

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Engenharia de Alimentos

**PARTIÇÃO DE VANILINA EM SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO
COMPOSTO POR POLÍMERO E SAL**



Mateus Guedes Araújo

Engenharia de Alimentos

**PARTIÇÃO DE VANILINA EM SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO
COMPOSTO POR POLÍMERO E SAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof^ª Janaína Teles de Faria

Montes Claros

Instituto de Ciências Agrárias – UFMG

2025

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, pela força, sabedoria e perseverança que me permitiram superar todos os desafios e alcançar mais esta conquista em minha vida.

Agradeço de todo coração à minha família, especialmente aos meus pais, Sandra e Ivan, por todo amor, apoio e compreensão incondicionais, que sempre me inspiraram a seguir em frente. Sou grato também aos meus irmãos, Filipe e Tiago, pelo constante incentivo e pela força que sempre me transmitiram. Registro ainda minha gratidão ao meu padrinho Jucélio, cujo exemplo de dedicação e apoio sempre me inspirou ao longo da minha trajetória. Sou igualmente grato aos meus avós, Célia e Domingos, por todo o cuidado e carinho que sempre tiveram comigo. A minha namorada, Ágatha, pelo apoio e companhia no laboratório e em todos os momentos em que precisei.

Aos meus professores, que, ao longo dos anos, compartilharam seus conhecimentos e experiências, contribuindo para a minha formação, expresse minha mais sincera gratidão. Agradeço especialmente à minha orientadora, Prof.^a Janaína Teles de Faria, uma profissional que admiro muito, por seu apoio, orientação e incentivo durante este trabalho, sem ela não seria possível.

Agradeço aos técnicos que, direta ou indiretamente, contribuíram com suporte técnico, esclarecimento de dúvidas e auxílio durante os experimentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Por fim, sou grato a todos que, de alguma forma, estiveram ao meu lado ao longo desta jornada, oferecendo apoio, palavras de incentivo e colaboração. Cada um de vocês foi parte essencial nesta conquista.

RESUMO

A vanilina é um composto aromático amplamente utilizado como flavorizante em alimentos, bebidas e fragrâncias. Além da característica aromática, possui também propriedades antioxidante e antimicrobiana, com potencial aplicação como aditivo natural na indústria de alimentos. Devido ao alto custo e à baixa sustentabilidade do processo de extração de vanilina a partir de fonte vegetal, faz-se necessário o estudo de técnicas de extração econômicas e compatíveis com o meio ambiente, como os Sistemas Aquosos Bifásicos, que oferecem vantagens como seletividade e menor impacto ambiental. O presente estudo investigou o efeito das seguintes variáveis do processo de extração líquido-líquido por SAB: massa molar do PEG (1500 e 6000 g/mol), composição global do sistema (22% PEG e 7% sal, 25% PEG e 8,5% sal, e 28% PEG e 10% sal), temperatura (25, 35 e 45 °C) e razão entre as massas das fases (1:3; 1:1 e 3:1) sobre a partição da vanilina. Para os sistemas compostos por PEG e sulfato de sódio avaliados, foram obtidos valores de k entre $1,17 \pm 0,06$ e $33,0 \pm 0,02$. A massa molar do PEG teve efeito claro sobre a partição da vanilina entre as fases dos sistemas avaliados, os maiores coeficientes de partição (k) foram registrados para os sistemas contendo PEG 1500. Em relação à temperatura, não foi observada uma tendência consistente nos sistemas avaliados; entretanto, o maior k foi registrado a 35 °C no sistema contendo 25% de PEG 1500 e 8,5% de sulfato de sódio. A composição global do sistema influenciou de forma distinta os sistemas estudados: enquanto para PEG 1500 não houve uma relação clara com o coeficiente de partição (k), para PEG 6000 observou-se um aumento de k com o aumento da concentração dos componentes formadores de fase. Por fim, a razão entre as massas das fases teve influência no k , com o maior sendo obtido no sistema com proporção de massas 3:1. Mais estudos devem ser realizados para melhorar a compreensão sobre o mecanismo de partição, bem como para estabelecer condições ótimas para o particionamento dessa molécula de interesse.

Palavra-chave: Dados de equilíbrio. Flavorizante. Polietilenoglicol. Sulfato de sódio. Extração líquido-líquido.

LISTAS DE TABELAS

- Tabela 1** - Parâmetros dos ajustes da Eq. 3 às curvas binodais dos sistemas aquosos contendo PEG 1500/6000 + sulfato de sódio nas diferentes temperaturas (25°C, 35°C e 45°C) 20
- Tabela 2** - Dados de equilíbrio para o sistema PEG 1500 + Na₂SO₄ + água a 25, 35 e 45 °C 21
- Tabela 3** - Dados de equilíbrio para o sistema PEG 6000 + Na₂SO₄ + água a 25, 35 e 45 °C 22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATPS	Aqueous Two-Phase Systems
CLA	Comprimento da Linha de Amarração
LA	Linha de Amarração
PEG	Polietilenoglicol
PEG 1500	Polietilenoglicol 1500 g/mol
PEG 6000	Polietilenoglicol 6000 g/mol
SAB	Sistema Aquoso Bifásico
RMSE	Raiz do Erro Quadrático Médio
ILA	Inclinação da Linha de Amarração
PA	Pureza Analítica
k	Coefficiente de Partição
R^2	Coefficiente de Determinação
BOD	Demanda Bioquímica de Oxigênio
ANOVA	Análise de Variância

Sumário

1 INTRODUÇÃO	8
2 OBJETIVOS	10
2.1 Objetivo geral	10
2.2 Objetivos específicos	10
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
3.1 Sistema Aquoso Bifásico.....	11
3.2 Aplicações de sistemas aquosos bifasicos para a partição de biomoleculas	13
3.3 Vanilina: características, aplicações e produção.....	14
4 METODOLOGIA	16
4.1 Material	16
4.2 Obtenção do diagrama de fase	16
4.3 Linhas de amarração	17
4.4 Preparo dos sistemas para partição	18
4.5 Análise estatística.....	18
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	19
5.1 Curvas binodais.....	19
5.2 Partição da vanilina em SAB	25
6 CONCLUSÃO	29
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	30
8 REFERÊNCIAS	31

1 INTRODUÇÃO

A vanilina é um dos compostos aromáticos mais apreciados e utilizados no mundo, sendo encontrada em uma variedade de produtos que vão desde alimentos e bebidas até perfumes e medicamentos (DAUGSCH e PASTORE, 2005). Seu aroma e sabor característicos a tornam um ingrediente essencial na indústria alimentícia e de cosméticos. Na indústria de alimentos, a vanilina tem sido utilizada na confeitaria, na aromatização de sorvetes, chocolates e bebidas (TAN, 2022), como agente flavorizante, antioxidante e conservante (BIANCHETTI, 2022). Tradicionalmente, a vanilina é extraída de vagens de baunilha, um processo que é não apenas caro, mas também insustentável para atender à demanda global crescente (SILVA *et al.*, 2023). Outra forma de obtenção desse composto é por meio de reações de biotransformação microbiana (NOURI *et al.*, 2019). Diante desse desafio, pesquisadores têm buscado métodos alternativos de extração e purificação que sejam mais eficientes e sustentáveis.

Entre as diversas metodologias propostas para extração e purificação de compostos, os Sistemas Aquosos Bifásicos (SABs) têm emergido como uma solução promissora. Os SABs são formados pela mistura de dois componentes que se separam em duas fases aquosas distintas quando em condições adequadas (SOUSA, 2015). Estes sistemas são normalmente formados em soluções aquosas em concentrações críticas pela combinação de polímero-polímero, polímero-sal (LIMA, 2021), álcool-sal (CARDOSO, 2013) e etc. A escolha dos compostos formadores de fases, suas concentrações, pH e temperatura são fatores cruciais que determinam a eficiência do SAB na partição de compostos de interesse, como a vanilina.

Entre as combinações de compostos formadores de fases mais estudadas está o uso de polietilenoglicol (PEG) e sais inorgânicos, como o sulfato de sódio, fosfato de potássio e outros (REIS e SANTOS, 2023). O PEG é um polímero hidrofílico, não tóxico e altamente solúvel em água, o que o torna ideal como agente formador de fase (SOUSA, 2015). Os sais inorgânicos, por sua vez, ajudam a formar a outra fase, criando um ambiente de separação/partição eficaz. A escolha do PEG e do sal como componentes do SAB oferece várias vantagens significativas. Primeiramente, ambos os componentes são relativamente baratos e facilmente disponíveis, tornando o processo mais econômico. Além disso, são biocompatíveis e ambientalmente amigáveis, o que é crucial para atender às demandas por processos industriais mais sustentáveis (LIMA, 2021).

Ademais, os SABs apresentam diversas vantagens em relação aos métodos tradicionais de extração e purificação. A possibilidade de ajuste das concentrações de PEG e sal, bem como de variáveis operacionais como pH e temperatura, permite a otimização das condições de

extração para maximizar a eficiência e recuperação de composto de interesse (CUNHA, 2008).

Neste contexto, o presente estudo buscou explorar como diferentes variáveis do processo de extração líquido-líquido por SAB influenciam na partição de vanilina entre as fases do sistema. Assim, avaliou-se os efeitos da massa molar do PEG, da composição global dos sistemas, da temperatura e da razão entre as massas das fases sobre a partição da vanilina.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes variáveis do processo de extração líquido-líquido por Sistema Aquoso Bifásico sobre a partição de vanilina entre as fases do sistema composto por polietilenoglicol (PEG) e sulfato de sódio.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da massa molar do PEG (1500 e 6000 g/mol) sobre a partição de vanilina, na forma pura, nos SAB formados pelo polímero e sal (sulfato de sódio);
- Avaliar a influência da composição global dos sistemas (22% PEG e 7% sal, 25% PEG e 8,5% sal, e 28% PEG e 10% sal) sobre a partição da vanilina nos sistemas estudados;
- Avaliar o efeito da temperatura (25, 35 e 45 °C) sobre a partição de vanilina nos SAB estudados;
- Avaliar o efeito da razão entre as massas das fases superior-inferior (3:1, 1:1, e 1:3, em massa) sobre a partição de vanilina.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Sistema Aquoso Bifásico

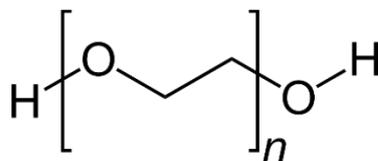
O Sistema Aquoso Bifásico, conhecido em inglês como *aqueous two-phase systems* (ATPS), é uma técnica eficiente para a extração líquido-líquido, especialmente adequada para produtos biológicos. Esses sistemas foram inicialmente propostos por Albertson em 1958. De acordo com Albertsson (1960), a ideia de extração líquido-líquido em misturas macromoleculares surgiu pela primeira vez em 1896, quando Beijerinck observou que a mistura de soluções aquosas de ágar e gelatina resultava em uma mistura turva que se separava em duas camadas líquidas distintas.

Apesar dessa observação inicial, foi somente em 1958 que Albertsson conduziu experimentos específicos utilizando soluções aquosas de polietilenoglicol e dextrana em processos de biosseparação. Esses experimentos estabeleceram a base para a utilização dos Sistemas Aquosos Bifásicos (SABs) na separação e purificação de biomoléculas, demonstrando sua eficácia e aplicabilidade em diversas áreas da biotecnologia (SAINT'YVES, 2020).

Os Sistemas Aquosos Bifásicos são um método de extração líquido-líquido caracterizado pela alta eficiência na transferência de massa, devido ao fato de que as duas fases do sistema são predominantemente aquosas (VELOSO, 2019). E, independentemente dos diferentes componentes que podem formar um SAB, cada fase do sistema deve ser constituída principalmente por um dos componentes formadores, tendo a água como componente majoritário. As biomoléculas são direcionadas preferencialmente para uma dessas fases, e essa separação ocorre em condições que normalmente não prejudicam as biomoléculas, devido à alta concentração de água em ambas as fases (VELOSO, 2019).

Normalmente, os SABs são constituídos por soluções aquosas de compostos como líquidos iônicos e álcoois (VELOSO, 2019), por dois polímeros hidrófilos ou por um polímero com determinados sais (SARUBBO, 2000), como o polietilenoglicol (PEG) (Figura 1) e o sulfato de sódio, dentre outras combinações de componentes. Quando a concentração desses compostos ultrapassa um determinado limite, as fases se separam espontaneamente (VELOSO, 2019). A escolha dos componentes depende das propriedades específicas da biomolécula alvo e das condições experimentais. E esses sistemas apresentam uma série de parâmetros essenciais que influenciam sua eficácia na separação de biomoléculas. Entre esses parâmetros estão a região bifásica e o comprimento da linha de amarração.

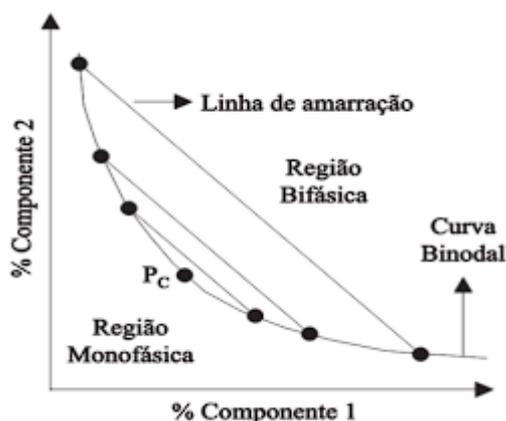
Figura 1 - Estrutura molecular do polietilenoglicol



Fonte: Santos (2018).

A região bifásica (Figura 2) é a área do diagrama de fase em que ocorre a separação em duas fases líquidas distintas. Isso acontece quando um sistema de duas fases imiscíveis é formado por uma mistura de dois polímeros estruturalmente distintos ou por uma mistura de eletrólito e polímero (BRAGA, 2022) em concentrações acima da concentração crítica. Nesse ponto, os dois componentes formadores de fase se incompatibilizam, resultando na formação de duas fases líquidas imiscíveis (ANTELO, 2007).

Figura 2 - Diagrama de fase de um SAB genérico



Fonte: Cardoso (2013).

O comprimento da linha de amarração (*CLA*) é uma propriedade importante nos Sistemas Aquosos Bifásicos que descreve a diferença de composição entre duas fases em equilíbrio. Esta propriedade representa a distância que une dois pontos de composição localizados na curva binodal, os quais representam a composição das fases em equilíbrio. Esse comprimento está intimamente relacionado ao coeficiente de partição de um composto específico, refletindo como esse material se distribui entre as duas fases do sistema (AGUIAR, 2016). O *CLA* é um parâmetro termodinâmico amplamente utilizado como uma variável nos processos de partição, desempenhando um papel determinante na separação de componentes

em sistemas bifásicos (SANTOS, 2012). Este parâmetro é calculado conforme a Equação 1:

$$CLA = \sqrt{(C1_s - C1_i)^2 + (C2_s - C2_i)^2} \quad (1)$$

Sendo $C1_s$ e $C1_i$ as concentrações do componente 1 nas fases superior e inferior, e $C2_s$ e $C2_i$ as concentrações do componente 2 nas fases superior e inferior, respectivamente.

O coeficiente de partição é um parâmetro chave em Sistemas Aquosos Bifásicos, sendo uma medida da distribuição de um soluto de interesse entre duas fases líquidas em equilíbrio. Este parâmetro é crucial para a compreensão e otimização dos processos de separação e purificação em SAB (SOUSA, 2015). O coeficiente de partição é definido como a razão das concentrações do soluto entre as duas fases distintas de um sistema bifásico. Matematicamente, é expresso pela Equação 2 (VELOSO, 2019):

$$k = \frac{C_s}{C_i} \quad (2)$$

Em que C_s é a concentração do componente de interesse na fase superior e C_i é a concentração do componente na fase inferior (VELOSO, 2019).

3.2 Aplicações de sistemas aquosos bifásicos para a partição de biomoléculas

Os Sistemas Aquosos Bifásicos são amplamente reconhecidos como uma técnica eficiente e versátil para a separação e purificação de biomoléculas como proteínas, enzimas, corantes, compostos bioativos, dentre outros. A purificação de proteínas utilizando SAB é uma das aplicações mais comuns (VELOSO, 2019), uma vez que esses sistemas oferecem vantagens significativas para a partição de proteínas devido à predominância de água em suas fases. Esse alto teor de água proporciona um ambiente suave e estável, o que é crucial para manter a integridade estrutural dessas moléculas e preservar sua atividade biológica durante o processo de separação (SILVA, 2014).

Os Sistemas Aquosos Bifásicos têm atraído crescente interesse devido ao seu potencial na purificação de enzimas e de outros compostos de interesse na indústria de alimentos. Esses sistemas se destacam por sua eficiência, rapidez e baixo custo, oferecendo uma alternativa mais econômica em comparação aos métodos tradicionais de extração, que geralmente são complexos e dispendiosos (MENEGOTTO *et al.*, 2020).

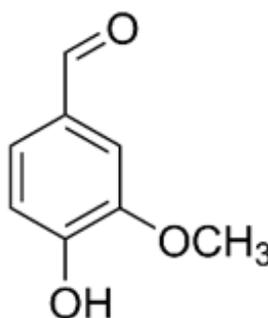
Os SAB também são utilizados na purificação de compostos bioativos de interesse alimentício, como a vanilina. A vanilina, um composto aromático com propriedades biológicas

como ação antioxidante e antimicrobiana (SILVA *et al.*, 2023), pode ser eficientemente separada das impurezas presentes em extratos naturais utilizando SAB, preservando suas propriedades sensoriais (CARDOSO, 2013) e biológicas. Ebrahimi e Sadeshi (2018) desenvolveram um SAB com álcool (1-propanol e 2-propanol) e açúcar (mono e dissacarídeos) e obtiveram uma extração de vanilina satisfatória. Além de aumentar a eficiência da extração, este método é sustentável e economicamente viável. Assim, alinhando-se às demandas da indústria moderna por processos mais verdes e eficientes (BARRETO, 2018).

3.3 Vanilina: características, aplicações e produção

A vanilina ($\text{CH}_3\text{O}(\text{OH})\text{C}_6\text{H}_3\text{CHO}$), ilustrada na Figura 3, é um aldeído aromático que faz parte dos compostos fenólicos simples. Sua estrutura química contém três grupos funcionais: um aldeído, um éter e um grupo fenol (MAZHARA *et al.*, 2023). A vanilina é solúvel em água e etanol à temperatura ambiente e apresenta-se como um pó branco com detalhes ligeiramente amarelos, com um odor forte e agradável, sendo o principal componente responsável pelo aroma característico da baunilha natural (PINHEIRO, 2021).

Figura 3 - Estrutura molecular da vanilina



Fonte: Cardoso (2013).

Na indústria alimentícia, a vanilina é valorizada por seu sabor doce e aroma reconfortante. Ela pode ser utilizada para realçar o sabor de uma ampla variedade de produtos, desde sorvetes, bolos, chocolates e bebidas (COSTA, 2023). A versatilidade da vanilina como agente flavorizante torna-a um ingrediente essencial em muitas receitas e produtos industriais (TAN, 2022). Além de seu uso em alimentos, a vanilina também é aplicada na indústria de fragrâncias e cosméticos, bem como na produção de fármacos e produtos de limpeza (SILVA *et al.*, 2023).

A demanda global por vanilina tem aumentado devido ao seu uso extensivo em vários

segmentos industriais, e espera-se que continue a crescer (MORDOR INTELLIGENCE, 2022). A produção mundial de vanilina está estimada em cerca de 20.000 toneladas por ano, com a maior parte proveniente da síntese química (LIAQAT *et al.*, 2023). O preço da vanilina varia significativamente dependendo da fonte de obtenção. O custo da vanilina natural, extraída das vagens de baunilha, oscila entre US\$ 1.200,00 e 4.000,00 por quilograma; valor elevado devido ao processo intensivo e de baixa produtividade envolvido na sua produção natural. Em contrapartida, a vanilina sintética é mais acessível, com preços variando em torno de US\$ 15,00 por quilograma (QIANQIAN *et al.*, 2022).

4 METODOLOGIA

4.1 Material

Para este experimento utilizou-se sulfato de sódio (Na_2SO_4), polietilenoglicol 6000 g/mol (PEG 6000), polietilenoglicol 1500 g/mol (PEG 1500) e vanilina, todos reagentes de grau PA. Os experimentos foram realizados com água deionizada.

4.2 Obtenção do diagrama de fase

Para obter o diagrama de fase (curva binodal) de um sistema contendo PEG e Na_2SO_4 , primeiro foi utilizada uma solução estoque de PEG 1500 a 50% m/m e uma solução estoque de Na_2SO_4 a 30% m/m. Em seguida, foi pesado aproximadamente 1,0 g da solução estoque de PEG 1500 em um tubo de ensaio. A solução foi titulada com a solução estoque de Na_2SO_4 até que a mistura se tornasse turva. Após isso, foram adicionadas alíquotas de água à mistura turva até que ela se tornasse transparente novamente. Os volumes de solução estoque salina e de água adicionados foram registrados. Esse processo foi repetido até obter um número suficiente de pontos para a curva. A titulação turbidimétrica para obtenção da curva foi repetida três vezes para as temperaturas de 25 °C, 35 °C e 45 °C, utilizando-se um banho termostático para manter a temperatura de trabalho.

As concentrações de PEG 1500 e Na_2SO_4 nos pontos de turvação (que indicam separação de fases) foram calculadas por meio de balanço de massa com base na densidade das soluções estoque e de água, na massa inicial da solução de PEG 1500 contida no tubo e nas massas da solução estoque de Na_2SO_4 e água adicionadas para obtenção de condições de turvação e transparência do sistema. O mesmo procedimento foi utilizado para obtenção da curva binodal nos sistemas compostos por PEG 6000 e Na_2SO_4 . Posteriormente, as curvas binodais obtidas experimentalmente foram correlacionadas utilizando o modelo matemático de Merchuk (Equação 3) (Merchuk *et al.*, 1998), empregando o *software SAS University Edition* (USA)

$$[PEG] = A \cdot \exp(B[sal]^{0,5} - C[sal]^3) \quad (3)$$

Onde $[PEG]$ e $[sal]$ representam as composições em fração mássica do PEG e do sal, respectivamente, e A , B e C são os parâmetros de ajuste do modelo.

4.3 Linhas de amarração

Para obter as linhas de amarração, foram preparadas soluções estoque de PEG 1500 a 50% m/m, PEG 6000 a 50% m/m e sulfato de sódio a 30% m/m. Os sistemas foram preparados a partir das soluções estoque em tubos de vidro graduados, com massa total de 8 g e as seguintes composições: 7% m/m de sal e 22% m/m de PEG para o ponto 1; 8,5% m/m de sal e 25% m/m de PEG para o ponto 2 e 10% m/m de sal e 28% m/m de PEG para o ponto 3. Os tubos foram tampados e agitados vigorosamente. Cada sistema (ponto) foi avaliado nas temperaturas de 25°C, 35°C e 45°C.

Os sistemas preparados foram mantidos em repouso por um período de 24 horas, em BOD na temperatura de trabalho para alcançar o equilíbrio e permitir a separação das fases. Em seguida, o volume de cada fase (inferior e superior) do sistema foi registrado e as fases foram separadas com o auxílio de uma seringa com agulha longa. A agulha foi introduzida no tubo, atravessando a interface com cuidado para minimizar perturbações. A fase inferior foi aspirada lentamente enquanto a agulha era movida para baixo para não aspirar a fase superior. A fase inferior foi coletada até que a interface ficasse próxima da abertura da agulha. As fases separadas foram pesadas em balança digital e as massas foram registradas.

As linhas de amarração (LA) foram determinadas utilizando a regra da alavanca para relacionar a composição das fases com a composição global do sistema. Para determinar as composições das fases das linhas de amarração, foi utilizado um sistema de quatro equações (Equações 4 a 7) e quatro incógnitas ($[PEG]_{sup}$, $[PEG]_{inf}$, $[sal]_{sup}$ e $[sal]_{inf}$), o qual foi resolvido utilizando o comando *solver* do *software* Microsoft Excel[®] (EUA):

$$[PEG]_{sup} = A \cdot \exp(B[sal]_{sup}^{0,5} - C[sal]_{sup}^3) \quad (4)$$

$$[PEG]_{inf} = A \cdot \exp(B[sal]_{inf}^{0,5} - C[sal]_{inf}^3) \quad (5)$$

$$\frac{m_{inf}}{m_{sup}} = \frac{[PEG]_{sup} - [PEG]_M}{[PEG]_M - [PEG]_{inf}} \quad (6)$$

$$\frac{m_{inf}}{m_{sup}} = \frac{[sal]_M - [sal]_{sup}}{[sal]_{inf} - [sal]_M} \quad (7)$$

Em que os subscritos *sup*, *inf* e *M* referem-se à fase superior, fase inferior e mistura, respectivamente, *m* corresponde à massa das fases, e $[PEG]$ e $[sal]$ são as concentrações de PEG e de sal.

O comprimento da linha de amarração (*CLA*) foi calculado conforme a Equação 1, enquanto a inclinação da linha de amarração (*ILA*) foi obtida conforme a Equação 8:

$$ILA = \frac{\Delta C1}{\Delta C2} \quad (8)$$

Onde $\Delta C1$ e $\Delta C2$ correspondem à diferença de concentração de PEG (*C1*) e sal (*C2*) nas fases superior e inferior respectivamente expressa em % m/m.

4.4 Preparo dos sistemas para partição

Para o preparo dos sistemas de partição foram utilizados tubos de vidro com capacidade de 10 mL. Sistemas de 8 g com as mesmas composições globais utilizadas para determinação da linha de amarração (item 4.3) foram preparados e adicionados de uma alíquota de 100 μ L de uma solução de vanilina a 0,3 mg/mL. Então, os sistemas foram agitados vigorosamente e mantidos em repouso para alcançar o equilíbrio nas temperaturas de 25 °C, 35 °C e 45 °C, durante um período de 24 horas. Após coleta das fases com o auxílio de uma seringa com agulha longa, a quantificação de vanilina em cada fase foi realizada em espectrofotômetro a 280 nm (CLAUDIO, 2010), em cubeta de quartzo. Água deionizada foi utilizada para zerar o equipamento e uma curva padrão preparada com soluções aquosas de vanilina foi utilizada para quantificação.

Para avaliação da partição vanilina, utilizou-se o coeficiente de partição, calculado conforme a Equação 2.

4.5 Análise estatística

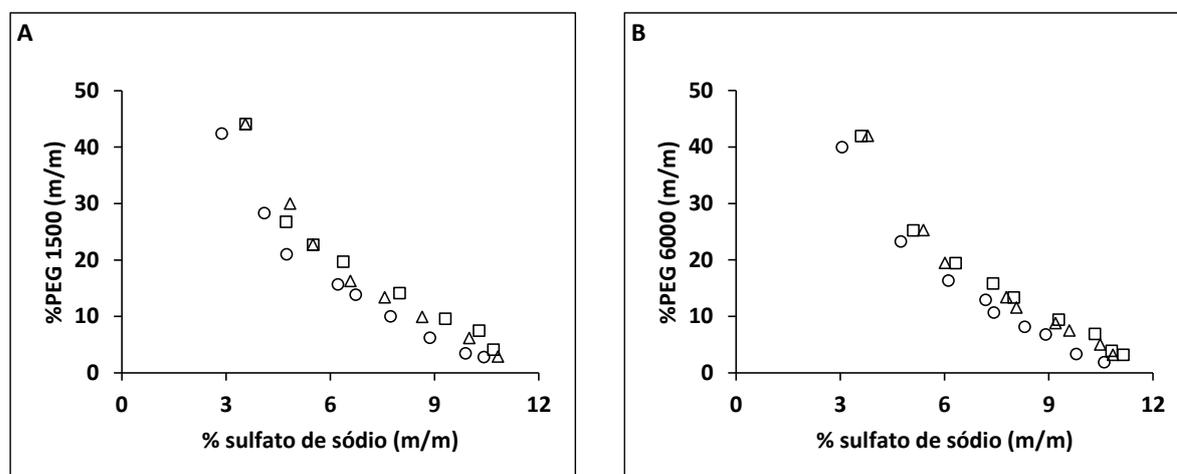
Os experimentos foram realizados em triplicata, e os dados obtidos foram apresentados como média e desvio padrão. Para o ajuste do modelo aos dados da curva binodal foram avaliados o coeficiente de determinação ajustado (R^2), o erro médio quadrático (*RMSE*) e a análise de variância (ANOVA) ao nível de 5% de significância. Os resultados de partição foram comparados por meio do teste de Tukey ($p < 0,05$). As análises estatística foram realizadas no *software* SAS University Edition (EUA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Curvas binodais

A análise das curvas binodais dos Sistemas Aquosos Bifásicos é crucial para entender a separação de fases e otimizar processos de partição de biomoléculas. Nas Figuras 4 e 5 são mostrados os efeitos da massa molar do PEG (1500 e 6000) e da temperatura (25 °C, 35 °C e 45 °C) sobre a formação da região bifásica, respectivamente.

Figura 4 - Diagrama de fase de sistema composto por (A) PEG 1500 + Na₂SO₄ + água e (B) PEG 6000 + Na₂SO₄ + água a (□) 25 °C, (Δ) 35 °C e (○) 45 °C



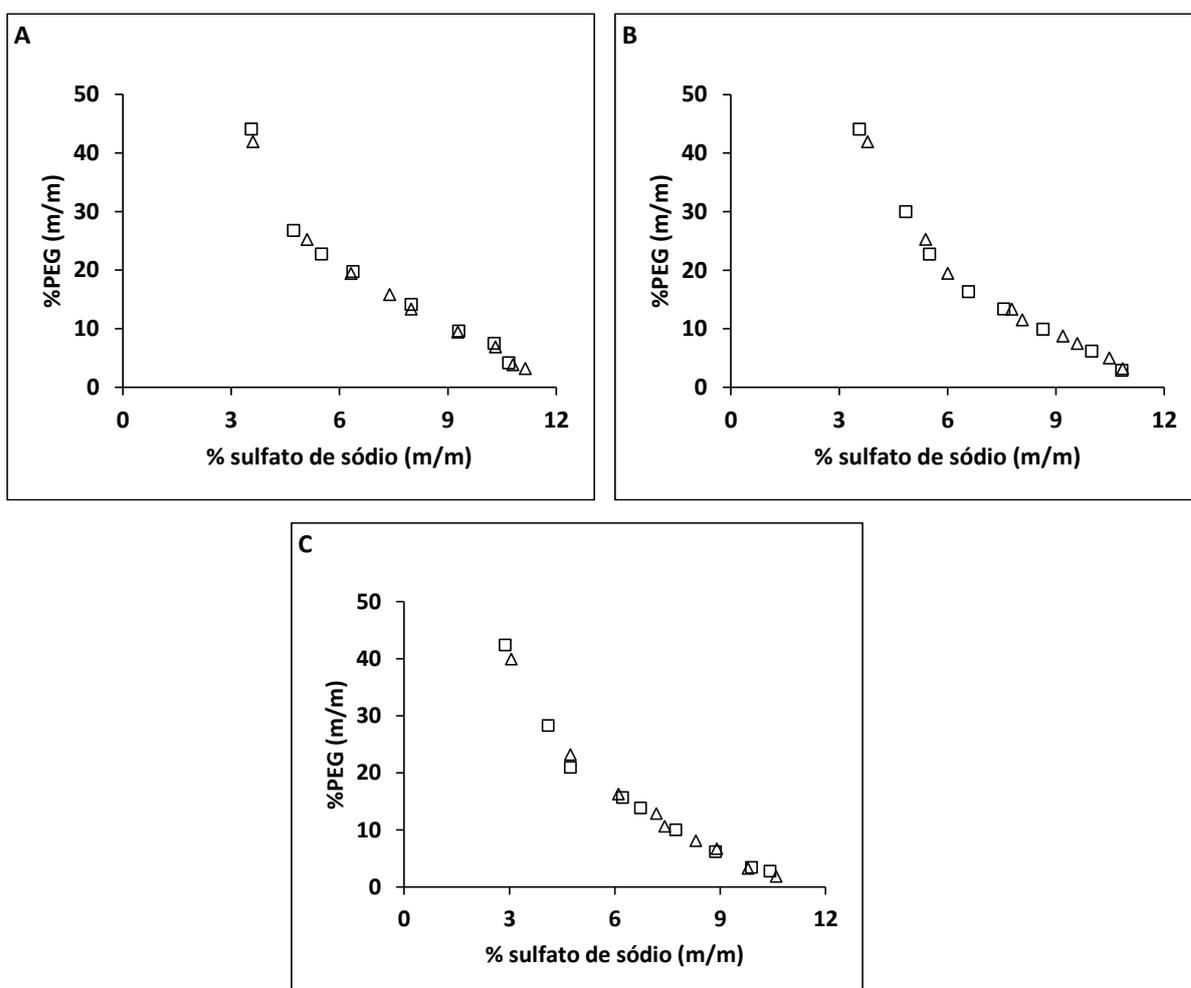
Fonte: do autor (2024).

Observa-se que as curvas binodais para as temperaturas de 25 °C e 35 °C se aproximam (Figura 4) nos sistemas com PEG 1500 e PEG 6000, o que sugere que para esses sistemas a separação de fases não foi influenciada pela temperatura na faixa avaliada. Por outro lado, a região bifásica apresentou ligeiro aumento com o aumento da temperatura para 45 °C, evidenciando que uma maior temperatura pode favorecer a separação de fases nesses sistemas. O resultado encontrado está de acordo com Mokarizadeh e Nemati-Kande (2022), que também observaram um aumento da região bifásica quando investigaram o aumento da temperatura em sua pesquisa utilizando PEG 2000 e citrato de trilítio.

Em relação ao efeito da massa molar do polímero, os resultados obtidos indicam que esse parâmetro não influenciou o tamanho da região bifásica nos sistemas compostos por PEG 1500 + Na₂SO₄ + água e PEG 6000 + Na₂SO₄ + água nas temperaturas de 25, 35 e 45 °C, como apresentado na Figura 5. Santos (2018) encontrou resultados similares aos apresentados no presente estudo ao avaliar sistemas compostos por polímeros (PEG 4000 ou PEG 6000) e sal

(sulfato de amônio, sulfato de sódio ou sulfato de lítio) a 25 °C, indicando que a massa molar do polímero não influenciou o tamanho da região bifásica. No entanto, Ferreira *et al.* (2009) relataram um pequeno aumento na região de separação de fases com o aumento da massa molar do polímero em sistemas compostos por polietilenoglicol (PEG 1500, 4000 ou 6000) e sal (potássio fosfato monobásico ou fosfato de potássio dibásico). Similarmente, Silva (2014) verificou em todas as temperaturas estudadas (10 °C, 25 °C e 40 °C) que o aumento da massa molar do PEG resultou em uma ampliação da área bifásica para os sistemas formados por polímero (PEG 1500, 3350 ou 6000) e sal (fosfato de sódio monobásico anidro ou fosfato de sódio dibásico anidro).

Figura 5 - Diagrama de fase de sistema composto por (□) PEG 1500 + Na₂SO₄ + água e (Δ) PEG 6000 + Na₂SO₄ + água a (A) 25 °C, (B) 35 °C e (C) 45 °C



Fonte: do autor (2024).

Na Tabela 1 são apresentados os coeficientes do ajuste da Equação 3 aos dados das curvas binodais para os SABs contendo PEG (1500 e 6000) e sulfato de sódio, juntamente com

os respectivos valores do coeficiente de determinação (R^2) e raiz do erro quadrático médio ($RMSE$), nas diferentes condições de temperatura.

Tabela 1 - Parâmetros dos ajustes da Eq. 3 às curvas binodais dos sistemas aquosos contendo PEG 1500/6000 + sulfato de sódio nas diferentes temperaturas (25°C, 35°C e 45°C)

Temperatura (°C)	A	B	C	R^2	$RMSE^*$
PEG 1500 + sulfato de sódio + água					
25	282,03110	-1,017910	0,00043	0,9909	0,8017
35	266,55510	-0,98681	0,00053	0,9920	0,8017
45	475,09090	-1,34899	0,00017	0,9774	1,3088
PEG 6000 + sulfato de sódio + água					
25	301,04180	-1,03554	0,00049	0,9900	0,8990
35	285,01100	-0,99506	0,00046	0,9922	0,7907
45	586,88880	-1,41030	0,00011	0,9751	1,3585

* $RMSE$ = root mean squared error = raiz do erro quadrático médio

Fonte: do autor, 2024.

O ajuste do modelo foi adequado ($p < 0,05$) (dado não apresentado), com valores de R^2 elevados ($R^2 > 0,9751$ para todos os sistemas e temperaturas) e de $RMSE$ baixos ($RMSE < 1,3585$), o que indica um ajuste preciso e confiável do modelo aos dados experimentais.

Para qualquer SAB, pontos localizados na região bifásica que compartilham a mesma linha de amarração (LA) resultam em sistemas com fases com composições idênticas. Isto é, as fases superiores desses sistemas apresentam composições iguais entre si, assim como as fases inferiores (SILVA, 2006). Nas Tabelas 2 e 3 são apresentadas as composições globais dos sistemas estudados, bem como as composições das fases superior e inferior obtidas pelas Eq. 4-7, o comprimento da linha de amarração (CLA) e a inclinação da linha de amarração (ILA) para cada sistema nas temperaturas estudadas.

Tabela 2 - Dados de equilíbrio para o sistema PEG 1500 + Na₂SO₄ + água a 25, 35 e 45 °C

<i>LA</i>	Composição global do sistema (%m/m)			Composição da fase superior (% m/m)			Composição da fase inferior (% m/m)			<i>CLA</i>	<i>ILA</i>
	PEG	SAL	H ₂ O	PEG	SAL	H ₂ O	PEG	SAL	H ₂ O		
25 °C											
1	22,00	7,00	71,00	31,77	4,44	63,79	4,50	11,58	83,92	28,20	-3,80
2	25,00	8,50	66,50	40,10	3,60	56,29	0,68	16,39	82,93	41,50	-3,10
3	28,00	10,00	62,00	47,30	3,00	49,62	0,09	20,05	79,86	50,20	-2,80
35 °C											
1	22,00	7,00	71,00	32,04	4,41	63,54	3,99	11,64	84,37	29,00	-3,90
2	25,00	8,50	66,50	35,43	4,04	60,53	0,09	19,16	80,76	38,40	-2,30
3	28,00	10,00	62,00	41,57	3,46	54,97	0,00	23,49	76,51	46,10	-2,10
45 °C											
1	22,00	7,00	71,00	33,18	3,87	62,96	3,07	12,31	84,62	31,30	-3,60
2	25,00	8,50	66,50	37,12	3,55	59,33	0,50	18,50	80,99	39,60	-2,40
3	28,00	10,00	62,00	44,95	3,04	52,00	0,18	21,42	78,40	48,40	-2,40

Legenda: *LA* = Linha de amarração, *CLA* = comprimento da linha de amarração, *ILA* = inclinação da linha de amarração.

Fonte: do autor, 2024.

Tabela 3 - Dados de equilíbrio para o sistema PEG 6000 + Na₂SO₄ + água a 25, 35 e 45 °C

LA	Composição global do sistema (%m/m)			Composição da fase superior (% m/m)			Composição da fase inferior (% m/m)			CLA	ILA
	PEG	SAL	H ₂ O	PEG	SAL	H ₂ O	PEG	SAL	H ₂ O		
	25 °C										
1	22,00	7,00	71,00	32,71	4,42	62,87	4,82	11,14	84,04	28,70	-4,20
2	25,00	8,50	66,50	41,84	3,55	54,61	0,77	15,62	83,61	42,80	-3,40
3	28,00	10,00	62,00	47,76	3,11	49,13	0,07	19,74	80,19	50,50	-2,90
35 °C											
1	22,00	7,00	71,00	32,09	4,62	63,29	6,16	10,74	83,10	26,60	-4,20
2	25,00	8,50	66,50	42,00	3,62	54,39	1,07	15,37	83,56	42,60	-3,50
3	28,00	10,00	62,00	47,87	3,16	48,97	0,11	19,60	80,30	50,50	-2,90
45 °C											
1	22,00	7,00	71,00	34,13	4,05	61,83	4,36	11,30	84,35	30,60	-4,10
2	25,00	8,50	66,50	41,88	3,49	54,63	1,51	15,47	83,02	42,10	-3,40
3	28,00	10,00	62,00	47,98	3,14	48,87	0,51	19,43	80,06	50,20	-2,90

Legenda: LA = Linha de amarração, CLA = comprimento da linha de amarração, ILA = inclinação da linha de amarração.

Fonte: do autor, 2024.

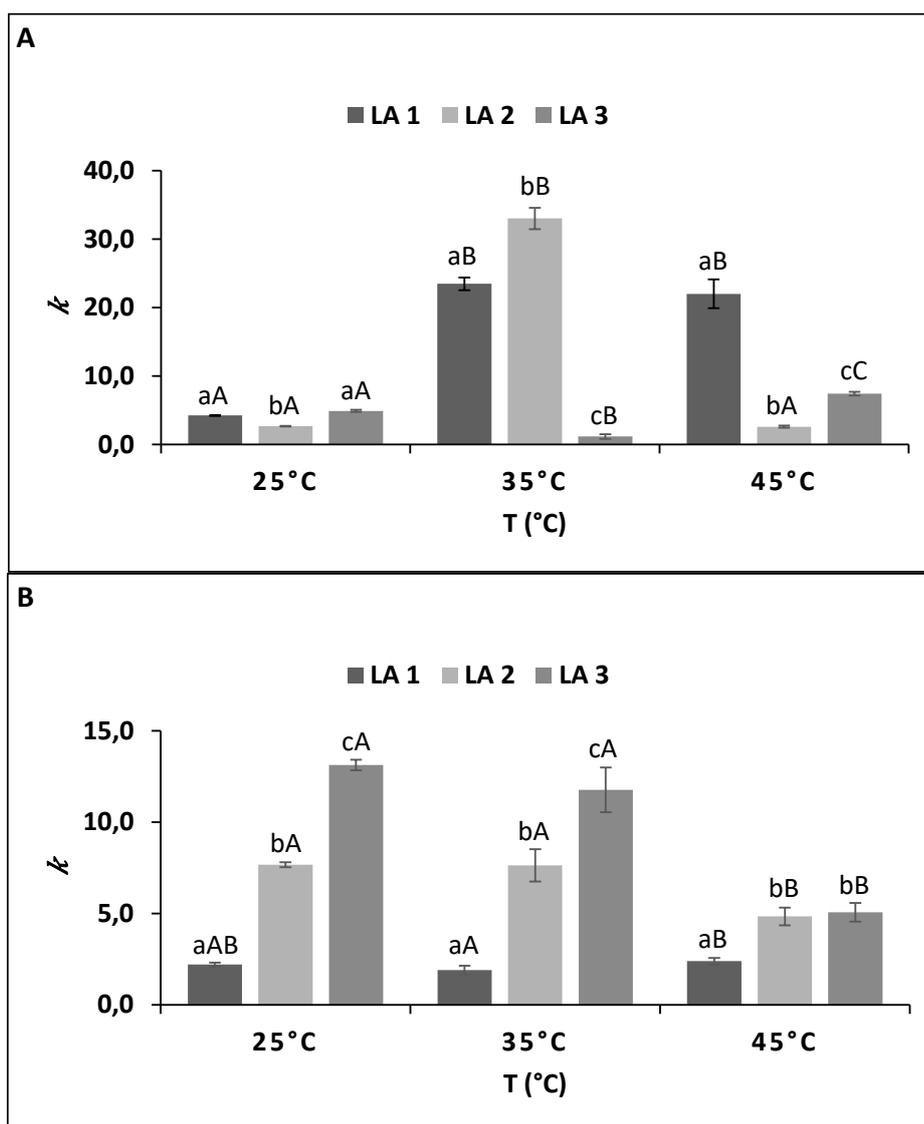
Os dados das Tabelas 2 e 3 fornecem informações sobre a distribuição dos componentes formadores de fase nos Sistemas Aquosos Bifásicos constituídos por PEG 1500 ou PEG 6000 e sulfato de sódio. Como esperado, verificou-se que para todos os sistemas, a fase superior é rica em PEG, enquanto a fase inferior é rica em sal. Esse comportamento é característico dos SABs compostos por polímero e sal, e pode ser explicado pelas propriedades de solubilidade dos componentes. O PEG, sendo um polímero hidrofílico, tende a se concentrar na fase superior, que é menos densa. Por outro lado, o sal, como um soluto inorgânico, prefere a fase inferior, mais densa e com maior capacidade de solvatação iônica (QUINTÃO, 2018).

Os dados analisados (Tabelas 2 e 3) mostram que, com o aumento das concentrações de PEG e de sal no sistema, há um aumento no comprimento da linha de amarração (*CLA*), assim como na inclinação (*ILA*) da mesma, resultado de acordo com várias pesquisas encontradas na literatura (OLIVEIRA, 2006; CARVALHO *et al.*, 2008; PARMOON, 2019). Uma possível razão para o aumento nos valores da *ILA* com o aumento da concentração dos componentes do SAB é a migração de água da fase superior para a fase inferior. Esse processo resulta em um aumento da concentração de PEG na fase superior e em uma diminuição da concentração de sal na fase inferior (SILVA, 2014).

5.2 Partição da vanilina em SAB

Na Figura 6 são apresentados os resultados do coeficiente de partição de vanilina nos Sistemas Aquosos Bifásicos estudados, o qual informa sobre a distribuição da vanilina entre as fases superior e inferior.

Figura 6 - Coeficientes de partição da vanilina em SAB composto por (A) PEG 1500 + Na₂SO₄ + água e (B) PEG 6000 + Na₂SO₄ + água a 25 °C, 35 °C e 45 °C



Legenda: LA = linha de amarração; LA 1 = SAB contendo 22% PEG + 7% sulfato de sódio; LA 2 = SAB contendo 25% PEG + 8,5% sulfato de sódio; LA 3 = SAB contendo 28% PEG + 10% sulfato de sódio.

*Médias com a mesma letra minúscula na mesma temperatura de partição não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). Médias com mesma letra maiúscula para mesma LA não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Fonte: do autor (2024).

O coeficiente de partição da vanilina nos Sistemas Aquosos Bifásicos foi maior que 1, indicando que a vanilina migrou preferencialmente para a fase superior rica em polietilenoglicol. Esse comportamento pode ser atribuído à maior afinidade da vanilina pelo PEG, em comparação com a fase inferior rica em sal. Nouri *et al.* (2023) encontraram resultados semelhantes em sua pesquisa de partição de vanilina em Sistema Aquoso Bifásico composto por PEG 6000 e dextrana 15000 ou 35000. A afinidade entre a vanilina e o PEG é influenciada pelas interações específicas entre esses dois componentes, incluindo interações hidrofóbicas (Nouri *et al.*, 2023).

Para o PEG 1500, a composição global do sistema apresentou um efeito variável sobre o coeficiente de partição, sem uma tendência claramente definida (Figura 6A), como também observado no estudo de Nemat-Kande *et al.* (2023) ao participarem salbutamol em SAB composto por PEG 2000 e citrato de lítio. Em contrapartida, para o sistema com PEG 6000, foi verificado um aumento no coeficiente de partição com o aumento da concentração dos componentes formadores de fase (Figura 6B), indicando uma relação direta entre os mesmos, corroborando os achados relatados por Salabat *et al.* (2008) que investigaram a partição de aminoácidos em sistemas contendo PEG 6000 e sulfato de sódio.

Em relação ao efeito da temperatura sobre a partição de vanilina em SAB com mesma composição global (isto é, mesma concentração dos componentes formadores de fase), os resultados obtidos demonstraram que a temperatura não apresentou um efeito claro sobre o coeficiente de partição da vanilina nos Sistemas Aquosos Bifásicos compostos por PEG 1500 ou PEG 6000 e sulfato de sódio (Figura 6). Ou seja, os resultados presentes na Figura 6 indicaram um comportamento variado, sem uma tendência clara de aumento ou redução nos valores de k com o aumento da temperatura para os sistemas avaliados, diferentemente do que foi observado por Cardoso *et al.* (2013), que relataram uma tendência de diminuição no valor de k com o aumento da temperatura em sistemas compostos por acetonitrila e dextrana para particionar vanilina.

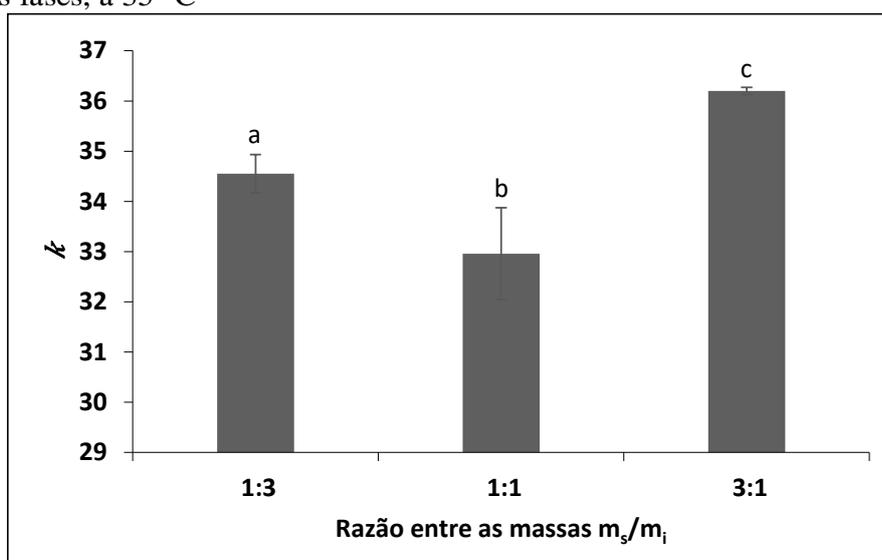
Para os SABs compostos por 25% de polímero e 8,5% de sal (LA = 2), assim como para os sistemas compostos por 28% de polímero e 10% de sal (LA = 3), também não foi possível identificar um efeito claro da massa molar do PEG sobre o coeficiente de partição ao analisar individualmente a partição em SABs compostos com mesma composição global, em cada temperatura avaliada. Verificou-se que a maior massa molar (PEG 6000) resultou em maior coeficiente de partição ($p < 0,05$) nos sistemas compostos por 25% de polímero e 8,5% de sal com partição a 25 e 45 °C, e por 28% de polímero e 10% de sal a 25 e 35 °C. Em contrapartida, para sistemas compostos por 22% de polímero e 7% de sal em todas as temperaturas avaliadas,

foram obtidos valores de coeficiente de partição significativamente maiores ($p < 0,05$) para sistemas com menor massa molar (PEG 1500).

No entanto, de forma geral, os valores de k observados para o PEG 1500 foram superiores aos obtidos para o PEG 6000. Essa tendência é consistente com os resultados relatados por Nemaki-Kande *et al.* (2023), que também observaram um aumento no coeficiente de partição com a redução da massa molar ao particinar salbutamol em SABs compostos por PEG com diferentes massas molares (PEG 1000, 1500, 2000, 4000 e 6000) e citrato de lítio.

Para os sistemas avaliados no presente estudo, o menor valor de coeficiente de partição ($1,17 \pm 0,06$) foi obtido para o sistemas composto por 28% PEG 1500 e 10% de sulfato de sódio a 35 °C, indicando que a vanilina praticamente não apresentou afinidade por uma fase ou outra desse sistema, na condição avaliada. Já o maior valor de k foi observado no SAB composto por 25% de PEG 1500 e 8,5% de sulfato de sódio, à temperatura de 35 °C, para o qual obteve-se um k de $33,0 \pm 0,02$ (Figura 6 A). Esse sistema foi, portanto, utilizado para avaliação do efeito da razão entre as massas das fases sobre o coeficiente de partição. Na Figura 7 são apresentados os resultados da partição de vanilina em 3 sistemas pertencentes à mesma linha de amarração que o sistema que resultou em maior partição (LA = 2; 25% de PEG 1500 e 8,5% de sulfato de sódio), ilustrando a influência da razão entre as massas das fases sobre a partição do composto de interesse.

Figura 7 - Coeficientes de partição de vanilina em sistemas aquosos compostos por PEG 1500 + Na₂SO₄ pertencentes à mesma linha de amarração e com diferentes proporções entre a massa das fases, a 35 °C



*Médias com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).
Fonte: do autor (2024).

A proporção entre a massa das fases não apresentou um efeito claro sobre a partição de vanilina, já que o aumento da proporção de fase superior (razão entre as massas 3:1), assim como o aumento da proporção de fase inferior (razão 1:3), resultaram no aumento de k quando comparados ao sistema com mesma razão de massa entre as fases (1:1) (Figura 7). Ademais, observou-se que o sistema com maior proporção de fase superior (razão entre massas 3:1) apresentou o maior coeficiente de partição ($k = 36,1 \pm 0,07$) (Figura 7), o que pode ser atribuído à maior quantidade de moléculas de PEG presentes na fase, o que por sua vez pode ter favorecido a migração da vanilina para a fase superior, rica no polímero.

Além disso, os valores de k obtidos no presente estudo foram, em geral, superiores aos reportados por Nouri *et al.* (2019), que investigaram a partição de vanilina em SAB composto por PEG 4000 e sulfato de sódio, obtendo valor de k igual a $19,3 \pm 0,39$.

6 CONCLUSÃO

Verificou-se, com este estudo, que a massa molar do PEG influenciou a partição da vanilina nos sistemas avaliados, com os maiores coeficientes de partição observados nos sistemas contendo PEG 1500. Quanto à temperatura, não foi possível identificar uma tendência consistente, embora o maior k tenha sido registrado a 35 °C no sistema com PEG 1500. A composição global do sistema apresentou efeitos distintos nos SABs estudados: para o PEG 1500, não houve uma relação clara entre a composição e o coeficiente de partição, enquanto para os sistemas com PEG 6000, o aumento da composição global resultou em um incremento no valor de k . Além disso, a razão entre as massas das fases não afetou o coeficiente de partição de forma clara, sendo que o maior valor de k foi observado no sistema com uma proporção de massas de 3:1 (superior:inferior). Apesar desses resultados, são necessários mais estudos para melhorar a compreensão do mecanismo de partição da vanilina e determinar as condições ótimas para a partição desse composto de interesse.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar como a presença de substâncias como açúcares e/ou proteínas pode afetar o coeficiente de partição da vanilina nos SABs;
- Explorar a influência da concentração de vanilina adicionada aos sistemas sobre o coeficiente de partição;
- Avaliar a utilização de outros sais para partição de vanilina em sistemas compostos por PEG e sal.

8 REFERÊNCIAS

- AGUIAR, C. D. **Estudo do equilíbrio de fases em novos sistemas aquosos bifásicos formados por [bmim]bf₄ + sulfatos de níquel, zinco e/ou cobre**. 2016. Dissertação Mestrado - Universidade Federal de Alfenas, Minas Gerais, 2016.
- ALBERTSSON, P. A. **Partition of Cell Particles and Macromolecules**. First Edition. Stockolm: Almquist e Wiksells, 1960. 231p.
- ANTELO, F. **Purificação de ficocianina de *Spirulina platensis* através de sistema aquoso bifásico e caracterização cinética da desnaturação térmica**. 2007. Dissertação Mestrado - Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul, 2007.
- BARRETO, C. L. R. **Obtenção de dados de equilíbrio de sistemas aquosos bifásicos visando a remoção de fenol**. 2018. Dissertação Mestrado - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Bahia, 2018.
- BIANCHETTI, L. M. **Produção de vanilina por bactérias cultivadas em hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratados com ozonólise**. 2022. Dissertação Mestrado - Universidade Estadual Paulista, Campus de São José do Rio Preto, 2022.
- BRAGA, G. B. **Determinação voltamétrica de bismuto em sistema aquoso bifásico e elaboração de um eletrodo de filme de bismuto a partir de fonte secundária**. 2022. Tese de Doutorado - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2022.
- CARDOSO, G. B. **Desenvolvimento de novos sistemas aquosos bifásicos compostos por acetonitrila para a extração de vanilina**. 2013. Tese de Doutorado - Universidade de Tiradentes, Sergipe, 2013.
- CARVALHO, C. P. *et al.* Influence of the temperature and type of salt on the phase equilibrium of peg 1500 + potassium phosphate and peg 1500 + sodium citrate aqueous two-phase systems. **Química Nova**, v. 31, p. 209-213, 2008.
- CLÁUDIO, A. F. M.; FREIRE, M. G.; FREIRE, C. S. R.; SILVESTRE, A. J. D.; COUTINHO, J. A. P. Extraction of vanillin using ionic-liquid-based aqueous two-phase systems. **Separation and Purification Technology**, v. 75, p. 39-47, 2010.
- COSTA, M. V. C. G. Cultivo experimental da baunilha (*Vanilla planifolia*). **Anais da VII Mostra de Docentes em RJI**. Fatec São José do Rio Preto, 2023.
- CUNHA, E. V. C. **Equilíbrio líquido-líquido em sistemas aquosos bifásicos água + PEG 8000 + sal: determinação experimental e modelagem termodinâmica**. 2008. Tese de Doutorado - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2008.
- DAUGSCH, A; PASTORE, G. Obtenção de vanilina: oportunidade biotecnológica. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 642-645, 2005.
- EBRAHIMI, N.; SADEGHI, R. Propanol – Sugar aqueous biphasic systems as a suitable platform for biomolecules extraction. **Elsevier**, v. 1581-1582, p. 156-157, 2018.
- FERREIRA, J. F.; PADILHA, G. S.; TAMBOURGI, E. B. Efeitos da massa molar e do pH sobre o equilíbrio termodinâmico do sistema bifásico aquoso PEG/fosfatos. **Exacta**, v. 7, n. 1, p. 49-56, 2009.
- LIAQAT, F. *et al.* Extraction, purification, and applications of vanillin: A review of recent advances and challenges. **Elsevier**, v. 204, p. 117372, 2023.

- LIMA, W. B. B. **Uso de sistema aquoso bifásico com solventes eutéticos profundos para recuperação e purificação parcial de β -galactosidase produzida por *Kluyveromyces lact.*** 2021. Trabalho de conclusão de curso - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2021.
- MAZHARA *et al.* Significant production of vanillin and in vitro amplification of ech gene in local bacterial isolates. **Brazilian Journal of Biology**, v. 83, p. e250550, 2023.
- MENEGOTTO, A. L. L. *et al.* Purificação de proteínas de *Spirulina platensis* utilizando sistema aquoso bifásico composto por polietilenoglicol e fosfato de sódio. **Simpósio de Segurança Alimentar**, 2020.
- MERCHUK, J. C.; ANDREWS, B. A.; ASENJO, J. A. Aqueous two-phase systems for protein separation. **Journal of Chromatography B**, v. 711, p. 285-293, 1998.
- MOKARIZADEH, M.; NEMATI-KANDE, E. Temperature Effect on the Phase Equilibrium of Polyethylene Glycol2000 + Trilithium Citrate + Water Aqueous Two-Phase Systems at T= 288.15, 298.15, 308.15, and 318.15 K. **Journal of Chemical & Engineering**, v. 67, p. 1237–12491238, 2022.
- MORDOR INTELLIGENCE. Tamanho do mercado de vanilina e análise de ações – Tendências e previsões de crescimento (2024 – 2029). Disponível em: <https://www.mordorintelligence.com/pt/industry-reports/vanillin-market>. Acesso em: 05 set. 2024.
- NEMATI-KANDE, E.; AZIZI, Z.; MOKARIZADEH, M. Phase diagrams of PEG1000,1500,2000,4000,6000 + lithium citrate+ water ATPSs, and the partitioning of salbutamol at T = 298.15 K. **Scientific Reports**, v. 13, p. 1045, 2023.
- NOURI, M. *et al.* Enhancement of Vanillin Partitioning and Recovery in Nanoparticle-based Aqueous Two-phase System Containing PEG and Dextran Polymers. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly.**, v, 37, p. 55–65, 2023.
- NOURI; M.; SHAHRIARI, S.; PAZUKI, G.. Increase of vanillin partitioning using aqueous two phase system with promising nanoparticles. **Scientific Reports**, v. 9, p. 19665, 2019.
- OIIVEIRA, R. M. **Equilíbrio de fases de sistemas aquosos bifásicos compostos por polietilenoglicol, sulfato de zinco, sulfato de cobre e citrato de sódio sob diferentes temperaturas.** 2006. Tese de doutorado – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.
- PARMOON, G.; NAFCHI, A. M.; PIRDASHTI3, M. Effects of the polymer molecular weight and type of cation on phase diagrams of polyethylene glycol + sulfate salts aqueous two-phase systems. **Hemijaska industrija**, v. 73, p. 375-385, 2019.
- PINHEIRO, S. S. T. **Desenvolvimento de um Método de DI-SPME-GC/MS/MS para Quantificar a Presença de Vanilina em Rolhas de Cortiça.** 2021. Dissertação de mestrado - Universidade Nova de Lisboa - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Portugal, 2021.
- QIANQIAN, M. *et al.* Extraction, purification, and applications of vanillin: A review of recent advances and challenges. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 8, p. 9, 2022.
- QUINTAO, J. C. **Sistema aquoso bifásico: obtenção de novos sistemas, partição e determinação de cloranfenicol.** 2018. Tese de doutorado – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2018.

REIS, I. A. O.; SANTOS, S. B.. Aplicação de sistemas aquosos bifásicos na purificação de tetraciclina. **Ciências da saúde: estudos e pesquisas avançadas**, v. 1, p. 17, 2023.

SAINT'YVES, F. A. **Partição De Ácido Propiônico Em Sistemas Aquosos Bifásicos Do Tipo PEG/Citrato**. 2020. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2020.

SALABAT, A.; ABNOSI, M. H.; MOTAHARI, A. Investigation of amino acid partitioning in aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol and inorganic salts. **Chemical & Engineering**, v. 53, p. 2018-2021, 2008.

SANTOS, J, K, L. **Recuperação de íons de cobre por sistemas aquosos bifásicos baseados em polietilenoglicol e sulfato de sódio utilizando iodeto de potássio como agente extrator**. 2018. Dissertação de mestrado – Universidade Tiradentes, Aracaju, 2018.

SANTOS, K. A. **Sistemas aquosos bifásicos para partição de amilases produzidas por *Aspergillus niger* atcc 10535 usando fermentação em estado sólido do resíduo de mandioca**. 2018. Dissertação Mestrado - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Bahia, 2018.

SANTOS, S. B. **Aplicação de sistemas aquosos bifásicos formados por álcoois e sais de fosfato de potássio na extração de biomoléculas**. 2012. Dissertação de Mestrado - Universidade de Tiradentes, Sergipe, 2012.

SARUBBO, L. A. **Caracterização de um novo sistema bifásico aquoso e aplicação em extração de proteínas com coluna de discos perfurados rotativos**. 2000. Tese de Doutorado - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2000.

SILVA, A. S. **Estudo do equilíbrio líquido – líquido em sistemas aquosos bifásicos formados por polietilenoglicol (1500, 3350 e 6000), sais de fosfato e água em diferentes temperaturas**. 2014. Dissertação de mestrado – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2014.

SILVA, L. H. M. Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. **Química Nova**, v. 29, p. 1345-1351, 2006.

SILVA, W. A. *et al.*. Biotecnologia da vanilina: Uma revisão sobre suas características e atividades biológicas. **Estrabão**, v. 4, p. 112–124, 2023.

SOUSA, K. M. **Aplicação de novos sistemas aquosos bifásicos baseados em tetrahidrofurano na participação de diuron**. 2015. Dissertação Mestrado - Universidade de Tiradentes, 2015.

TAN, D. N. **Desenvolvimento de microcápsulas de baunilha (*Vanilla Sp.*) com o uso da vanilina sintética**. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2022.

VELOSO, A. V.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. **Recuperação seletiva de ácido ascórbico e vanilina de resíduos alimentares em sistemas aquosos bifásicos contínuos utilizando reator agitado por impelidores**. 2019. Dissertação de mestrado – Universidade Tiradentes, Aracaju, 2019.