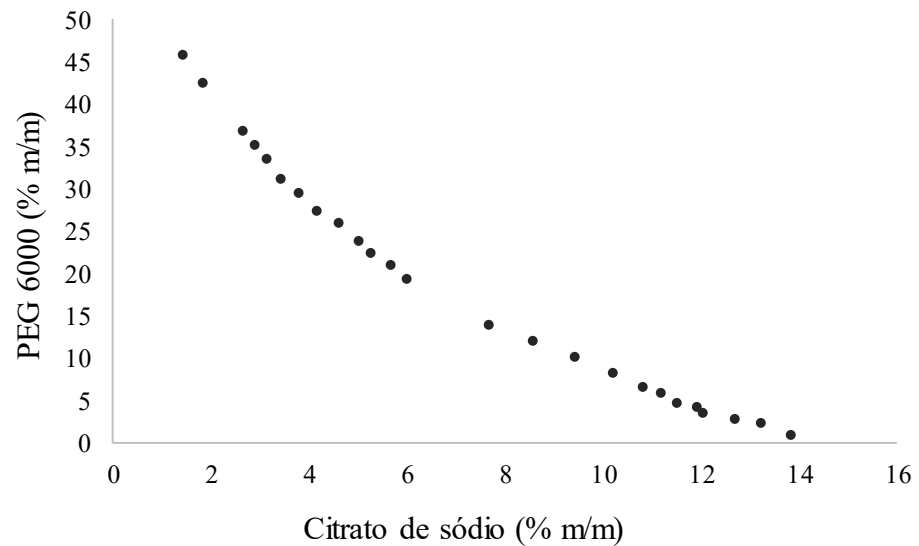
ANEXO A - Diagramas de equilíbrio

Gráfico A1: Diagrama de equilíbrio PEG 4000 - citrato de sódio.



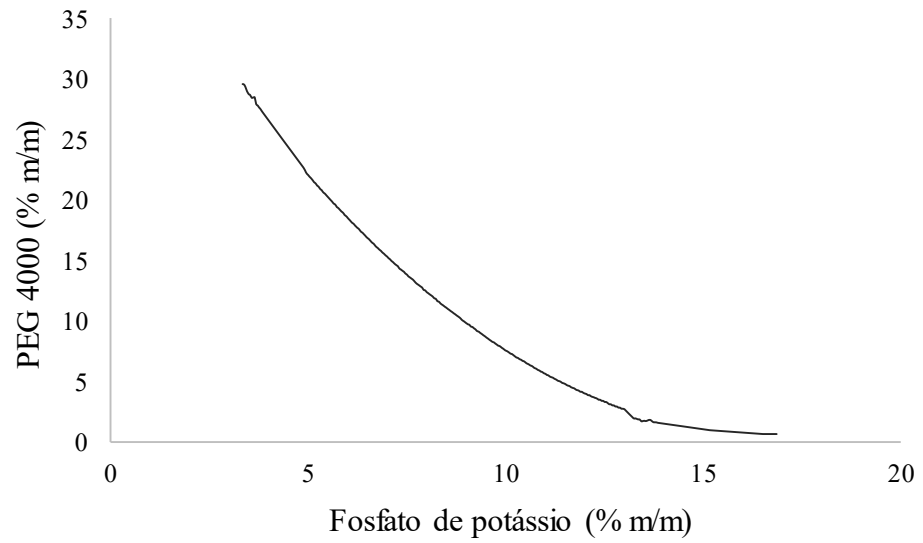
Fonte: DE OLIVEIRA et al. (2008).

Gráfico A2: Diagrama de equilíbrio PEG 6000 - citrato de sódio.



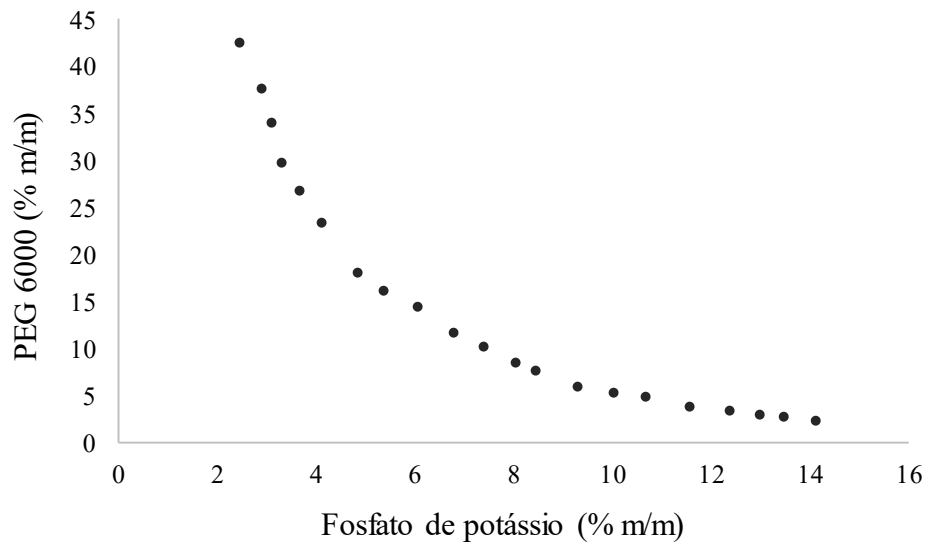
Fonte: ZAFARANI-MOATTAR; SADEGHI; HAMIDI (2004).

Gráfico A3: Diagrama de equilíbrio PEG 4000 – fosfato de potássio.



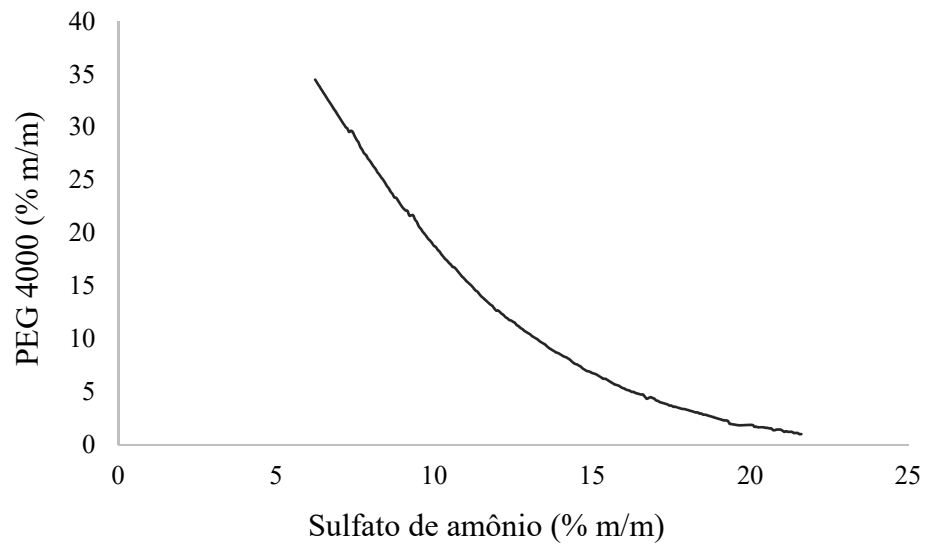
Fonte: HAGHTALAB; MOKHTARANI (2004)

Gráfico A4: Diagrama de equilíbrio PEG 6000 – fosfato de potássio.



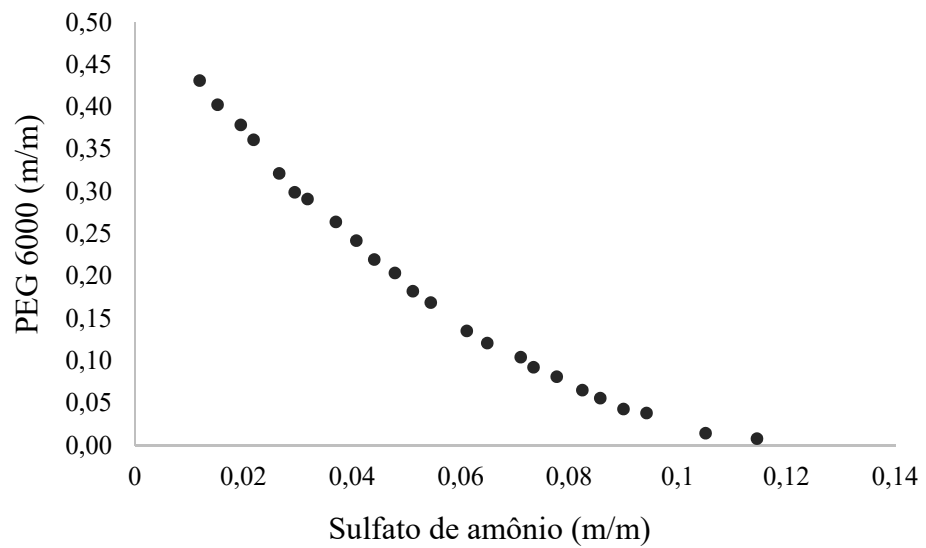
Fonte: SHANG et al. (2004)

Gráfico A5: Diagrama de equilíbrio PEG 4000 – sulfato de amônio.



Fonte: YUN-LONG GAO, QIN-HUA PENG (1991)

Gráfico A6: Diagrama de equilíbrio PEG 6000 – sulfato de amônio.



Fonte: CHENG et al. (2013)