

UTILIZAÇÃO DO SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS PARA EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE FITASES APLICADA À NUTRIÇÃO ANIMAL

Data de submissão: 27/07/2023

Data de aceite: 02/10/2023

Júlio César dos Santos Nascimento

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Zootecnia Recife-PE
<https://orcid.org/0000-0003-3107-5876>

Apolônio Gomes Ribeiro

Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Zootecnia Areia-PB
<https://orcid.org/0000-0001-6730-0209>

Dayane Albuquerque da Silva

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Zootecnia Recife-PE
<https://orcid.org/0000-0001-6243-3969>

José António Couto Teixeira

Universidade do Minho, Departamento de Engenharia Biológica Braga-Portugal
<https://orcid.org/0000-0002-4918-3704>

Tatiana Souza Porto

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal Recife-PE
<https://orcid.org/0000-0002-1571-8897>

Ana Lúcia Figueiredo Porto

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal Recife-PE
<https://orcid.org/0000-0001-5561-5158>

RESUMO: A redução dos custos de produção tem sido uma questão amplamente discutida no contexto da produção animal atualmente. As formulações de dietas frequentemente utilizam alimentos que possuem fatores antinutricionais, como fitato e inibidores de proteases, que diminuem a biodisponibilidade dos nutrientes e dificultam a digestão por parte dos animais monogástricos. Diante disso, têm-se buscado alternativas tecnológicas para a extração e purificação de enzimas exógenas, como as fitases, a fim de melhorar a qualidade dos alimentos, reduzir os custos e aprimorar a digestibilidade dos nutrientes, eliminando parcial ou totalmente os fatores antinutricionais presentes na alimentação de aves e suínos. Nesse sentido, esta revisão de literatura tem como objetivo, trazer um artigo de revisão de literatura que aborde os avanços nos

métodos de separação e purificação de enzimas, com destaque para o sistema de duas fases aquosas (SDFA), o qual tem sido amplamente utilizado na separação de enzimas devido ao seu baixo custo em comparação com outros processos de purificação.

PALAVRAS-CHAVE: enzima exógena, fitato, fósforo fítico, sistemas de duas fases aquosas.

USE OF THE AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM FOR EXTRACTION AND PURIFICATION OF PHYTASES WITH APPLICATION TO ANIMAL NUTRITION

ABSTRACT: The reduction of production costs has been a widely discussed issue in the context of animal production currently. Diet formulations often use feed ingredients that contain antinutritional factors, such as phytate and protease inhibitors, which decrease nutrient bioavailability and hinder digestion in monogastric animals. In light of this, technological alternatives have been sought for the extraction and purification of exogenous enzymes, such as phytases, in order to improve food quality, reduce costs, and enhance nutrient digestibility by partially or completely eliminating the antinutritional factors present in the diets of poultry and swine. In this regard, this literature review aims to present an article that addresses advances in methods for enzyme separation and purification, with emphasis on the aqueous two-phase system (ATPS), which has been widely used for enzyme separation due to its low cost compared to other purification processes.

KEYWORDS: exogenous enzyme, phytate, phytic phosphorus, aqueous two-phase systems.

1 | INTRODUÇÃO

A utilização do Sistema de Duas Fases Aquosas (SDFA) tem se destacado como uma abordagem promissora para a extração e purificação de enzimas de interesse biotecnológico, como as fitases (Neira-Vielma et al., 2020). As fitases são enzimas que desempenham um papel crucial na hidrólise do ácido fítico (Pramitha et al., 2021), um anti-nutriente presente em alimentos vegetais, principalmente grãos e sementes, e que interfere na absorção de minerais essenciais pelos animais (Samtiya et al., 2020). Nesse contexto, a aplicação do SDFA na extração e purificação de fitases apresenta-se como uma alternativa eficiente e sustentável para a produção de aditivos nutricionais destinados à alimentação animal.

O sistema de duas fases aquosas é composto por duas soluções imiscíveis (Campos et al., 2018), geralmente uma solução aquosa e outra contendo um sal ou um polímero (Iqbal et al., 2016; Buarque et al., 2023). Essas soluções formam duas fases líquidas distintas, sendo uma fase rica em componentes hidrofóbicos e outra fase rica em componentes hidrofílicos. A formação dessas fases ocorre devido às interações entre as moléculas presentes nas soluções, como a hidrofobicidade e a polaridade. Essa característica do SDFA permite a separação seletiva de biomoléculas, como as enzimas, a partir de uma mistura complexa, facilitando sua extração e purificação (Buarque et al., 2023).

Estudos têm demonstrado o potencial do SDFA na extração e purificação de fitases. Um exemplo é o trabalho realizado por Bhavsar et al. (2012), onde ao avaliar o

processamento downstream da fitase extracelular de *Aspergillus niger*, utilizando um processo de cromatografia em comparação ao SDFA, demonstraram que mesmo permitiu uma maior recuperação da fitase (98,5%) em um curto período de tempo (3 h), bem como uma melhor termoestabilidade em comparação com a recuperação de 20% em 96 h por um processo cromatográfico regular, o que revela que O SDFA é uma alternativa interessante para particionamento e purificação simultâneos de fitases (Neira-Vielma et al., 2020).

Outro estudo relevante é o de Salmon et al. (2014), que avaliaram a purificação parcial de fitase produzida por *Schizophyllum commune*, utilizando um SDFA de polietilenoglicol (PEG)/citrato de sódio sob fermentação em estado sólido (FSS), concluíram que a extração da fitase pelo método SDFA no PEG forneceu um coeficiente de partição (K) de 2,63, rendimento (Y) de 367% e Fator de purificação (FP) de 5,43. Com isso, demonstraram que a SDFA no sistema PEG/citrato pode ser uma boa alternativa para reduzir os custos operacionais e as etapas de purificação para extração de fitase.

A utilização do SDFA na extração e purificação de fitases apresenta diversas vantagens em relação aos métodos tradicionais. Além da simplicidade de operação e baixo custo, o SDFA é uma abordagem amigável ao meio ambiente, pois não envolve a utilização de solventes orgânicos tóxicos. Além disso, a possibilidade de ajuste das condições do sistema, como a escolha das soluções e a otimização de parâmetros, permite um controle preciso do processo, resultando em uma maior eficiência e seletividade.

Diante do exposto, buscou-se com esta revisão discutir a importância do sistema de duas fases aquosas para extração e separação de fitases, por conta do seu baixo custo quando comparado a outros processos de purificação, com o intuito da inclusão em dietas de animais não-ruminantes, principalmente aves, suínos e peixes.

2 | SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS

Os processos utilizados para a separação e purificação de enzimas geralmente são responsáveis por cerca de 50% a 90% do custo total de produção. Os métodos convencionais utilizados para purificação de proteínas geralmente são dispendiosos, pois envolvem várias etapas de operação, alto custo dos reagentes e são difíceis de dimensionar. Nos últimos anos tem surgido um interesse no setor da biotecnologia para o desenvolvimento de métodos de separação e purificação inovadores que sejam eficientes, econômicos e que atinjam altos graus de recuperação e pureza, mantendo a atividade biológica da molécula. Uma promissora técnica de extração e purificação, que se enquadra nestes critérios, e já vem sendo utilizada industrialmente, envolve a partição de biomoléculas entre duas ou mais fases imiscíveis nos sistemas aquosos (BOERIS, 2009; ANTOV et al., 2006).

Avanços na biotecnologia têm oferecido numerosas possibilidades para o aumento da escala de produção de muitas biomoléculas que são importantes para pesquisas, principalmente para aplicações industriais. O desenvolvimento de técnicas e métodos

de separação e purificação de proteínas, entre outras moléculas tem sido de grande importância para muitos desses avanços na biotecnologia (MAZZOLA et al., 2008).

Métodos tradicionais para a purificação de biomoléculas compreendem várias etapas, tais como diálise, cromatografia de troca iônica e de afinidade, entre outros. Entretanto, a extração líquido-líquido consiste de uma alternativa de purificação interessante, pois vários processos podem ser combinados em uma simples operação. Extração líquido-líquido é a transferência de massa de certos componentes de uma fase para outra, quando fases líquidas parcialmente solúveis imiscíveis são colocadas em contato. Este processo é grandemente empregado na indústria química devido a sua simplicidade, baixo custo e facilidade no aumento da escala de produção. A purificação de biomoléculas tem sido bem sucedidamente realizada por mais de uma década. As vantagens deste tipo de sistema são baixa viscosidade, menor custos com reagentes e menor tempo de separação das fases (SIMON e OTTO, 2005).

A extração líquido-líquido trata-se de um processo bem estabelecido na indústria química, incluindo várias aplicações na indústria bioquímica tradicional, sendo largamente utilizada para substâncias lábeis, uma vez que muitas técnicas de separação sólido-líquido usado nos processos industriais bioquímicos, tais como filtração e centrifugação, são fortemente dependentes do tamanho da partícula e são limitadas quando se trata de processamento de células bacterianas ou de resíduos celulares. A extração líquido-líquido com solventes orgânicos tem apresentado aplicação limitada no processamento de bioprodutos sensíveis como proteínas e ácidos nucleicos devido às suas baixas solubilidades no solvente orgânico e pelo efeito desnaturante deste último (COSTA et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2001).

Os sistemas de duas fases aquosas foram primeiramente descritos na literatura por Beijerick (1896), quando ele descobriu que ao se misturar gelatina, ágar e água, em certas concentrações formava um sistema de duas fases, sendo a fase superior rica em gelatina e a fase inferior rica em ágar. Posteriormente, nos anos 50, Per-Aka Albertsson descobriu que o polietileno glicol (PEG), fosfato de potássio e água, e assim como o PEG, dextrana e água formam sistemas de duas fases. Os sistemas PEG/Dextrana/Água e PEG/Sal/Água têm sido, desde então, os mais frequentemente investigados e utilizados para purificação de um grande número de biomoléculas (COSTA et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2001).

As duas fases imiscíveis em sistemas de duas fases aquosas (SDFA) são geralmente formadas pela mistura das fases acima da concentração crítica dos componentes os quais descrevem diagramas de fases para cada sistema específico (OOI et al., 2011). SDFA são aplicáveis a purificação de células, devido ao alto conteúdo aquoso, baixa tensão interfacial e biocompatibilidade ambiental. O cultivo de células microbianas em SDFA tem sido demonstrado para a extração de enzimas, tais como glicosidases, proteases alcalinas, enzimas do complexo celulolítico, enzimas fibrinolíticas, α -amilase e β -galactosidase. Os SDFA são compostos principalmente por PEG e dextrana de alto peso molecular, ou

sistemas compostos por sais e polímeros, tal como PEG/fosfato e PEG/citrato (CANALES et al., 2009; ZHU et al., 2007; LING e LYDDIATT, 2005).

Os processos de separação, purificação e partição de biomoléculas que promovam bons níveis de recuperação em atividade e alto grau de pureza dos produtos biotecnológicos tem sido demandados pela indústria. Partição em SDFA têm se mostrado como um eficiente processo para a purificação de misturas de proteínas (NALINANON et al., 2009; BENSCH et al., 2007). Quando ocorre a separação das fases, um polímero é encontrado predominantemente em uma fase (superior) e o outro polímero, ou de sal em outra fase (inferior). Isso proporciona um ambiente adequado para a preservação da atividade biológica da molécula, devido ao alto teor aquoso de cada fase (entre 80% e 90%). Purificação de proteínas utilizando SDFA é influenciada por diversos parâmetros, tais como o pH do sistema, o tipo e a concentração de sais no sistema, a massa molecular e a concentração do polímero e as propriedades da proteína (por exemplo, a estrutura, a hidrofobicidade, a massa molecular) (AZEVEDO et al., 2009).

SDFA apresenta o potencial para produzir uma biomolécula concentrada e purificada em uma única etapa, quando comparado ao número de etapas envolvidas nos processos de separação convencionais, promovendo a recuperação, clarificação, filtração, concentração e purificação do bioproduto. Esta característica é altamente favorável para a purificação de proteínas. É importante saber que a extração de uma proteína-alvo em SDFA é uma opção antecedente a outros processos de separação, buscando uma separação e recuperação ótima (NASCIMENTO et al., 2010; ROSA et al., 2007).

Sistemas de duas fases aquosas, principalmente os sistemas com polietileno glicol (PEG) e sal, têm sido amplamente usados para biosseparação de enzimas e proteínas por conta do seu baixo custo. Além do mais o tipo do polímero e do sal, força iônica e pH do meio, juntamente com as características da molécula alvo (tamanho carga e hidrofobicidade), são as variáveis que mais influenciam a partição das moléculas. SDFA tem também sido empregado em diversos campos na indústria biotecnológica para purificação de enzimas, interferon, anticorpos, e na bioconversão extrativa. Esta técnica é considerada potencialmente atrativa para obter enzimas industriais, com fácil aumento de escala e minimização da desnaturação das proteínas, entre outras vantagens. Com o objetivo de obter alto rendimento e também bom fator de purificação para a proteína-alvo, uma composição adequada para o SDFA deve ser selecionada para se extrair de forma quantitativa a proteína desejável para uma das fases do sistema com a mínima contaminação possível, sendo a purificação o resultado de uma partição diferenciada da molécula-alvo e impurezas entre as duas fases líquidas (PORTO, 2004; PESSOA e KILIKIAN, 2005).

3 | A UTILIZAÇÃO DE ENZIMAS NA NUTRIÇÃO ANIMAL

O grande dinamismo da produção animal brasileira, dentre outros fatores, está diretamente relacionado à excelente capacidade dos profissionais da nutrição animal de formular dietas de qualidade e a custo reduzido, como também a um setor empresarial empreendedor, eficiente e, portanto, bastante competitivo. Para tanto, a utilização de modernos compostos, advindos da biotecnologia, é primordial, pois podem aumentar a produtividade, desta forma reduzindo os custos de produção (ARAÚJO, 2005).

Segundo o decreto lei nº 76.896 de 06 de janeiro de 1976, atualmente em vigor, define-se como aditivo alimentar toda a substância intencionalmente adicionada ao alimento, com a finalidade de conservar, intensificar ou modificar as suas propriedades, desde que não prejudique o seu valor nutricional. Os aditivos enzimáticos não possuem função nutricional direta, mas auxiliam o processo digestivo melhorando a digestibilidade dos nutrientes presentes na dieta animal. (CAMPESTRINI et al., 2005).

Inserida dentre o grupo dos aditivos alimentares estão as enzimas exógenas que são definidas como proteínas globulares, de estrutura terciária ou quaternária, que agem como catalisadores biológicos, aumentando a velocidade das reações químicas no organismo, sem serem elas próprias alteradas nesse processo. São altamente específicas para os substratos e dirigem todos os eventos metabólicos. As enzimas digestivas têm um sítio ativo que permite que elas atuem na ruptura de determinada ligação química sob condições favoráveis de temperatura, pH e umidade. A utilização de enzimas exógenas como aditivo alimentar tem por objetivo aumentar a disponibilidade dos nutrientes presentes nos alimentos. Os aditivos enzimáticos não possuem função nutricional direta, mas auxiliam o processo digestivo, melhorando a digestibilidade dos nutrientes presentes na dieta (YIN et al., 2001).

Nesse sentido, as enzimas são excelentes alternativas para reduzir os custos de produção de animais não-ruminantes, uma vez que há uma melhora significativa na digestibilidade dos alimentos, permitindo alterações nas formulações das rações de forma a minimizar os gastos, maximizando o uso de ingredientes energéticos e protéicos nas rações. Mathlouthi et al. (2003) obtiveram *in vitro*, uma diminuição da viscosidade dos grãos de trigo, centeio, milho e soja com o uso de uma combinação de xilanase e β -glucanase. Esse efeito positivo, segundo os autores, foi o responsável pela melhora no índice de conversão alimentar das poedeiras que receberam dietas suplementadas com essas enzimas.

Considerando o aumento da digestibilidade dos nutrientes da ração após a adição de um complexo enzimático, será possível fazer um ajuste adequado dos nutrientes na formulação e atender as exigências nutricionais dos animais não ruminantes em diferentes categorias, sendo também possível reduzir o custo da ração. A adição de enzimas exógenas em rações contendo ingredientes com alta porcentagem de polissacarídeos não-amiláceos

e fatores anti-nutricionais melhora a digestibilidade dos nutrientes e, conseqüentemente, exerce um efeito positivo sobre o desempenho de suínos e aves (HANNAS e PUPA, 2007).

4 | FITATO

O ácido fítico é definido quimicamente como éster hexafosfórico do álcool cíclico hexaídrico *mio*-inositol, sendo também conhecido como hexafosfato de inositol (IP₆), ou fitato, quando está na forma de sal, sendo o IP₃, IP₄ e IP₅ também designados como fitato (Figura 2). Apresenta-se como uma estrutura de baixo peso molecular, formada por seis grupos fosfatos ligados a um álcool ciclohexanopoliol, o inositol. O fitato é a principal forma de armazenamento do fósforo em tecidos vegetais, apresentando fórmula molecular C₆H₁₈O₂6P₆ e massa molecular 660,04 g.mol⁻¹ (KUMAR et al., 2010).

O ácido fítico é um complexo orgânico que ocorre em abundância nos grãos de cereais e oleaginosas, e sua principal função fisiológica nos vegetais é o armazenamento de nutrientes, principalmente de fósforo, que serão liberados pela ação de fitases endógenas à medida que ocorre a germinação da semente. Em média, 70% do fósforo total contido nos grãos de cereais e oleaginosas estão sobre a forma de fitato (CONSUEGRO, 1999). A concentração de fitato nos vegetais varia conforme o estágio de maturação, grau de processamento, tipo de cultivar, clima, disponibilidade de água, localização geográfica e quantidade de fósforo no solo, o qual a planta absorve e armazena complexando-o com o inositol para formar o ácido fítico (SEBASTIAN et al., 1998).

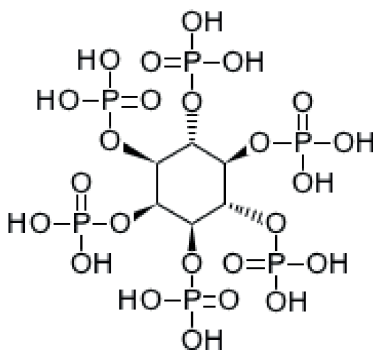


Figura 2. Estrutura molecular do ácido fítico (*mio*-inositol-1,2,3,4,5,6 hexafosfato) (COSGROVE, 1969).

A sociedade e os regulamentos estão cada vez mais exigentes com relação ao controle da poluição agrícola, particularmente na excreção do fósforo inorgânico, fato esse, que tem levado a intensificação das pesquisas sobre a utilização das fitases. O foco tem sido principalmente sobre a produção de fitase e sua utilização como um meio de reduzir a suplementação de fosfato inorgânico na alimentação dos animais não-ruminantes e conseqüente redução na excreção fecal de fósforo. A poluição ambiental, devido ao

estrume com muito fosfato, tem resultado na acumulação de fosfato em várias localizações, especialmente em corpos de água (VATS e BANERJEE, 2004).

O fósforo é um macro-mineral essencial para todos os animais. Este é necessário para várias funções no organismo, fundamental para manutenção e reparo de todos os tecidos, e juntamente com o cálcio e outros minerais são indispensáveis para o crescimento e mineralização do tecido ósseo, assim como desenvolvimento muscular. O consumo de fósforo em níveis adequados é propício para o balanço de minerais essenciais, para o controle do apetite e eficiência alimentar. Aproximadamente 80% do fósforo do organismo animal ocorre como constituinte dos ossos, e os 20% restantes encontrados em vários compostos orgânicos que desempenham função no metabolismo (transferência de energia – ATP, creatinina e enzimas), em ácidos nucleicos, e fosfolípidios de membranas celulares. O fosfato inorgânico participa no tampão de pH dos fluidos biológicos e também apresenta função no transporte de gordura e na síntese de aminoácidos e proteínas (FRANCE et al., 2010).

O ácido fítico possui a habilidade de se ligar à proteína (Figura 3). A interação com a proteína é dependente das condições de pH, pois a mesma se dá por ligação iônica. Em condições de acidez, o ácido fítico possui carga negativa podendo se ligar a resíduos básicos através de uma forte interação eletrostática, resultando em um complexo insolúvel. Em pH neutro a proteína não irá se ligar ao ácido fítico, pois sua carga é neutra. Com o pH básico, o ácido fítico forma complexo com a proteína na presença de cátions bivalentes, os quais irão agir como ponte entre o grupo carboxila carregado negativamente e o ácido fítico (COUSINS, 1999).

Três terminologias são usadas na literatura para descrever os substratos da fitase. O termo mais comumente utilizado é o ácido fítico. Já a denominação fitato refere-se à mistura de sais do ácido fítico. No entanto, a fitina, descreve especificamente ao complexo depositado de IP6 com potássio, magnésio e cálcio. Devido ao fitato ser um fator anti-nutricional nos alimentos de origem vegetal para os não-ruminantes, as fezes excretadas por estes animais apresentam altos teores de fósforo fítico e, também, nitrogênio, pois estes nutrientes presentes na molécula do fitato, somado à fonte inorgânica (fósforo) e ao aumento do nível de proteína na ração acima da exigência do animal, serão excretados (SELLE e RAVINDRAN, 2007).

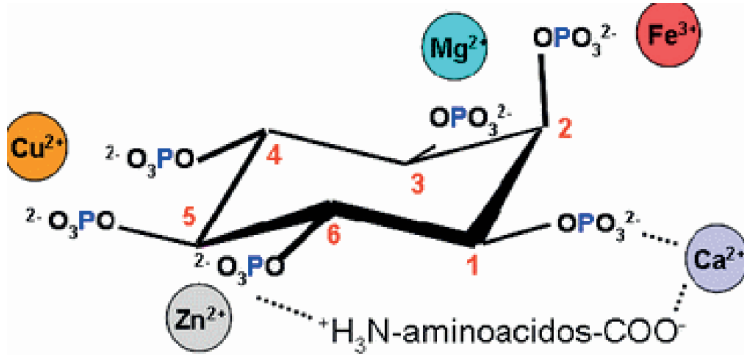


Figura 3. Interação química entre o ácido fítico, cátions e aminoácidos (BROZ et al., 1994).

A desfosforilação do fitato é um pré-requisito para o aumento do valor nutricional dos alimentos através da remoção dos grupamentos ortofosfatos do anel inositol, diminuindo assim o seu poder quelante, ou seja, a força de ligação com os minerais dietéticos, em consequência disso, ocorre um aumento na disponibilidade de minerais essenciais (KUMAR et al., 2010). Esta ligação ocorre naturalmente em ingredientes de origem vegetal e podem ser formados na porção inicial do trato gastrointestinal. Vários estudos demonstraram que proteínas da soja, milho, trigo, farelo de girassol e de arroz formam complexos com ácido fítico. Outra possível interação do ácido fítico é com as enzimas endógenas, como a tripsina, quimiotripsina e amilase do trato gastrointestinal, inibindo a atividade dessas enzimas com consequente decréscimo da digestibilidade de carboidratos e proteínas (RAVINDRAN et al., 2001).

LIMA et al. (2007), em uma revisão, mostram que a redução da digestibilidade protéica pode ser explicado pela formação de complexos entre o fitato e as proteínas da dieta, ou ainda, se complexar com enzimas proteolíticas (tripsina e pepsina), inibindo as suas atividades. Na digestão de lipídeos dietéticos, o complexo cálcio-fitato pode reagir com ácidos graxos formando sabões insolúveis no lúmen intestinal. Na digestão de carboidratos, liga-se diretamente ao amido ou inibe a ação catalítica da amilase.

5 | FITASES

Diversos tipos de processamento de alimentos e técnicas de preparação requerem a adição de enzimas exógenas, cujo objetivo é promover a redução do teor de fitato nos alimentos. A hidrólise do fitato durante o processamento dos alimentos é um resultado da degradação química pela atividade fitásica. Entretanto, as fitases têm importante aplicação na nutrição animal, tanto na degradação do fitato, tanto no processamento de alimentos, como no trato gastrointestinal. No entanto, a capacidade de desfosforilação do fitato (Figura 1) difere grandemente entre diferentes espécies de microorganismos e vegetais, devido à diferença nas suas propriedades bioquímicas em relação ao processo de hidrólise do ácido

fitico (EGLI et al., 2002).

As fitases formam um grupo de enzimas que são quimicamente definidas como *mio*-inositol (1,2,3,4,5,6) hexafosfato fosfohidrolases que catalisam a liberação sequencial do fósforo oriundo da molécula de ácido fítico. As fitases retiram os grupamentos ortofosfatos do anel inositol do ácido fítico para produzir fósforo inorgânico livre (Pi) (DEBNATH et al., 2005). O fitato possui seis grupos que podem ser liberados, dependendo da fitase utilizada, em velocidades e ordem diferentes. As fitases sintetizadas por fungos filamentosos e pela bactéria *Escherichia coli* conseguem liberar somente cinco dos seis grupos, sendo que os produtos finais são *mio*-inositol 2-monofosfato (WYSS et al., 1999).

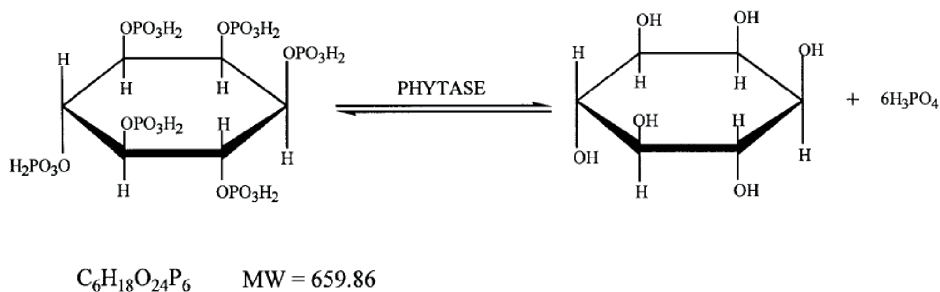


Figura 1. Hidrólise enzimática catalisada pela fitase na molécula do ácido fítico (KRISHNA e NOKES, 2001).

Fitases não somente liberam o fósforo de materiais dietéticos de origem vegetal, mas também tornam mais disponível o cálcio, magnésio, proteínas e lipídeos. Desta maneira, pela liberação do fósforo ligado em ingredientes de origem vegetal, tornam o fósforo mais disponível para o crescimento ósseo e protege o meio ambiente contra a contaminação pelo excesso de fósforo livre (BARUAH et al., 2007).

A fitase microbiana tornou-se disponível comercialmente em 1991 (Natuphos[®], produzida por *A. niger*), quando a legislação introduzida nos Países Baixos para controlar a poluição de fosfatos em unidades de criação de suínos e aves amplificou seu desenvolvimento e aceitação. O que antes era mais restrito aos países que adotavam essa legislação tornou-se globalmente utilizado com o reconhecimento do perigo ecológico da eutrofização, especialmente na última década. Além disso, essa proliferação das fitases no mercado gerou redução de preços e facilidades na aplicação da criação de animais não-ruminantes (KUMAR et al., 2010).

Com a proibição da adição de farelos de carne e ossos de animais na criação de não-ruminantes, houve um novo incentivo. Esses farelos, que foram proibidos na União Europeia em 2000, forneciam 57% do fósforo adicionado às rações. Essa proibição teoricamente gerou uma demanda de 110 mil toneladas de fósforo excedente, mas a utilização da fitase microbiana reduziu essa demanda para 26 mil toneladas (SELLE e RAVINDRAN, 2007). Seguindo a trajetória da fitase comercial no mercado, a sua aceitação como suplemento

na alimentação animal começou a ganhar atenção mundial (YI et al., 1996). Contudo, seu potencial na nutrição humana (SILVA et al., 2005) e em outras áreas, tais como aquicultura (YOO et al., 2005) estão também sendo extensamente explorados.

A União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) lista dois tipos de fitases, as quais tem sido classificadas em dois grupos, dependendo do local onde a hidrólise da molécula do fitato é iniciada e também, no pH da atividade (SELLE et al., 2007). Podem ser categorizadas em 3-fitases e 6-fitases. As 3 fitases (EC 3.1.3.8) são denominadas sistematicamente como *mio*-inositol hexaquis fosfato-3-fosfohidrolase atuando na hidrólise da ligação éster na terceira posição do IP₆ em IP₅ e ortofosfato livre (VATS e BANERJEE, 2004). No entanto, as 6-fitases (EC 3.1.3.26) são designadas quimicamente como *mio*-inositol hexaquis fosfato-6- fosfohidrolase, promovendo a catálise hidrolítica da ligação éster na sexta posição do IP₆. Recentemente, isto foi reportado para fitase produzida por *A. niger* que mostra atividade 3-fitásica, enquanto *Peniophora lycii* e *Escherichia coli* apresentam uma atividade 6-fitase (SELLE et al., 2007).

As fitases também podem ser categorizadas dentro de duas classes de acordo com o perfil de pH ótimo: fosfatases ácidas histidinas e fitases alcalinas. Fosfatases ácidas histidinas mostram uma atividade de pH ótimo na faixa de 5,0, enquanto as fosfatases alcalinas se mostram mais ativas na faixa de pH próximo a 8,0 (BARUAH et al., 2007). Exceto as fitases produzidas pelo gênero *Bacillus*, a maioria das enzimas degradadoras de fitato, tais como fitases vegetais, pertencem ao tipo acidófilo (SELLE et al., 2007). Além disso, o maior foco tem sido nas fitases ácidas devido a sua aplicabilidade na nutrição animal e possuir uma maior especificidade quanto ao substrato quando comparadas as fitases alcalinas (KUMAR et al., 2010).

De acordo com Kumar et al. (2010), em geral, as enzimas fitases são encontradas de quatro fontes possíveis: fitases vegetais, fitases microbianas (oriundas de bactérias, leveduras e fungos filamentosos), fitase de mucosa, a qual é produzida pelas células da mucosa do intestino delgado, e a fitase microbiana visceral-associada, produzida pela microflora no intestino grosso.

A fitase já foi encontrada em várias fontes vegetais, como trigo, milho, algumas ervas, arbustos, alfaces, centeio e sementes oleaginosas, sendo que a atividade mais alta foi encontrada no trigo (*Triticum aestivum*), no centeio (*Secale cereale*) e na cevada (*Hordeum vulgare*). As fitases obtidas de sementes em germinação e pólen têm sido purificadas e caracterizadas. Fitase alcalina também tem sido identificada no pólen de *Lilium longiflorum*, *Typha latifolia* e em sementes de legumes (ROOPESH et al., 2006). Aos vegetais, geralmente, atribuem-se baixos valores de fitase, mas Jongbloed e Kemme (1994) demonstraram que a fitase do trigo pode melhorar a digestibilidade do fósforo de 27 para 50%. Além disso, Kornegay (1996) demonstrou que a fitase do trigo atua em um limite de pH bem menor do que a fitase fúngica e ressaltou algumas vantagens, tais como maiores especificidades quanto ao substrato, portanto uma menor constante de afinidade

da fitase fúngica quando comparada a origem vegetal (FIREMAN e FIREMAN, 1998).

Apesar das fontes animais e vegetais representarem avanços científicos importantes, sua aplicação prática para produção de fitase é limitada. Em compensação, fontes microbianas apresentam características que permitem um alto rendimento e ampliação de escala, tornando-se amplamente utilizadas de maneira efetiva na indústria de rações animais. Várias espécies de fungos, bactérias e leveduras têm sido utilizadas na produção de fitases, geneticamente modificadas ou não (KIM et al., 2006).

6 | CONCLUSÃO

A utilização do sistema de duas fases aquosas para extração e purificação de fitases apresenta-se como uma técnica promissora para a obtenção de fitase com atividade hidrolítica, e potencial para aplicação na indústria de nutrição animal. A técnica é vantajosa por ser sustentável, econômica e não tóxica, contribuindo para a redução de resíduos e poluição ambiental. Com o desenvolvimento contínuo dessa técnica, é possível esperar avanços significativos na produção e aplicação de fitases na nutrição animal.

REFERÊNCIAS

ANTOV, M.G.; PERICIN, D.M.; DASIC, M.G. **Aqueous two-phase partitioning of xylanase produced by solid-state cultivation of *Polyporus squamosus***. *Process Biochemistry*, v.41, n.1, p. 232-235, 2006. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.06.010>

ARAÚJO, D.M. **Avaliação do farelo de trigo e enzimas exógenas na alimentação de frangas e poedeiras**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal da Paraíba, 66p., 2005.

AZEVEDO, A.M.; GOMES, A.G.; ROSA, P.A.J.; FERREIRA, I.F.; PISCO, A.M.M.O.; AIRES-BARROS, M.R. **Partitioning of human antibodies in polyethylene glycol - sodium citrate aqueous two-phase systems**. *Separation and Purification Technology*, v. 65, n.1, p.14-21, 2009. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2007.12.010>

BARUAH, K.; SAHU, N.P.; PAL, A.K.; JAIN, K.K.; DEBNATH, D.; YENGGOKPAM, S. **Interactions of dietary microbial phytase, citric acid and crude protein level on mineral utilization by Rohu, *Labeo rohita* (Hamilton), Juveniles**. *Journal of World Aquaculture Society*, v. 38, n. 2, p. 238-249, 2007. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2007.00092.x>

BENSCH, M.; SELBACH, B.; HUBBUCH, J. **High throughput screening techniques in downstream processing: preparation, characterization and optimization of aqueous two-phase systems**. *Chemical Engineering Science*, v. 62, n.7, p.2011-2021, 2007. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ces.2006.12.053>

BHAVSAR, K; KUMAR, V.R; KHIRE, J.M. **Downstream processing of extracellular phytase from *Aspergillus niger*: Chromatography process vs. aqueous two phase extraction for its simultaneous partitioning and purification**. *Process Biochemistry*, v.47, n.7, p.1066-1072, 2012. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.03.012>

BOERIS, V.; SPELZINI, D.; FARRUGGIA, B.; PICO, G. **Aqueous two-phase extraction and polyelectrolyte precipitation combination: A simple and economically technologies for pepsin isolation from bovine abomasum homogenate.** *Process Biochemistry*, v.44, n.11, p.1260-1264, 2009. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.07.001>

BROZ, J.; OLDALE, P.; PERRIN-VOLTZ, A.H. **Effects of supplemental phytase on performance and phosphorus utilization in broiler chickens fed a low phosphorus diet without addition of inorganic phosphates.** *British Poultry Science*, v.35, n.2, p.273-280, 1994. Doi: <https://doi.org/10.1080/00071669408417691>

BUARQUE, F.S.; GAUTÉRIO, G.V.; COELHO, M.A.Z.; LEMES, A.C. AND RIBEIRO, B.D. **Aqueous Two-Phase Systems Based on Ionic Liquids and Deep Eutectic Solvents as a Tool for the Recovery of Non-Protein Bioactive Compounds—A Review.** *Processes*, v.11, n.1, p.31, 2023. doi: <https://doi.org/10.3390/pr11010031>

CAMPESTRINI, E.; SILVA, V.T.M.; APPELT, M.D. **Utilização de enzimas na alimentação animal.** *Revista Eletrônica Nutritime*, v. 2, n.6, p.259-272, 2005.

CAMPOS, R.A.; PATRÍCIO, P.R.; VARGAS, S.J.R.; SILVA, L.H.M.; AND HESPANHOL, M.C. **Green speciation of iron using aqueous two-phase system.** *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v.90, n.2, p.1929-1944, 2018. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201820170631>

CANALES, M.; BALLESTEROS, C.; MORENO-CID, J.A.; ESPINOSA, A.M.; VILLAR M, DE LA FUENTE. **Extractive bioconversion to produce the *Aedes albopictus* akirin in an aqueous two-phase system supporting *Pichia pastoris* growth and protein secretion.** *Biochemical Engineering Journal*, v. 46, n. 2, p.105-114, 2009. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.04.014>

CONSUEGRO, J.P. **Uso de fitase microbiana em dietas para avicultura.** *Indústria Avícola*, v. 46, n.1, p.27-28, 1999.

COSGROVE, D.J. **Ion-exchange chromatography of inositol polyphosphates.** *New York Academy of Science*, v. 165, n. 2, p. 677-686, 1969. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1970.tb56434.x>

COSTA, S.A.; PESSOA JR, A.; ROBERTO, I.C. **Partitioning of xylanolytic complex from *Penicillium janthinellum* by an aqueous two-phase system.** *Journal of Chromatography B*, v. 743, n. 1-2, p. 339-348, 2000. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)00212-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)00212-7)

COUSINS, B. **Enzimas na nutrição de aves.** In: *Simpósio Internacional ACAV – Sobre Nutrição de Aves*. Anais, p.118-130, 1999.

DEBNATH, D.; SAHU, N.P.; PAL, A.K.; BARUAH, K.; YENGGOKPAM, S.; MUKHERJEE, S.C. **Present scenario and future prospects of phytase in aqua feed – Review.** *Asian-Australian Journal of Animal Science*, v. 18, n.12, p.1800-1812, 2005. Doi: <https://doi.org/10.5713/ajas.2005.1800>

EGLI, I.; DAVIDSSON, L.; JUILLERAT, M.A.; BARCLAY DANDHURRELL, R.F. **The influence of soaking and germination on the phytase activity and phytic acid content of grains and seeds potentially useful for complementary feeding.** *Journal of Food Science*, v.67, n.9, p.3484-3488, 2002. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb09609.x>

FIREMAN, A.K.B.A.T.; FIREMAN, F.A.T. **Fitase na alimentação de poedeiras;** *Revista Ciência Rural*, v. 28, n.3, p.529-534, 1998. Doi: <https://doi.org/10.1590/S0103-84781998000300029>

FRANCE, J.; DIAS, R.S.; KEBREAB, E.; VITTI, D.M.S.S.; CROMPTON, L.A.; LOPEZ, S. **Kinetic models for the study of phosphorus metabolism in ruminants and monogastric. Phosphorus and calcium utilization and requirements in farm animals.** Piracicaba: Cabi, Chap. 3, p. 18-44, 2010. Doi: <https://doi.org/10.1079/9781845936266.00>

HANNAS, M.I.; PUPA, J.M.R. Enzimas: uma alternativa viável para enfrentar a crise na suinocultura. Capturado em 26 setembro de 2007. Disponível em <http://www.engormix.com/enzimas_uma_alternativa_viavel_p_artigos_26_POR.htm> Acesso: 29 de junho de 2023.

IQBAL, M.; TAO, Y.; XIE, S.; ZHU, Y.; CHEN, D.; WANG, X.; HUANG, L.; PENG, D.; SATTAR, A.; SHABBIR, M.A.B.; HUSSAIN, H.I.; AHMED, S. AND YUAN, Z. **Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications.** *Biol Proced Online*, v.18, n.18 (2016). <https://doi.org/10.1186/s12575-016-0048-8>

JONGBLOED, A.W., KEMME, P.A. **Apparent digestibility and retention of nutrients bound to phytate complexes as influenced by microbial phytase and feeding regimen in pigs.** *Journal of Animal Science*, v.72, n.1, p.126-132, 1994. Doi: <https://doi.org/10.2527/1994.721126x>

KIM, T.; MULLANEY, E. J.; PORRES, J. M. **Shifting the pH profile of *Aspergillus niger* phy A phytase to match the stomach pH enhances its effectiveness as an animal feed additive.** *Applied and Environmental Microbiology*, v.72, n.6, p.4397-4403, 2006. Doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.02612-05>

KORNEGAY, E.T. **Effect of phytase on the bioavailability of phosphorus, calcium, amino acids, and trace minerals in broilers and turkeys.** BASF, Technical Symposium. World Congress Center, p. 39-70, 1996.

KUMAR, V.; SINHA, A.K.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. **Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review.** *Food and Chemistry*, v.120, n.4, p.945-959, 2010. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.052>

KRISHNA, C.; NOKES, S. E. **Influence of inoculum size on phytase production and growth in solid-state fermentation by *Aspergillus niger*.** *Trans. ASAE*, v.44, n.4, p.1031-1036, 2001.

LIMA, M.R.; SILVA, J.H.V.; ARAUJO, J.A.; LIMA, C.B.; OLIVEIRA, E.R.A. **Enzimas exógenas na alimentação de aves.** *Acta Veterinaria Brasilica*, v.1, n. 4, p.99-110, 2007. Doi: <https://doi.org/10.21708/avb.2007.1.4.485>

LING, T.C.; LYDDIATT, A. **Integration of mechanical cell disruption and fluidised bed recovery of G3PDH from unclarified disrupted yeast: a comparative study of the performance of unshielded and polymer shielded dye-ligand chromatography systems.** *Journal of Biotechnology*, v.119, n.4, p.43-48, 2005. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.05.029>

MATHLOUTHI, N.; MOHAMED, M.A.; LARBIER, M. **Effect of enzyme preparation containing xylanase and β -glucanase on performance of laying hens fed wheat/barley or maize/soybean mealbased diets.** *British Poultry Science*, v.44, n.1, p.60-66, 2003. Doi: <https://doi.org/10.1080/0007166031000085374>

MAZZOLA, P.G.; LOPES, A.M.; HASMANN, F.A.; JOZALA, A.F.; PENNA, T.C.V.; MAGALHÃES, P.O.; RANGEL-YAGUI, C.O.; PESSOA JR., A. **Liquid-liquid extraction of biomolecules: an overview and update of the main techniques.** *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v.83, n.2, p.143-157, 2008. Doi: <https://doi.org/10.1002/jctb.1794>

NALINANON, S.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; KISHIMURA, H. **Partitioning of Protease from Stomach of Albacore Tuna (*Thunnus alalunga*) by Aqueous-Two Phase Systems**. *Process Biochemistry*, v.44, n.4, p.471-476, 2009. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.12.018>

NASCIMENTO, K.S.; ROSA, P.A.J.; NASCIMENTO, K.S.; CAVADAB, B.S.; AZEVEDO, A.M.; AIRES-BARROS, M.R. **Partitioning and recovery of *Canavalia brasiliensis* lectin by aqueous two-phase systems using design of experiments methodology**. *Separation and Purification Technology*, v.75, n.1, p.48-54, 2010. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2010.07.008>

NEIRA-VIELMA, A.A.; ILINÁ, A.; ÁLVAREZ, G.M.; NASCIMENTO, C.O.; AGUILAR, C.N.; MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, J.L. AND CARNEIRO-DA-CUNHA, M.D.G. **Recovery and purification of *Aspergillus niger* phytase from crude extract using AOT / isoctane reversed micelles**. *Biotechnology Reports (Amst)*. May 20;26:e00471, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00471>.

OLIVEIRA, L.A.; SARUBBO, L.A.; PORTO, A.L.F.; LIMA-FILHO, J.L.; CAMPOSTAKAKI, G.M.; TAMBOURGI, E.B. **Physical and rheological characterization of polyethylene glycol-cashew-nut tree gum aqueous two-phase systems**. *Journal of Chromatography B*, v.766, n.1, p.27-36, 2001. Doi: [https://doi.org/10.1016/s0378-4347\(01\)00411-x](https://doi.org/10.1016/s0378-4347(01)00411-x)

OOI, C.W.; HII, S.L.; KAMAL, S.M.M.K.; ARIFF, A.; LING, T.C. **Extractive fermentation on using aqueous two-phase systems for integrated production and purification of extracellular lipase derived from *Burkholderia pseudomallei***. *Process Biochemistry*, v.46, n.1, p.68-73, 2011. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.07.014>

PESSOA JR., A.; KOLIKIAN, B.V. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**, Manole: São Paulo, 2005.

PORTO, T.S. **Extração de pró-toxina épsilon em de uma protease de *Clostridium perfringens* em sistemas de duas fases aquosas utilizando PEG/citrato**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, 2004.

PRAMITHA, J.L.; RANA, S.; AGGARWAL, P.R.; RAVIKESAVAN, R.; JOEL, A.J.; MUTHAMILARASAN, M. **Chapter Three - Diverse role of phytic acid in plants and approaches to develop low-phytate grains to enhance bioavailability of micronutrientes**. *Advances in Genetics*, v.107, n.1, p. 89-120, 2021. Doi: <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2020.11.003>

RAVINDRAN, V.; SELLE, P.H.; RAVINDRAN, G.; MOREL, P.C.H.; KIES, A.K.; BRYDEN, W.L. **Microbial phytase improves performance, apparent metabolizable energy, and ileal amino acid digestibility of broilers fed a lysine-deficient diet**. *Poultry Science*, v.80, n.3, p.338-344, 2001. Doi: <https://doi.org/10.1093/ps/80.3.338>

ROSA, P.A.J.; AZEVEDO, A.M.; AIRES-BARROS, M.R. **Application of central composite design to the optimisation of aqueous two-phase extraction of human antibodies**. *Journal of Chromatography A*, v.1141, n.1, p.50-60, 2007. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.11.075>

ROOPESH, K.; RAMACHANDRAN, S.; NAMPOOTHIRI, M.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. **Comparison of phytase production on wheat bran and oilcakes in solidstate fermentation by *Mucor racemosus***. *Bioresource Technology*, v.97, n.3, p.506-511, 2006. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.02.046>

SALMON, D.N.X.; WALTER, A.; PORTO, T.S.; MOREIRA, K.A.; VANDENBERGHE, L.P.S.; SOCCOL, C.R.; PORTO, A.L.F. AND SPIER, M.R. **Aqueous two-phase extraction for partial purification of Schizopyllum commune phytase produced under solid-state fermentation.** *Biocatalysis and Biotransformation*, v.32, n.1, p.45-52, 2014. Doi: <https://doi.org/10.3109/10242422.2013.872633>

SAMTIYA, M.; ALUKO, R.E. AND DHEWA, T. **Plant food anti-nutritional factors and their reduction strategies: an overview.** *Food Prod Process and Nutr*, v.2, n.1, p.1-14, (2020). Doi: <https://doi.org/10.1186/s43014-020-0020-5>

SEBASTIAN, S.; TOUCHBURN, S.P.; CHAVEZ, E.R. **Implications of phytic acid and supplemental microbial phytase in poultry nutrition: a review.** *Word's Poultry Science*, v.54, n.1, p.27-47, 1998. Doi: <https://doi.org/10.1079/WPS19980003>

SELLE, P.H., GILL, R.J., SCOTT, T.A. **Effects of pre-pelleted wheat and phytase supplementation on broiler growth performance and nutrient utilisation.** *Proceedings of Australian Poultry Science Symposium*, v.19, n.1, p.182-185, 2007.

SELLE, P.H.; RAVINDRAN, V. **Microbial phytase in poultry nutrition.** *Animal Feed Science and Technology*, v.135, n.1-2, p.1-41, 2007. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.06.010>

SILVA, L.G.; TRUGO, L.C.; TERZI, S. C.; COURI, S. **Low phytate lupin flour based biomass obtained by fermentation with a mutant of Aspergillus niger.** *Process Biochemistry*, v.40, n.2, p.951-954, 2005. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.02.016>

SIMON, L.; OTTO, H. **Aqueous Two-phase extraction - a case study in process analysis and control.** *AIChE AnnualMeeting*, Cincinnati, OH., p. 237, 2005.

VATS, P.; BANERJEE, U.C. **Production studies and catalytic properties of phytases (myo-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases): An overview.** *Enzyme and Microbial Technology*, v.35, n.1, p.3-14, 2004. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.03.010>

WYSS, M.; BRUGGER, R.; KRONENBERGER, A.; REMY, R.; FIMBEL, R.; OESTERHELT, G. **Biochemical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase): Catalytic properties.** *Applied and Environmental Microbiology*, v.65, n.2, p.367-373, 1999. Doi: <https://doi.org/10.1128/aem.65.2.367-373.1999>

YIN, Y.-L.; BAIDOO, S.K.; JIN, L.Z. **The effect of different carbohydrase and protease supplementation on apparent (ileal and overall) digestibility of nutrients of five hullless barley varieties in young pigs.** *Livesock Production Science*, v.71, n.2-3, p.109-120, 2001. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(01\)00215-9](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(01)00215-9)

YI, Z., KORNEGAY, E.T., RAVINDRAN, V., DENBOW, D.M. **Improving phytate phosphorus availability in corn and soybean meal for broilers using microbial phytase and calculations of phosphorus equivalency values for phytase.** *Poultry Science*, v.75, n.2, p.240-249, 1996. Doi: <https://doi.org/10.3382/ps.0750240>

YOO, G.Y.; WANG, X.; CHOI, S.; HAN, K.; KANG, J.C.; BAI, S.C. **Dietary microbial phytase increased the phosphorus digestibility in juvenile Korean rockfish *Sebastes schlegelii* fed diets containing soybean meal.** *Aquaculture*, v.243, n.1-4, p.315-322, 2005. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.10.025>

ZHU, J-H.; YAN, X-L.; CHEN, H-J.; WANG, Z-H. **In situ extraction of intracellular Lasparaginase using thermostable aqueous two-phase systems**. Journal of Chromatography A, v.1147, n.1, p.127-134, 2007. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.02.035>