UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

DESEMPENHO DE UM EXTRATOR TIPO GRAESSER NA SEPARAÇÃO DE PROTEÍNAS DO SORO DE QUEIJO USANDO SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS

Parecer

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida por Jane S. Reis Coimbra e aprovada pela Comissão Julgadora em 25.02.95

Jane S. Reis Coimbra
(Engenheira Química)

Prof. Antonio José A. Meirelles
(Orientador)

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos para obtenção do título de Doutor em Engenharia de Alimentos

Campinas - São Paulo

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Ao Felipe, ao Gustavo e à Mariane

To Jörg, a gentleman

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE TABELAS ..... *iv*

ÍNDICE DE FIGURAS ..... *vi*

NOMENCLATURA ..... *ix*

RESUMO ..... *xiii*

ABSTRACT ..... *xiv*

INTRODUÇÃO 1

OBJETIVOS 5

1. REVISÃO DE LITERATURA 6

1.1. Sistemas Aquosos Bifásicos 6

1.1.1. Tipos de Sistemas Aquosos Bifásicos 7

1.1.1.1. Polietileno Glicol 9

1.1.1.2. Reciclagem de Sais e Polímeros 10

1.1.2. Aspectos Fundamentais Sobre a Partição de Proteínas 11

1.1.2.1. Teoria Termodinâmica 13

1.2. Soro de Queijo 15

1.2.1. Proteínas do Soro de Queijo 17

1.2.2. Métodos de Purificação da α-Lactoalbumina e β-Lactoglobulina 19

1.3. Extração Líquido-Líquido 19

1.3.1. Princípios Básicos 20

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS 101

4.1. Conclusões 102

4.2. Sugestões 103

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 105

APÊNDICE 121

A1. Conjunto global dos resultados obtidos experimentalmente 121

A2. Figuras adicionais relativas aos experimentos realizado 129

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1. Comparação entre a constituição do leite humano e bovino, segundo DAVIES & LAW (1980) 16

Tabela 1.2. Propriedades físico-químicas da α-lactoalbumina e β-lactoglobulina[a] 18

Tabela 1.3. Tipos de extratores líquido-líquido usados industrialmente 24

Tabela 1.4. Comparação de custos entre três diferentes processos de produção de FDH, segundo KRONER et alii (1982) 27

Tabela 2.1. Composição do soro de queijo em pó 55

Tabela 3.1. Composição dos solventes para cromatografia líquida 58

Tabela 3.2. Programação gradiente-platô empregada na determinação analítica da α-lactoalbumina e β-lactoglobulina 58

Tabela 3.3. Relação de volumes de fases 64

Tabela A8. Concentração de α-lacotalbumina e β-lactoglobulina na saída das fases polimérica e salina. Alimentação: permeado da solução de soro de queijo dissolvido em KP_i. $V_{fpolimérica}$ = 36 ml/min, $V_{fsalina}$ = 44 ml/min..... 127

Tabela A9. Concentração de α-lacotalbumina e β-lactoglobulina na saída das fases polimérica e salina. Alimentação: permeado da solução de soro de queijo dissolvido em KP_i. $V_{fpolimérica}$ = 88 ml/min, $V_{fsalina}$ = 44 ml/min..... 127

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1.a. Extrator Graesser usado nos experimentos..... 47

Figura 2.1.b. Montagem experimental do extrator Graesser..... 48

Figura 2.1.c. Diagrama esquemático das correntes de entrada e saída no extrator..... 48

Figura 3.1. Cromatograma típico para padrões de α-lactoalbumina e β-lactoglobulina. CLRP, coluna mono Q, fluxo 1,0 ml/min, pressão 1,5-2 MPa, solvente A: 0,01 M KP_i, solvente B: 0,01 M KP_i + 1 M NaCl..... 59

Figura 3.2. Cromatograma de uma amostra do permeado (soro dissolvido em uma solução 18% KP_i). CLRP, coluna mono Q, fluxo 1,0 ml/min, pressão 1,5-2 MPa, solvente A: 0,01 M KP_i, solvente B: 0,01 M KP_i + 1 M NaCl..... 60

Figura 3.3. a. Curva de calibração construída em CLRP para α-lactoalbumina. Coluna mono Q, fluxo 1,0 ml/min, pressão 1,5-2 MPa, solvente A: 0,01 M KP_i, solvente B: 0,01 M KP_i + 1 M NaCl 61

Figura 3.3. b. Curva de calibração construída em CLRP para β-lactoglobulina. Coluna mono Q, fluxo 1,0 ml/min, pressão 1,5-2 MPa, solvente A: 0,01 M KP_i, solvente B: 0,01 M KP_i + 1 M NaCl 62

Figura 3.4. Cromatograma de uma amostra da fase salina do sistema 13% PEG-19% citrato de sódio, pH 7. CLRP, coluna mono Q, fluxo 1,0 ml/min, pressão 1,5-2 MPa, solvente A: 0,01 M KP_i, solvente B: 0,01 M KP_i + 1 M NaCl 66

Figura 3.5. Cromatograma de uma amostra da fase polimérica do sistema 13% PEG-19% citrato de sódio, pH 7. CLRP, coluna mono Q, fluxo 1,0 ml/min, pressão 1,5-2 MPa, solvente A: 0,01 M KP_i, solvente B: 0,01 M KP_i + 1 M NaCl 67

Figura 3.6. Cromatograma de uma amostra da fase salina do sistema 14% PEG-18% KP_i, pH 7. CLRP, coluna mono Q, fluxo 1,0 ml/min, pressão 1,5-2 MPa, solvente A: 0,01 M KP_i, solvente B: 0,01 M KP_i + 1 M NaCl 70

Figura 3.7. Cromatograma de uma amostra da fase polimérica do sistema 14% PEG-18% KP_i, pH 7. CLRP, coluna mono Q, fluxo 1,0 ml/min, pressão 1,5-2 MPa, solvente A: 0,01 M KP_i, solvente B: 0,01 M KP_i + 1 M NaCl 71

Figura 3.8. Viscosidade em função da taxa de deformação para a fase polímerica 73

Figura 3.9. Viscosidade em função da taxa de deformação para a fase salina 74

Figura 3.10. Viscosidade em função da taxa de deformação para a fase salina com o soro dissolvido 75

Figura 3.11. Distribuição de tempos de residência na fase polimérica, após a injeção de um pulso de azul de cibacron. $V_{fpolimérica}$ = 36 ml/min, $V_{fsalina}$ = 44 ml/min, 7 rpm 80

Figura 3.12. Influência da velocidade de rotação sobre a mistura axial na fase polimérica. Parâmetro: vazão da fase rica em PEG. $V_{fsalina}$ = 44 ml/min 81

Figura 3.13. Influência da velocidade de rotação sobre a mistura axial na fase polimérica. Parâmetro: relação de fase (polimérica/salina). $V_{fpolimérica}$ = 36 ml/min 83

Figura 3.14. Distribuição de tempos de residência na fase salina, após a injeção de um pulso de azul de dextrana. $V_{fapolimérica}$= 88 ml/min, $V_{fsalina}$ = 70 ml/min, 3 rpm 84

Figura 3.15. Influência da velocidade de rotação sobre a mistura axial na fase salina. Parâmetro: vazão da fase salina. $V_{fpolimérica}$ = 88 ml/min 85

Figura 3.16. Influência da velocidade de rotação sobre a mistura axial na fase salina. Parâmetro: vazão da fase polimérica. $V_{fsalina}$ = 70ml/min 87

Figura 3.17. Dependência do "hold up" com a velocidade de rotação. Parâmetro: relações de fase (polimérica/salina) 89

Figura 3.18. Dependência do "hold up" com a velocidade de rotação. Amostragens das fases salina e polimérica no centro do extrator. $V_{fpolimérica}$ = 36 ml/min, $V_{fsalina}$ = 70 ml/min 90

Figura 3.19. Distribuição de β-lactoglobulina entre as fases polimérica e salina. $V_{fpolimérica}$ = 88 ml/min, $V_{fsalina}$ = 44 ml/min 97

Figura 3.20. Distribuição de α-lactoalbumina entre as fases polimérica e salina. Parâmetro: relação de fase (polimérica/salina). 1: $V_{fpolimérica}$ = 36 ml/min e $V_{fsalina}$ = 44 ml/min. 2: $V_{fpolimérica}$ = 88 ml/min e $V_{fsalina}$ = 70 ml/min 98

Figura 3.21. Relação entre o número de unidades de transferência considerando escoamento com mistura axial (Nox) e comportamento ideal do tipo pistão (Noxp) 100

Figura A2.1. Tempo de decantação para a fase polimérica após mistura com a fase salina em um tanque de agitação 128

Figura A2.2. Distribuição de tempos de residência para um pulso de azul de cibacron na fase polimérica. 5 rpm, $V_{fase\ polimérica}$=36 ml/min, $V_{fase\ salina}$=44 ml/min 128

Figura A2.3. "Hold up" determinado no centro do extrator na interface entre os líquidos.... 129

NOMENCLATURA

a, área interfacial por unidade de volume do extrator	$[L^2.L^{-3}]$
c, concentração do soluto ou traçador	$[M.L^{-3}]$
D_X, coeficiente de mistura axial	$[L^2.T^{-1}]$
E_θ, função resposta para a DTR	[-]
h, largura do compartimento do extrator	[L]
k, coeficiente de transferência de massa	$[L.T^{-1}]$
L, comprimento do extrator	[L]
t, tempo	[T]
$\bar{t}$, tempo de residência médio	[T]
U, velocidade linear média	$[M.T^{-1}]$
V, volume da fase polimérica	$[L^3]$
VL, velocidade linear da fase	$[L.T^{-1}]$
V_t, volume total	$[L^3]$
Vz, vazão de fase	$[L^3.T^{-1}]$
z, distancia axial, medida da entrada da fase X na direção do escoamento	[L]

ADIMENSIONAIS

B, comprimento (B = h/L)

C, concentração do soluto ou do traçador ($C_x = c_x/c_x^0$, $C_y = c_y/c_x^0$)

f_X, f_Y, fatores de peso (equações 3.18 e 3.19)

Hd, fração de volume da fase polimérica, "hold up" (equação 3.7)

HTU, altura de uma unidade de transferência (equação 1.4)

K, coeficiente de partição (equação 1.1)

m, m', m", coeficientes de distribuição

Nox, NTU, número de unidades de transferência global (equação 1.3)

Noxd, número de unidades de transferência considerando a dispersão (equação 3.15)

Noxp, número de unidades de transferência considerando fluxo ideal (equação 3.16)

Pe, número de Peclet ($Pe = UL/D_x$)

Q, interseção na curva de equilíbrio ($C_x^* = Q + mC_y$)

X_1, concentração generalizada de soluto na fase X (equação 3.12)

Y, concentração de soluto na fase y

z', coordenada espacial

Z, fração do comprimento da coluna ($Z = z/L$)

LETRAS GREGAS

α, expoente ajustável	[-]
ρ, densidade da fase	
$[L.M^{-3}]$	
η, viscosidade	$[ML^{-1}.T^{-1}]$
κ, coeficiente numérico	[-]
λ, fator de extração	[-]
θ, tempo adimensional ($\theta = t/t$)	[-]
θ_c, média (equação 3.5)	[-]
σ, tensão interfacial	$[M.T^{-2}]$
σ_θ, variância (equação 3.6)	[-]
Φ, fator de correlação	[-]

SOBRESCRITOS

*, equilíbrio

0 e 1, entrada e saída da alimentação

SUBSCRITOS

b e t, fases de fundo e de topo

conf., conformacional

el., eletrostáticas

hidfil., hidrofílicas

hid., hidratação

hidrof., hidrofóbicas

i, interface

lig., ligante

liq1 e liq2, líquidos 1 e 2

p, escoamento tipo pistão

0 e 1, entrada e saída de líquidos

ABREVIATURAS

ARD, extrator de discos rotativos assimétricos ("Asymmetric Rotating Disc contactor")

AMG, amiloglucosidase

ASB, albumina de soro bovino

CLRP, cromatografia líquida e rápida de proteínas (FPLC - "Fast Protein Liquid Chromatography")

DTR, Distribuição de Tempos de Residência

FDA, "Food and Drug Administration"

FDH, formiato desidrogenase

KP_i, fosfato de potássio monobásico e fosfato de potássio dibásico

α-la, α-lactoalbumina

β-lg, β-lactoglobulina

PEG, Polietileno Glicol

PEO, óxido de polietileno

RDC, extrator de discos rotativos ("Rotating Disc Contactor")

SAB, sistemas aquosos bifásicos

UV, Ultravioleta

RESUMO

Sistemas aquosos bifásicos compostos por 14% de polietileno glicol 1550 e 18% de fosfato de potássio, pH 7, foram empregados para a separação de biomoléculas por meio da extração líquido-líquido em uma unidade horizontal do tipo Graesser, operada continuamente e em modo contracorrente.

O desempenho do equipamento foi caracterizado a partir da análise de distribuição de tempos de residência, do coeficiente de mistura axial nas fases ricas em polietileno glicol e em sal, dos estudos do "hold up" da fase polimérica e da transferência de massa. As características hidrodinâmicas descritas para os sistemas orgânicos tradicionais foram reproduzidas nos experimentos com sistemas aquosos bifásicos. Na faixa de velocidades de agitação estudada, de 3 rpm a 9 rpm, os dois líquidos se dispersaram mutuamente, não formando fases contínua e dispersa distintas. Os tempos de residência médios foram de 60 min e de 90 min para as fases polimérica e salina, respectivamente.

O estudo da transferência de massa foi fundamentado na partição das proteínas soro de queijo, α-lactoalbumina e β-lactoglobulina, com uso na formulação de suplemento alimentar para lactentes, gestantes e pacientes que recebem medicamentos por via parenteral. O processamento visou isolar a β-lactoglobulina, identificada como o principal componente alergênico do leite bovino.

As condições operacionais mais favoráveis à separação das proteínas foram velocidade de rotação de 3 rpm e baixas relações de vazão entre as fases. A quantidade de proteínas de soro em pó, tratada diariamente, foi de aproximadamente 600 g. A α-lactoalbumina foi concentrada na fase polimérica e a β-lactoglobulina permaneceu na fase salina, sendo assim satisfatoriamente separadas em fases distintas.

ABSTRACT

The isolation and purification of α-Lactalbumin and β-Lactoglobulin from whey were studied using an aqueous two-phase system based on polyethylene glycol and potassium phosphate. Continuous extraction experiments were carried out in a Graesser Raining Bucket Contactor. The performance was characterized by determining the axial mixing coefficients and counter current mass transfer of α-Lactalbumin. The influence of rotor speed, phase ratio and phase velocity on the axial mixing coefficient was analyzed applying a dispersion model to the residence time distribution experiments. The mean residence time was 60 min for the PEG rich-phase and 90 min for the salt-rich phase. When dissolving dry whey powder in the salt-rich phase of the system α-Lactalbumin was extracted to the polyethylene glycol-rich phase, whereas β-Lactoglobulin predominantly remained in the bottom phase, making the process suitable for the removal of the major antigen, β-Lactoglobulin. The mass transfer in the two-phase system was determined from the steady state data of α-Lactalbumin extraction. On the basis of a diffusion model, the efficiency of the counter current extraction under different process conditions was calculated from these measurements. More than 600g of dry whey proteins could be processed per day in the small scale Graesser Contactor employed.

INTRODUÇÃO

A viabilidade da comercialização e da produção em escala industrial de substâncias obtidas por meio da biotecnologia dependem significativamente das técnicas de separação empregadas na purificação do composto desejado. As características de baixa concentração inicial, os requisitos de alta pureza dos produtos, a sensibilidade térmica e a necessidade de preservar as principais propriedades dos compostos tornam esta etapa uma das mais onerosas nos custos globais de produção. Assim, a etapa de purificação requer um método biocompatível e econômico (ATKINSON & SAINTER, 1982).

A utilização da extração líquido-líquido para a recuperação de ácidos orgânicos e de moléculas pequenas, como de etanol, é apresentada na literatura como promissora, entretanto, quando se trata do processamento de biomoléculas, o número de solventes capazes de conjugar solubilidade e estabilidade é muito limitado (MATTIASON & LARSSON, 1985). No caso de purificação de biomoléculas, uma variante da extração líquido-líquido tradicional vem sendo testada com sucesso. É a extração com sistemas aquosos bifásicos, SAB. São sistemas de extração constituídos por duas fases aquosas imiscíveis ou parcialmente miscíveis, obtidas pela adição de dois polímeros hidrófilos, como o polietileno glicol (PEG) e a dextrana, ou de um destes e um sal, como o PEG e o fosfato de potássio. Os polímeros podem ser sintéticos ou naturais. O PEG é um éter polimérico sintético e a dextrana é uma cadeia de açúcar natural.

Devido ao alto conteúdo de água presente no sistema é possível separar e purificar substâncias de origem biológica sob condições amenas em um ambiente adequado, de forma a preservar suas principais características (KULA *et alii*, 1982; ALBERTSSON, 1986). É importante destacar o crescente interesse relacionado com a aplicação dos SAB no tratamento destes compostos. Tem sido enfatizada a ampliação de escala de laboratório para planta piloto (HUSTED *et alii*, 1985a; PAPAMICHAEL *et*

alii, 1992), a modelagem do processo de partição dos componentes (KING *et alii*, 1988; GROßMANN *et alii*, 1993; EITEMAN, 1994) e o desenvolvimento de novos sistemas de fases (SZLAG & GIULIANO, 1988). A extração com SAB apresenta vantagens sobre outros processos de purificação, como centrifugação ou precipitação fracionada, quando são consideradas misturas complexas de proteínas. O emprego dos SAB em diferentes tipos de extratores, para purificação de proteínas, tem apresentado bons resultados (HUSTED *et alii*, 1985b; ORTIN *et alii*, 1992).

O interessante do emprego de SAB na extração líquido-líquido reside na disponibilidade de equipamentos já desenvolvidos, cujo desempenho é, ao menos em parte, conhecido. No entanto, o projeto destes equipamentos tem por base estudos realizados em sistemas químicos tradicionais, enquanto as pesquisas voltadas aos sistemas de interesse atuais se concentram na escolha de solventes; na determinação do equilíbrio de fases e dos coeficientes de partição, evidenciando a necessidade do estudo operacional e de transferência de massa para esta operação unitária aplicada a bioseparações.

Operações contínuas na extração convencional com solventes estão bem fundamentadas. Estudos preliminares usando SAB em colunas já foram realizados. A tensão interfacial está em torno de 1 a 3 ordens de grandeza abaixo daquela encontrada em sistemas água-solvente orgânico. Assim, um dos problemas do emprego de SAB em equipamentos projetados para sistemas clássicos é a inundação. Outra dificuldade surge da diferença de viscosidade entre as fases, que é especialmente elevada para sistemas contendo biomassa (KULA, 1990). Apesar destes aspectos desfavoráveis, a aplicabilidade de SAB para a purificação contínua de proteínas já foi demonstrada por HUSTED *et alii* (1985b) e ORTIN *et alii* (1992) usando diferentes sistemas de extração.

Segundo KULA (1990) a purificação pode ser conduzida em operação contínua e modo contracorrente, usando os equipamentos da clássica extração líquido-líquido. Esta técnica reduz os custos fixos e variáveis, possibilita a automação do processo, a reciclagem contínua dos produtos químicos (GREVE & KULA, 1991b), diminui o tempo de processamento e minimiza o espaço físico ocupado, já que as unidades não são volumosas. ALBERTSSON (1986) descreveu a operação de uma unidade Craig, em modo contracorrente, empregando sistemas PEG-dextrana. KULA *et alii* (1982) pesquisaram a extração de formiato desidrogenase (FDH) com sistemas PEG-sal. HUSTED *et alii* (1988) analisaram o processo contínuo em uma coluna Kuhni, em um extrator Graesser, em uma coluna Podbielniak e em uma unidade misturadora-decantadora usando SAB.

Em operação semicontínua, SAWANT *et alii* (1990), PATIL *et alii* (1991) e JAFARADAB *et alii* (1992) avaliaram a fração volumétrica da fase dispersa, "hold up", e o coeficiente de transferência de massa para a albumina de soro bovino (ASB) e para a amiloglucosidade (AMG). Para a purificação da ASB foram empregadas as colunas "spray" e York-Scheibel operando com sistemas PEG-dextrana e PEG-fosfato de potássio, respectivamente. Para a separação da AMG foi utilizado o sistema PEG-sulfato de sódio nas colunas York-Scheibel e empacotada. Já PAPAMICHAEL *et alii* (1992) estudaram um esquema com um único estágio teórico para purificação de proteínas. De fato, o projeto destes processos, particularmente no caso de purificação de biomoléculas é insatisfatório e impreciso, recorrendo com frequência a algumas regras qualitativas e a procedimentos semi-empíricos, justificando portanto a necessidade de aprofundar esta linha de pesquisa.

O extrator Graesser, desenvolvido por COLEBY em 1962, visava inicialmente tratar sistemas de extração tradicionais com as particularidades de baixa tensão interfacial e pequena diferença de densidade entre as fases. Como já citado, estas são as mesmas

propriedades apresentadas pelos SAB. Assim, este tipo de equipamento é, à princípio, apropriado para o trabalho com SAB.

A purificação de proteínas usando SAB no extrator Graesser leva necessariamente à especificação de um sistema real para comprovação dos resultados. Um grupo de proteínas com requisitos para este tratamento é aquele composto pelas proteínas do soro de queijo. A produção mundial de soro foi estimada em torno de 90 milhões de toneladas/ano (LEBENTHAL, 1975) nos anos 70 e em torno de 145 milhões de toneladas/ano no início dos anos 90. Normalmente 60% do soro é utilizado para a produção de lactose e ração animal (GATT, 1991). O restante é geralmente manipulado como resíduo ou descartado sem tratamento, aumentando os riscos de contaminação ambiental devido ao alto teor da demanda bioquímica de oxigênio (40000-50000 p.p.m; PEREA *et alii*, 1993).

O conteúdo de proteínas do soro bovino é de 6-9 g/l, representando um grande potencial disponível. O soro, além de ser uma fonte de proteínas de baixo custo, tem também a vantagem de não necessitar de pré-tratamento para o seu processamento em larga escala. Uma forma de reutilizar as proteínas para o consumo humano é empregá-las em formulações de alimentos infantis. Entretanto, deve-se considerar que o uso direto do soro nos leites infantis, por exemplo, eleva o conteúdo de β-lactoglobulina (β -lg) quando comparado com o leite materno, que apresenta somente resíduos de β-lg. A β-lg é conhecida como o principal componente alergênico do leite bovino, tanto que um dos objetivos do processamento das proteínas do soro é a redução do conteúdo de β-lg, ao mesmo tempo em que são retidas as outras proteínas (MÄKINEN-KILJUNEN & SORVA, 1993).

Baseado no estudo dessa literatura, o soro de queijo foi escolhido como meio real para o estudo da separação de proteínas, usando os sistemas aquosos bifásicos, em um extrator Graesser.

OBJETIVOS

* Analisar a viabilidade do uso de sistemas aquosos bifásicos em um extrator líquido-líquido do tipo Graesser.

* Caracterizar o equipamento em termos hidrodinâmicos, determinando a distribuição de tempos de residência, coeficiente de mistura axial e "hold up".

* Estudar a transferência de massa e determinar o número de unidades de transferência para o equipamento com base no transporte de proteínas.

* Como aplicação para um caso real, separar as proteínas α-lactoalbumina e β-lactoglobulina do soro de queijo, visando a formulação de um alimento infantil, para pacientes com alergia ao leite bovino.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Sistemas Aquosos Bifásicos

Sistemas aquosos bifásicos formam-se a partir da adição de soluções aquosas de dois polímeros hidrófilos, como PEG e dextrana, ou de um polímero e um sal, como PEG e fosfato de potássio. Constituem um meio conveniente e adequado para a extração de substâncias de origem biológica pois a constituição das fases, entre 70% e 90% de água, proporciona um ambiente ameno para o trabalho com compostos biologicamente ativos, preservando sua estabilidade molecular e assim permitindo o seu processamento neste meio.

A separação espontânea, em fases distintas, decorrente da adição de soluções aquosas de dois polímeros foi inicialmente observada pelo microbiologista holandês Beijerinck, em 1896, ao misturar ágar com gelatina ou amido solúvel. A fase inferior foi enriquecida em ágar e a superior em gelatina (ou amido). Em 1956, ALBERTSSON, constatou que sistemas formados por polímeros solúveis e solventes orgânicos também possibilitavam a partição de materiais biológicos, ou seja, permitiam que uma terceira substância introduzida ao sistema fosse coletada, preferencialmente, em uma das fases por ajuste de parâmetros físico-químicos. Devido a esta particularidade os SAB são empregados no isolamento e purificação de biomoléculas de importância comercial, tais como, células, proteínas, vírus, fragmentos de membranas e organelas celulares. Enzimas como α-amilase, glucoamilase, α-glucosidade, catalase e pululanase foram purificadas através de SAB. Os SAB são usados também na caracterização de propriedades de partículas biológicas e na determinação das propriedades superficiais de biomoléculas, tais como carga e hidrofobicidade (ALBERTSSON, 1986; FRANCO *et alii*, 1993).

A variada faixa de aplicabilidade dos SAB tem motivado crescente atividade científica no sentido de estabelecer fundamentos para o trabalho com os referidos sistemas, bem como de identificar os mais adequados para a separação das diferentes biomoléculas (GUAN *et alii*, 1993).

Extração com SAB oferece inigualáveis vantagens para o processamento em larga escala. Algumas delas são o elevado rendimento, a faixa de trabalho próxima do equilíbrio, a fácil ampliação de escala ("scale up") e o processamento contínuo (KIM *et alii*, 1988). Com isto, o interesse na aplicação de SAB deixou de se restringir à biologia celular para concentrar-se na análise dos fundamentos da separação de fases e da partição de proteínas; na redução dos custos do processamento; no aumento da seletividade da extração (por exemplo, através da adição de ligantes); na pesquisa de novos componentes formadores da fase, especialmente para substituir a dextrana (um componente de elevado custo) e na operação em estágios múltiplos.

Assim, ao lado de trabalhos orientados para o campo tecnológico existe interesse na utilização da partição como meio de preparação de amostras para uso em técnicas analíticas. Para tanto são aplicados os diferentes tipos de SAB existentes.

1.1.1. Tipos de Sistemas Aquosos Bifásicos

Existe uma grande variedade de polímeros hidrófilos, naturais ou sintéticos, capazes de gerar a separação de fases ao se misturarem com um segundo polímero ou um soluto de baixo peso molecular, como um sal. Como exemplos de sistemas podem ser citados aqueles formados por PEG-dextrana, PEG-ficoll® (polissacarídeo), dextran-ficoll®, dextrana-metil celulose, dextrana-polivinil, PEG-fosfato de potássio, PEG-citrato de sódio. Entre estes, o mais estudado e empregado é aquele composto por PEG-dextrana. A escolha foi fortuita, mas aparentemente perfeita, posto que os coeficientes de

partição nestes sistemas são atrativos nas faixas normais de separação (KULA, 1990). Nos livros de MOLYNEAUX (1984) e ALBERTSSON (1986) encontra-se detalhado um número maior de SAB com os respectivos diagramas de equilíbrio.

Em princípio, todos os tipos de SAB podem ser empregados na separação de biomoléculas. No entanto, quando se considera o aumento de escala onde critérios como custo, quantidade de reagentes, tempo de separação das fases e reciclagem dos componentes não podem ser negligenciados, o número de sistemas capazes de conjugar os requisitos necessários é bastante reduzido. De acordo com estas limitações os sistemas usados no processamento em larga escala tem-se restrito àqueles constituídos por PEG-dextrana e PEG-sal, por se encontrarem disponíveis no mercado em grandes quantidades, serem atóxicos, passíveis de esterilização e apresentarem uma maior faixa de aplicação e de propriedades físicas adequadas, principalmente com relação à diferença de densidade e viscosidade. A adição de PEG e dextrana em alimentos é permitida em muitos países, enquadrando-os dentro da legislação para o trabalho com produtos alimentícios e farmacêuticos. O mesmo pode ser dito para alguns tipos de sais de citratos, fosfatos e sulfatos.

Para evitar alta pressão osmótica, dois polímeros incompatíveis são preferidos aos sistemas polímero-sal. Segundo KULA *et alii* (1982) e HUSTED *et alii* (1985a) a pressão osmótica não necessita ser considerada para a separação de proteínas em processos biotecnológicos, situação na qual os sistemas PEG-sal são normalmente preferidos. Também apresentam melhor seletividade e economia quando comparados com os sistemas PEG-dextrana. A separação das fases é atingida mais rapidamente devido à menor viscosidade de uma das fases. Isto facilita o uso de sistemas polímero-sal em aplicações industriais, onde a partição é conduzida em baixas concentrações de sais (KRONER *et alii*, 1984). Íons como fosfato, citrato e sulfato distribuem-se de maneira mais desigual do que íons monoatômicos, como cloretos, o que gera uma maior diferença de potencial entre as fases e consequentemente afeta positivamente o

coeficiente de distribuição do soluto. Ao contrário da dextrana, sais são fáceis de manusear e tem baixo custo.

1.1.1.1. Polietileno Glicol

O polietileno glicol, $HO\text{-}(CH_2CH_2)_n\text{-}CH_2CH_2OH$, é um poliéter sintético neutro, linear ou de cadeia ramificada, disponível em uma grande variedade de pesos moleculares, de poucas centenas a milhares de daltons. Solubiliza-se em água e em diferentes solventes orgânicos. É também conhecido pelos nomes comerciais de poliglicol E®, carbowax® e pluracol E®, dependendo da empresa que o fabrica. Para pesos moleculares acima de 20000 daltons são denominados óxidos de polietileno, PEO. São fornecidos na forma de soluções incolores estáveis ou pastas se possuem pesos moleculares menores que 1000. Os de pesos moleculares elevados, acima de 1000, são encontrados na forma de pó ou de flocos brancos. Podem ser estocados a temperatura ambiente, embora a 4^0C a ocorrência de oxidação em soluções seja retardada. A oxidação do PEG, detectada pela diminuição do pH devida à liberação de grupos ácidos(BAMBERGER *et alii*, 1985), altera a coloração da solução para marrom.

Sendo não antigênico nem imunogênico foi aprovado pelo FDA, "Food and Drug Administration". Sua utilização é de interesse na biotecnologia e biomedicina, principalmente por excluir, em ambiente aquoso, outros polímeros de sua vizinhança, não se solubilizando com eles. Está sujeito a modificações químicas rápidas controlando a solubilidade e aumentando o tamanho das moléculas às quais se liga. Não provoca a diminuição da atividade de células e proteínas, embora interaja com as membranas celulares propiciando a fusão de células, um processo chave na biotecnologia (HARRIS, 1992). Sendo biodegradável e atóxico, a descarga de PEG

não é problemática. Na operação em larga escala com sistemas PEG-sal as dificuldades de reciclagem concentram-se basicamente na fase salina.

1.1.1.2. Reciclagem de Sais e Polímeros

A possibilidade de reutilização dos constituintes das fases deve ser considerada ao se efetuar o "scale up" pois os custos dos componentes das fases aumentam linearmente com a escala de produção (KRONER *et alii*, 1984).

A reciclagem de PEG pode ser facilmente integrada ao processo, chegando a níveis de recuperação em torno de 90 a 95% (HUSTED *et alii*, 1988). As técnicas de recuperação de PEG mais usadas são a ultrafiltração e a extração com solvente orgânico seguida de evaporação. Pode ser diretamente reutilizado do final de uma etapa intermediária para a primeira etapa de um novo processo de extração (HUSTED *et alii*, 1985a), sendo esta alternativa a que parece ser economicamente viável (PAPAMICHAEL *et alii*, 1992).

O descarte de sais é geralmente mais problemático. Em sistemas contendo células, ácido nucléico, proteínas solúveis e insolúveis, a separação de sais da fase primária por técnicas de separação mecânica, tais como centrifugação ou ultrafiltração é muito difícil de ser conduzida eficientemente. A eletrodiálise é considerada um método geral para a reciclagem de sais e para a dessalinização da fase rica em PEG (HUSTED *et alii*, 1988). Sais podem ser recuperados usando uma mistura álcool alifático-sal-água (GREVE & KULA, 1991b). Especificamente, para a separação do fosfato de potássio, um resfriamento abaixo de 6^0C provoca a precipitação do sal, possibilitando a sua reutilização (PAPAMICHAEL *et alii*, 1992).

1.1.2. Aspectos Fundamentais sobre a Partição de Proteínas

Mudanças no enfoque de produção de proteínas por engenharia genética e o desenvolvimento da tecnologia de enzimas renovaram o interesse pelos processos de separação de proteínas e suas descrições quantitativas como uma base para o "scale up". Os fundamentos da partição de biomoléculas entre duas fases ainda não é bem compreendido, apesar do significativo progresso alcançado com a modelagem termodinâmica da distribuição de proteínas na interface dos SAB. Existem duas diferentes aproximações para a abordagem termodinâmica, a primeira utiliza um tratamento rigoroso para modelagem do equilíbrio (BASKIR *et alii*, 1989) e a outra métodos de contribuição de grupos (KANG & SANDLER, 1988).

A tendência de separação de fases apresentada por dois polímeros quando adicionados em um solvente comum, ocorre porque a baixa concentração molar dos polímeros na solução (tipicamente menor que 0,05 M) leva a um pequeno ganho de entropia durante a mistura. Por outro lado, cadeias poliméricas tem uma área superficial por molécula maior do que compostos de baixo peso molecular, tanto que as energias de interação entre os dois polímeros se sobrepõem à energia de Gibbs do sistema. Estes fatores levam à formação de duas fases em sistemas ternários polímero-polímero-água, em baixas concentrações dos polímeros.

A modelagem quantitativa da partição de proteínas em SAB representa um problema complexo pelo fato do comportamento do sistema depender de fatores muito diversos como tamanho da molécula, conformação, estrutura da superfície, interações de polímeros com as cadeias das proteínas e com diferentes sais, interações polímero-polímero, sal-proteína, proteína-proteína e, quando usados, as interações dos ligantes com os outros componentes presentes. Estudos empíricos com SAB mostraram que a distribuição da proteína é função de diversos fatores (BASKIR *et alii*, 1989), como:

* tipo dos polímeros que formam as fase: peso molecular médio, distribuição do peso molecular, modificações químicas poliméricas (SASAKAWA & WALTER, 1972; CORDES *et alii*, 1987);

* composição das fases: comprimento da linha de amarração, tipos de íons presentes ou adicionados ao sistema, força iônica (RYDEN & ALBERTSSON, 1971);

* biomolécula: tamanho, carga, propriedades superficiais, concentração (AXELSSON, 1978; ZASLAVASKY *et alii*, 1983; BAMBERGER *et alii*, 1984; ABBOTT *et alii*, 1992);

* pH e temperatura (LEHNINGER, 1982).

As condições adequadas para a partição deverão ser encontradas experimentalmente devido à interdependência dos fatores acima citados. Considerando que c_{liq1} e c_{liq2} sejam as concentrações da proteína nas fases 1 e 2, o coeficiente de distribuição das proteínas é definido por:

$$K = c_{liq2}/c_{liq1} \qquad (1.1)$$

ALBERTSSON (1986) propôs o mais simples modelo para cálculo de K, desmembrando-o em:

$$\ln K = \ln K_{el.} + \ln K_{hidrof.} + \ln K_{hifil.} + \ln K_{conf.} + \ln K_{lig.} \qquad (1.2)$$

onde os subíndices el., hidrof., hifil., conf. e lig. referem-se às contribuições eletrostáticas, hidrofóbicas, hidrofílicas, de conformação e de interações entre os ligantes. A presença de sais implicará na adição do termo $\ln K_{hid.}$, com hid. significando hidratação.

Entretanto modelos quantitativos para predição do comportamento do sistema em função do tipo de polímero, de biomolécula, da composição das fases, do pH e da temperatura não estão disponíveis. Adicionalmente, os mecanismos fundamentais que governam o comportamento dessas variáveis não foram ainda satisfatoriamente elucidados (BASKIR *et alii*, 1989). Uma vez mais é possível ressaltar a importância do desenvolvimento da termodinâmica da extração com SAB (KULA, 1990).

1.1.2.1. Teoria Termodinâmica

O banco de dados para SAB é pobre no que se refere a seleção e concentração de sais adicionados, pH, temperatura e peso molecular dos polímeros usados. Métodos analíticos modernos, como espalhamento de luz, permitem medir os coeficientes do Virial em sistemas binários com razoável precisão, aumentando o número de informações e facilitando o desenvolvimento dos fundamentos termodinâmicos para SAB (KULA, 1990). Qualitativamente a separação de fases e a distribuição de solutos podem ser preditas através de uma expressão do coeficiente de partição em função de parâmetros medidos experimentalmente. Para tanto, emprega-se normalmente a teoria de Flory-Huggins (FLORY, 1953), uma aproximação da mecânica estatística para descrição termodinâmica da separação de fases de polímeros em solventes orgânicos.

A elevada concentração de água em ambas as fases é uma complicação adicional ao estudo, já que esta molécula não se comporta como um solvente inerte, sendo capaz de interagir em múltiplas ligações covalentes, como também em pontes de hidrogênio em um único segmento dos polímeros hidrofílicos envolvidos. EDMOND & OGSTON (1968) obtiveram uma equação para o potencial químico da água na presença de polímeros, semelhante a uma expansão do Virial truncada no termo de segunda ordem. Dependendo do pH, a dissociação completa de sais e grupos ionizáveis presentes nas proteínas poderá ou não ocorrer. Como a totalidade dos íons não se distribuirá

uniformemente, será estabelecida uma certa diferença de potencial elétrico entre as fases. Assumindo que a partição de proteínas é fortemente dependente deste termo (ALBERTSSON, 1986), faz-se necessário considerar as interações de carga e distribuição desigual de íons na modelagem da separação de fases e do coeficiente de partição em sistemas contendo sais e grupos ionizáveis. Para tanto são integrados, por exemplo, o tratamento de Edmond & Ogston (para a separação de fases) e a abordagem de HILL (citado em FORCINITI & HALL, 1990; para proteínas em soluções aquosas) com teorias de soluções iônicas. Uma dentre estas teorias considera que as interações íon-íon e íon-molécula são devidas às forças iônicas de curto e de longo alcance entre os componentes (MACEDO *et alii*, 1990). É derivada da extensão de Fowler & Guggenheim (GUGGENHEIM, 1959) da teoria de DEBYE-HUECKEL (1923), fundamentada no excesso da energia livre de Gibbs, G^E.

Outros modelos desenvolvidos para representação da separação de fases e predição do coeficiente de partição em SAB PEG-sais são os de:

* GROßMAN & GAINER (1988), que correlacionaram o coeficiente de partição da proteína com o volume livre das fases.

* KANG & SANDLER (1988,), que usaram o programa UNIQUAC para construir diagramas de equilíbrio com razoável precisão.

* KING *et alii* (1988), que assumiram uma forma geral para o coeficiente de partição de proteínas e para o potencial químico dos componentes, partindo de uma extensão da teoria de soluções de Edmond & Ogston.

* HAYNES *et alii* (1989) e CABEZAS *et alli* (1990), que consideraram interações iônicas nos modelos, mas cuja base teórica necessita ser refinada.

* KIM (citado em BASKIR *et alii*, 1989), que, na estimativa do coeficiente de partição, desconsiderou a influência das interações polímero-sal na fase salina. Já na fase polimérica, as interações polímero-sal foram consideradas significativas.

* EITEMAN & GAINER (1992), que correlacionaram o coeficiente de partição com a hidrofobicidade dos aminoácidos individuais que constituem a molécula, para peptídeos em sistemas PEG-$MgSO_4$.

* GROßMANN *et alii* (1993), que propuseram, para espécies iônicas em sistemas PEG-dextrana, a extensão de uma correlação entre a composição das fases e o coeficiente de partição de aminoácidos e peptídeos.

Esta pequena listagem mostra que os métodos termodinâmicos usados na extração por solvente convencional podem ser extrapolados para os processos de extração de proteínas com SAB sem a necessidade de um tratamento termodinâmico rigoroso.

1.2. Soro de Queijo

Na prática industrial, o soro é um subproduto oriundo tanto da manufatura da caseína quanto de queijos. Contém em torno de 50% dos sólidos e representa cerca de 85% do volume inicial do leite (KOSIKOWSKI, 1977). Se descartado em solos ou leitos de rios é causa de poluição ambiental devido ao alto teor da demanda bioquímica de oxigênio (40000-50000 p.p.m; PEREA *et alii*, 1993).

A composição natural do soro, rica em lactose (4,0-4,5% p/v), proteínas (0,8-0,9% p/v) e com pequenas quantidades de ácidos orgânicos, lipídeos e sais possibilita o aproveitamento comercial de seus nutrientes. Seja de forma direta, como na alimentação animal (GUIRGUIS *et alii*, 1993), ou indiretamente, após a ultrafiltração

para a produção de lactose, concentrados protéicos (MORR & HA, 1993; PEREA *et alii*, 1993) e de compostos orgânicos por via fermentativa, como etanol (TIN & MAWSON, 1993) e ácido lático (AMRANE & PRIGENT, 1993).

O elevado conteúdo de proteínas presentes no soro levou ao desenvolvimento de formulações de alimentos para o consumo humano visando regular a relação proteínas/caseína do leite materno, para alimentação de crianças prematuras (DARLING *et alii*, 1993). Como apresentado na Tabela 1.1, o elevado conteúdo de β-lactoglobulina no soro bovino quando comparado com o seu teor no leite materno inviabiliza a adição direta do soro "in natura" no alimento infantil, pois a β-lg é considerada o principal componente alergênico do leite bovino (LEBENTHAL, 1975; MÄKINEN-KILJUNEN & PALOSUO, 1992). Portanto, no processamento das proteínas do soro para nutrição infantil é importante reduzir o conteúdo de β-lg mantendo constante a concentração das outras proteínas. KANEKO *et alii* (1985) alertaram para a necessidade da retenção das propriedades imunológicas do soro nas formulações de alimentos infantis. Este objetivo é atingido mantendo no produto duas outras proteínas do soro, a lactoferrina e a imunoglobulina.

Tabela 1.1 Comparação entre a constituição do leite humano e bovino, segundo DAVIES & LAW (1980)

Proteínas	Leite humano (g/l)	Leite bovino (g/l)
fração de caseína	3,6	26
β-lactoglobulina	traços	3-7
α-lactoalbumina	2,8	1,2
albumina	0,6	0,4
lisozima	0,4	traços
lactoferrina	2	0,1
imunoglobulinas	1	0,7

1.2.1. Proteínas do Soro de Queijo

Proteínas de soro de queijo são definidas como aquelas que permanecem retidas no soro do leite depois da coagulação da caseína, a 20^{0}C e pH 4,6. As duas proteínas em maior quantidade no soro, são a β-lactoglobulina e a α-lactoalbumina, globulares, de alto valor funcional e nutricional, que apresentam uma elevada disponibilidade de aminoácidos essenciais (MULVIHILL & KINSELLA, 1987; GUIRGUIS *et alii*, 1993). São bons agentes espumantes e emulsificantes. A β-lg é um excelente agente de gelatinização. Podem ser mecanicamente ou termicamente desnaturadas, permitindo o controle da viscosidade em alimentos. Em estado nativo, são solúveis em água em uma grande faixa de pH. Em suma, são ingredientes alimentícios potenciais com capacidade para substituir outros mais caros, como por exemplo proteínas do ovo (PEARCE & MARSHALL, 1991). Na Tabela 1.2. estão representadas as principais propriedades físico-químicas da α-la e β-lg.

A α-la representa cerca de 20% do total de proteínas do soro. É susceptível ao tratamento térmico, desnaturando-se em pH 6,7; 65^{0}C, com 80 a 90% de reversibilidade sob resfriamento (MORR & HA, 1993). Estruturalmente assemelha-se à lisozima do ovo. É um componente auxiliar na quebra ou união de ligações glicosídeas α(1-4), mesmo quando não se encontra no centro da lactose sintetase (CHEFTEL *et alii*, 1985). É rica em triptofano, cerca de 7%. Mudanças na hidrofobicidade superficial de α-la foram estudadas por EYNARD *et alii* (1992) e a desnaturação por OWUSU (1992).

A β-lg é a proteína do soro mais abundante, representando aproximadamente 50% do total de proteínas. É sensível à temperatura e ao pH, desnaturando, reversivelmente, em temperaturas abaixo de 65^{0}C, com extensa mudança conformacional. GRIKO & PRIVALOV (1992) relataram o aumento da estabilidade da β-lg com maiores

concentração de íons fosfatos nas soluções. A β-lg existe como um dímero entre pH 5,2-7,5. Entre pH 3,5 e 5,2, polimeriza-se como um octômero. Abaixo de pH 3,5 ou acima de pH 7,5 dissocia-se nos monômeros correspondentes (MORR & HA, 1993). Uma propriedade físico-química importante é a capacidade de ligação "in vitro" a algumas substâncias hidrofóbicas, como ácidos graxos e retinol. PEREZ *et alii* (1992) estudaram o efeito da β-lg sobre a atividade lipolítica da lipase pré-gástrica na procura da elucidação do papel biológico desta proteína. Assemelha-se ao retinol, que transporta álcoois de vitamina A (GU & BRADY, 1992).

Tabela 1.2. Propriedades físico-químicas da α-lactoalbumina e β-lactoglobulina [a]

	α-Lactoalbumina	β-Lactoglobulina
Peso molecular, daltons	14000	18000, monômero 36000, dímero
Ponto isoelétrico	4,2-4,5	5,2
Hidrofobicidade média, kcal/resíduo	1020	1075
Total de aminoácidos/mol	123	162
Resíduos apolares/mol	44	54
Resíduos de cisteína/mol	8	5
Resíduos de disulfito/mol	4	2
Resíduos sulfidrila/mol	-----	1
Resíduos de lisina/mol	12	15
Resíduos de ácido glutâmico /mol	8	16
Resíduos de ácido aspárgico /mol	9	10

[a] segundo EIGEL *et alii* (1984)

1.2.2. Métodos de Purificação da α-Lactoalbumina e β-Lactoglobulina

Diferentes procedimentos para isolar as proteínas do soro tem sido descritos. O objetivo é normalmente separar β-lg da α-la, presentes em maior quantidade, mas já existem trabalhos relacionados com a separação de lactoferrina do soro (SHIGERU & YE-XIUYUM, 1991).

Os métodos propostos para a separação de β-lg são a precipitação com $FeCl_3$ (KANEKO *et alii*, 1985), precipitação com polifosfatos (AL-MASHIKI & NAKAI, 1987), cromatografia de troca iônica (SKUDDER, 1985), cromatografia de troca de subunidade (CHIANCONE & GATTONI, 1991), ultrafiltração e eletrodiálise (MEHRA & DONNELLY, 1993), filtração por gel (YOSHIDA, 1990), "salting out" com NaCl (MAILLART & RIBADEAU-DUMAS, 1988) e métodos térmicos (PEARCE, 1983). Recentemente foi descrita a utilização de um sistema aquoso bifásico, composto de PEG-fosfato de potássio, para a separação de α-la da β-lg (CHEN, 1992). A β-lg se distribuiu predominantemente na fase rica em sal e a α-la na fase rica em PEG. Como o soro contém quantidades consideráveis de sais, alguns métodos de separação não podem ser diretamente aplicados. Os SAB são tolerantes a sais e portanto se adequam bem ao tratamento do soro de queijo. O sistema mais difundido para a separação de proteínas é o PEG-dextrana, mas o alto custo da dextrana tem limitado o uso desses sistemas para o isolamento em larga escala (ORTIN *et alii*, 1992).

1.3. Extração Líquido-Líquido

Na obtenção de produtos de origem biotecnológica para as indústrias farmacêutica, médica, de alimentos e de química fina, a maior parte dos custos se concentra no

acabamento do composto. Procurando minimizá-los buscam-se métodos pouco dispendiosos e que reduzam os passos de purificação.

Segundo RICHARDSON (1993), existem cinco temas aos quais deve ser dada maior atenção nos estudos advindos das interações entre os processos de separação e a biotecnologia. São eles: membranas sintéticas, adsorção seletiva, separações de alta seletividade (por afinidade, por exemplo), uso de campos de força intensificados (centrífugo, magnético e ultra-sônico) e a extração líquido-líquido, com ênfase nas subáreas de extração com fluídos supercríticos e de sistemas aquosos bifásicos.

Este item será dedicado a um breve tratamento da extração líquido-líquido. É uma operação adequada para a separação e purificação de componentes nucleares, metálicos e eletrônicos de alta pureza. Com o despontar das indústrias de biotecnologia e química fina gerou-se uma demanda por processos de extração com sistemas não convencionais devido às rigorosas exigências do mercado no tocante à pureza e qualidade dos produtos, muitos deles de elevado valor comercial. Por exemplo, são estudados novos agentes extrativos e equipamentos com curto tempo de residência (THORNTON, 1992), visando minimizar a degradação de compostos biológicos, como aqueles presentes em meios fermentados. Ao contrário dos métodos clássicos de precipitação, a extração líquido-líquido apresenta vantagens, como baixa perda de atividade do componente, baixo custo de material, boa reprodutibilidade e fácil "scale up", além de ser altamente específica na separação. Assim, a extração com SAB desponta como um método de recuperação extremamente atrativo para o manuseio de compostos lábeis.

1.3.1. Princípios Básicos

A extração envolve o uso de sistemas bifásicos compostos por no mínimo três substâncias. Os dois enfoques importantes no estudo do equilíbrio entre os líquidos são

a regra das fases e as leis de distribuição, que procuram sistematizar as relações existentes entre as concentrações dos componentes nas diferentes fases do sistema em equilíbrio. Mas não existe uma regra que descreva satisfatoriamente todas as soluções. O efeito de pequenas variações de pressão, sobre o equilíbrio é insignificante, restringindo a discussão à influência da temperatura e da concentração.
Para o desenvolvimento de equipamentos de extração líquido-líquido são alvo de considerações fatores como (STEINER, 1988):

* o sistema de trabalho: solvente a ser usado, grau de pureza do refinado, acabamento do extrato e condições de escoamento dos líquidos, entre outros. Métodos preditivos foram propostos para a determinação da seletividade do solvente (MENIAI & NEWSHAM, 1992) e seleção de uma molécula extrativa ótima usando UNIFAC (NASER & FOURNIER, 1991);

* dados de equilíbrio: são imprescindíveis, deverão estar disponíveis na temperatura de trabalho;

* dados de transferência de massa: também empregados para cálculos das propriedades físicas das fases;

A seleção, especificação ou projeto de extratores, a partir, unicamente, de princípios básicos é inadequada, pois muitas vezes o comportamento do sistema é de difícil predição. São necessários estudos em planta piloto, cujos aspectos de comportamento mais problemáticos são (CUSACK & KARR, 1991):

* mistura axial, que é indesejável. Tanto a mistura retroativa da fase contínua quanto dispersa dentro do extrator reduzem os gradientes de concentração e com isso a eficiência da mistura;

* mudanças nas propriedades físicas, que podem variar ao longo do equipamento, a medida em que se processa a extração. Gradientes de densidade, por exemplo, provocarão significativa circulação dentro de uma das fases, manifestando-se na forma de mistura axial e diminuindo a eficiência do equipamento;

* alterações das taxas de escoamento, que ocorrem quando grandes concentrações de soluto estão envolvidas;

* coalescência, que reduz a área interfacial disponível e, portanto, a taxa de transferência de massa. Aumenta a margem de incerteza quanto ao "scale up" do equipamento;

* turbulência na gota e efeitos interfaciais, que além de afetarem a coalescência provocam mistura na interface e dentro das gotas durante a transferência de soluto;

* insuficiente molhabilidade, que diminui a taxa de coalescência no caso da fase dispersa não entrar em contato com as partes internas do equipamento;

* emulsificação, que é uma tendência apresentada por alguns sistemas. Normalmente, a presença de sólidos leva à formação de emulsões estáveis ou aumenta o grau de emulsificação no sistema;

* contaminantes do sistema, que alteram as taxas de transferência de massa. Em aplicações industriais típicas a corrente da alimentação e muitas vezes a do solvente são contaminados por componentes de superfície ativos, como material de construção do extrator ou do tanque de armazenagem;

Na maior parte dos casos, para colunas agitadas, o "scale up" é feito a partir da altura equivalente a um estágio teórico e da eficiência volumétrica. À máxima eficiência

volumétrica corresponde a condição de operação ótima. Para o RDC, o extrator Scheibel e a coluna Karr, verificou-se que em equipamentos de pequeno diâmetro a altura equivalente diminui com o aumento da agitação, até o ponto onde ocorre a inundação. Para equipamentos industriais a mistura axial inevitável faz com que a inundação ocorra a velocidades de agitação menores do que aquelas determinadas em plantas piloto. A quantidade e tipo de dados obtidos em uma planta piloto dependem do tipo de extrator estudado.

1.3.2. Tipos de Extratores

Em geral, a disponibilidade de correlações, para eficiência e capacidade, dispensará estudos em plantas piloto para o dimensionamento de equipamentos. Para sistemas líquido-líquido estas relações não estão bem estabelecidas, além do que uma pequena variação da temperatura pode alterar significativamente a solubilidade e, consequentemente, as composições das fases. Assim, sistemas líquido-líquido raramente podem ser tratados sem a realização de experimentos em escala piloto.

Extratores líquido-líquido podem ser classificados de diversas formas, uma delas é através das características construtivas e operacionais, que subdivide os equipamentos em dois grandes grupos:

* em estágios, que trata de unidades com um número discreto de estágios. Em cada etapa as duas fases entram em contato até que seja atingido o equilíbrio (por exemplo, em um misturador), depois do qual são separadas (por exemplo, em um decantador) e conduzidas em contracorrente para uma nova etapa de mistura e decantação. Apesar do projeto e do "scale up" serem relativamente simples, e da eficiência por estágio razoavelmente alta, a unidade de extração é volumosa, especialmente nos sistemas com decantação lenta;

* diferenciais, que levam a mudanças contínuas da composição das fases ao longo do extrator. São de tamanhos mais compactos pois apresentam, na maioria dos casos, a forma de torres. O projeto e "scale up" destas unidades apresentam grau de dificuldade elevado.

Uma classificação geral dos tipos de extratores líquido-líquido industriais é apresentada na Tabela 1.3. Foi adotada uma subdivisão com base no modo de dispersão das fases. De acordo com THORNTON (1992) existem outros tipos de extratores descritos na literatura, mas que, aparentemente, ainda não foram usados industrialmente.

Tabela 1.3. Tipos de extratores líquido-líquido usados industrialmente

	Em estágios	Diferenciais
Por ação da gravidade, sem entrada de energia externa	colunas de pratos, de pratos perfurados	"spray", de recheio, empacotadas
Agitação por pulsos	misturador-separador pulsante, de pratos perfurados pulsantes	recheada pulsante
Agitação mecânica	extrator Scheibel, Treybal, ARD[a], RDC[b], Karr	Oldshue-Rushton, Mixico Lightnin, Kuhni, Morris, Graesser
Centrífugas	Robatel, Luwesta	Podbielniak, Westfalia, de Laval

[a] ARD, "Asymetric Rotating Disc Contactor", [b] RDC, "Rotating Disc Contactor"

O extrator "Graesser Raining Bucket" (RTL) ou simplesmente extrator Graesser, é uma unidade com potencial tecnológico para tratar sistemas de fases com baixa tensão interfacial, pequena diferença de densidade e alta tendência de emulsificação devido às particularidades de suas características construtivas. Deve-se ressaltar que estas são as propriedades apresentadas pelos SAB.

1.3.2.1. Extrator Graesser

Foi patenteado em 1962 (COLEBY) e desde então tem sido aplicado industrialmente na purificação de herbicidas e na desodorização de naftas, podendo também ser utilizado no processamento de fases contendo sólidos, como no tratamento de areias de mancais com querosene (COLEBY, 1983).

Neste equipamento as duas fases são introduzidas, em contracorrente, nas extremidades do extrator, que ao contrário da maioria dos extratores convencionais é operado horizontalmente. A mistura das fases se dá devido ao movimento de uma série de cestos, cilíndricos e parcialmente abertos, presos em placas circulares. As placas estão presas, coaxialmente, em um eixo horizontal ligado a um rotor de velocidade variável. A particular construção do extrator Graesser leva a determinadas características hidrodinâmicas que o tornam especialmente adequado para o trabalho com SAB:

* a suavidade da mistura evita a emulsificação, pois o tamanho médio da gota é mantido relativamente grande quando comparado com outros extratores operados continuamente;

* as velocidades de ascensão e queda das gotas são altas, de modo que uma quase interface renovada é atingida, levando a boas taxas de transferência de massa;

* a posição do nível da interface no centro equatorial do extrator, mantendo o escoamento individual das fases, auxilia o uso de sistemas com pequena diferença de densidade;

* a compartimentação do vaso reduz a mistura axial, um problema em extratores operados continuamente.

Apesar da baixa intensidade da mistura são atingidas boas taxas de transferência de massa adequando o extrator Graesser para a purificação contínua de produtos sensíveis, como proteínas. Este comportamento foi observado por HUSTED *et alii* (1980) em testes preliminares com um extrator Graesser (100 cm comprimento x 10 cm de diâmetro interno) usando SAB. Anteriormente, SHEIKH *et alii* (1972) e WANG *et alii* (1977), estudaram a mistura axial, a mistura retroativa e a transferência de massa em um extrator menor (75 cm comprimento x 15 cm de diâmetro interno) usando o sistema de extração convencional água-n-butilamina-querosene. Já SHEN *et alii* (1989) estudaram a mistura axial e as características de transferência de massa com o sistema água-ácido acético-n-butanol em um extrator com o mesmo comprimento mas com redução do diâmetro interno (10,5 cm). AL-HEMIRI & KAREEM (1990) determinaram a distribuição de tamanhos de gota no extrator Graesser empregando diferentes sistemas água-solvente orgânico. Por técnicas fotográficas foi observada a diminuição do tamanho médio da gota, ao longo do eixo horizontal, até ser atingido um tamanho de gota estacionário, na extremidade final do extrator. No entanto, pesquisas relacionadas com as características hidrodinâmicas do extrator não foram desenvolvidas tão intensivamente quanto para com outros sistemas de extração (COIMBRA *et alii*, 1994).

1.3.3. Extração Líquido-Líquido Aplicada aos Sistemas Aquosos Bifásicos

Uma análise econômica detalhada da purificação extrativa de biomoléculas, para fins comparativos, entre diferentes processos, não foi encontrada na literatura. Mas, em uma primeira aproximação, KRONER *et alii* (1982) calcularam os custos operacionais para três técnicas de purificação de formiato desidrogenase (FDH-"Formate Dehydrogenase") obtido de *Candida Boidini*. O resultado pode ser visto na Tabela 1.4.

Tabela 1.4. Comparação de custos entre três diferentes processos de produção de FDH, segundo KRONER *et alii* (1982)

Método	Total de Células	Número de unidades iniciais	Pureza ($U.mg^{-1}$)	Rendimento (%)	Tempo total (horas)	Fator de desempenho (U/kg.h)	Índice de custo (DM/unidade)
Separação 1[a]	50	$211x10^3$	2,1	71	13	230	$13x10^{-3}$
Separação 2[b]	50	$460x10^3$	2,2	70	18	356	$7x10^{-3}$
Mistura[c]	30	$450x10^3$	1,3	49	61	120	$18x10^{-3}$
Padrão[d]	5	$31x10^3$	2,2	51	121	26	$374x10^{-3}$

[a,b] biomassa, quebra das células, desnaturação térmica, primeiro SAB PEG-fosfato de potássio, segundo SAB PEG-fosfato de potássio, terceiro SAB PEG-fosfato de potássio, quarto SAB PEG-fosfato de potássio

[c] biomassa, quebra das células, desnaturação térmica, primeiro SAB PEG-dextrana, segundo SAB PEG-fosfato de potássio, ultrafiltração, DE-celulose

[d] biomassa, quebra das células, centrifugação em batelada, precipitação com streptomicina, centrifugação em batelada, DE-celulose

Como se observa as despesas advindas da aquisição de sais e polímeros, necessários para formação das fases, nos dois primeiros métodos são compensadas pelo alto rendimento e o curto tempo destes processamentos.

Operações contínuas na convencional extração por solvente estão bem fundamentadas. No entanto, para SAB, somente estudos preliminares em colunas semicontínuas e contínuas foram realizados. A tensão interfacial para SAB é de 1 a 3 ordens de grandeza abaixo daquelas encontradas em sistemas água-solvente orgânico. Portanto, o problema da inundação deve ser contornado para se empregar SAB em equipamentos projetados para sistemas clássicos. A inundação é atingida mais rapidamente com SAB. Outra dificuldade surge da diferença de viscosidade entre as fases, que é especialmente elevada para sistemas contendo biomassa (KULA, 1990).

A extração líquido-líquido com SAB, em modo contínuo, foi testada por ALBERTSSON (1960, 1986), em uma unidade Craig. Por HUSTED *et alii* (1980), em uma coluna Kuhni, um extrator Graesser, um extrator Podbielniak e em uma unidade misturadora-decantadora. Já SAWANT *et alii* (1990), PATIL *et alii* (1991) e JAFARADAB *et alii* (1992) avaliaram a fração volumétrica da fase dispersa, "hold up", e o coeficiente de transferência de massa para colunas "spray", York-Scheibal e empacotada, operadas em modo semicontínuo. PAPAMICHAEL *et alii* (1992) utilizaram um esquema com um estágio teórico na purificação de proteínas. SAB formam assim uma base conveniente para o processamento de proteínas tanto em modo contínuo quanto em contracorrente.

1.4. Hidrodinâmica e Transferência de Massa em Extratores

O conhecimento do comportamento hidrodinâmico do extrator e das características termodinâmicas e físicas do sistema empregado são condições necessárias para a

correta utilização da unidade, possibilitando predizer a capacidade da coluna e as taxas de transferência de massa associadas.

Tendo em mente, o vasto campo de estudo relacionado com o desempenho de extratores, neste item serão discutidos a transferência de massa e parâmetros hidrodinâmicos importantes como distribuição de tempos de residência e "hold up". O desempenho do equipamento é o somatório de fatores, tais como tipo de coluna, especificações, detalhes da geometria, material de construção, grau de molhabilidade dos líquidos, altura e diâmetro do extrator, efeitos de entrada e saída, ocorrência de mistura axial, propriedades físicas das fases, direção da extração, relação de vazão entre os líquidos, concentração do soluto, natureza do líquido disperso.

1.4.1. Distribuição de Tempos de Residência

O conceito de distribuição de tempos de residência tem aplicações variadas e amplas na área de operações unitárias. Inicialmente restringia-se ao campo de projeto de reatores. Com o desenvolvimento do estudo dos processos, diretamente de experimentos, e com a sua utilização, em nível industrial, a análise de tempo de residência e do grau de mistura tornaram-se uma parte inerente ao trabalho prático, aumentando a efetividade em plantas piloto.

Tempo de residência é aquele durante o qual um elemento do fluído permanece dentro de um equipamento, que difere do tempo necessário para se processar um volume do reator em condições específicas, chamado tempo espacial. Os dois conceitos coincidirão somente quando a densidade dos meios permanecer constante (LIN *et alii*, 1980). A diversidade de tempos de residência com que partículas de fluidos, a uma taxa constante, escoam através de equipamentos é caracterizada pela função distribuição de tempos de residência (DTR). A importância da DTR é mostrar a

dependência do desempenho do processo com o de tempo de residência (BUFFHAM & MASON, 1993). Aplica-se ao estudo da vazão em termos macroscópicos, da dinâmica de processos e ao cálculo de parâmetros hidrodinâmicos (STEINER, 1988).

Informações necessárias sobre o comportamento das fases são obtidas através do estudo de respostas de estímulos fornecidos ao sistema por métodos estacionários e não estacionários. Nos primeiros, uma perturbação é dada na saída do sistema e o perfil de concentração é medido entre o ponto de injeção e a entrada do sistema. Apesar de pouco difundidos, apresentam vantagens por serem de fácil execução, levar à um tratamento matemático simples e à obtenção de resultados exatos com relação aos parâmetros de mistura (grau de turbulência, coeficiente de difusão, número de Peclet). Em contrapartida, consomem alta quantidade de indicador, necessitam de amostragens em diferentes pontos, resultam em valores estimados de tempo de residência médio, do "hold up", da velocidade da corrente e estão limitado ao modelo da difusão.

Em contrapartida, na técnica em estado não estacionário, um sinal qualquer é dado na entrada do sistema e a resposta é registrada na saída. Isto possibilita avaliar o grau de mistura, o tempo de residência médio, a velocidade média da corrente, o "hold up" e as distorções no escoamento, como volume morto e "bypass". Os sinais são fornecidos na forma de perturbações, marcadores ou traçadores e de dispositivos de dosagem. As reações do sistema ao sinal são proporcionais à uma grandeza física representativa da concentração ou intensidade da perturbação. Os sinais são introduzidos através de métodos classificados como de experimentos passivo e de experimentos ativos, onde o estímulo dado na entrada do sistema e o tempo de propagação são analisados na saída. Os estímulos subdividem-se em de sinais periódicos, na forma de funções periódicas, como as senoidais, e, de sinais aperiódicos, entre os quais encontram-se os pulsos Dirac e degrau.

Os pulsos Dirac e de degrau são os mais utilizados, apesar da solução da função resposta necessitar de simplificações fundamentadas nas condições experimentais. Para perturbações com indicadores na forma de pulsos Dirac, uma pequena quantidade de traçador altamente concentrada é introduzida no sistema em um curto intervalo de tempo, para evitar alargamento na resposta. Recomenda-se o uso de degrau somente em escala de laboratório, devido à elevada quantidade de indicador necessária para o experimento.

O traçador é uma substância inerte, cuja quantidade deve ser tal que não interfira no escoamento. Seu uso é adequado, principalmente, na análise hidrodinâmica de equipamentos, pois favorece a determinação do tempo de residência médio, "hold up", velocidade média das correntes, grau de mistura e eventualmente dos distúrbios no escoamento. Deve ser solúvel em somente uma das fases e deve se dividir igualmente por toda a seção ocupada pela fase. É recomendável que não exceda 2% da corrente principal para evitar a ocorrência de perturbações. Os corantes são os marcadores mais usados em estudos hidrodinâmicos em sistemas modelo e plantas piloto. Corantes e soluções eletrolíticas são detectados por técnicas colorimétricas (como absorção) e condutividade elétrica, respectivamente.

1.4.1.1. Modelos de Tempo de Residência em Extratores

Como a separação, nos equipamentos de contato contínuo, depende do comportamento do escoamento das fases, as relações entre tempo de residência e grau de mistura são importantes no projeto dessas unidades. As correlações existentes para cálculo do grau de mistura, frequentemente, não podem ser extrapoladas para o dimensionamento de uma unidade industrial, apesar do número razoável de reatores industriais que apresentam um padrão de escoamento próximo ao da idealidade. Assim, é sensato conhecer no mínimo o tempo de permanência das moléculas individuais dentro da

unidade, ou, mais precisamente, a DTR do fluído que escoa. Esta informação pode ser obtida por técnicas experimentais e através dos modelos teóricos para a DTR (LEVENSPIEL, 1992).

DANCKWERTS (1953) e LEVENSPIEL & SMITH (1957) analisaram a DTR em equipamentos contínuos e propuseram, para a caracterização e quantificação do grau de mistura entre as fases, os modelos da difusão e de tanques em série, cujos parâmetros são o número de Peclet e o número de tanques, respectivamente.

Modelos de tempo de residência individuais e multiparamétricos são normalmente empregados para a descrição fenomenológica do escoamento. Caso um processo seja representado por uma equação diferencial linear, o seu modelo matemático será dado pela adição dos modelos de tempo de residência com o linear da cinética do processo. Os modelos mais conhecidos e usados são o da difusão e o de tanques em série uniparamétricos. Sob considerações especiais, para as equações de balanço de massa, ambos descrevem a operação como um macroprocesso. No modelo da difusão, o escoamento é descrito como uma sobreposição das misturas axial, radial e retroativa ao fluxo tipo pistão. O parâmetro é o coeficiente de dispersão axial. No modelo de tanques em série, assume-se que os líquidos escoam através de uma série de tanques agitados com igual tamanho. O parâmetro é o número de tanques (LEVENSPIEL, 1992).

A não idealidade é considerada, nos modelos uniparamétricos, uma consequência de flutuações nas velocidades lineares locais, que se superpõem à velocidade média do fluxo. A descrição destas flutuações obedece a uma lei, análoga à lei de difusão de Fick, onde o coeficiente de difusão molecular foi substituído pelo coeficiente de dispersão, na equação diferencial parcial. Os modelos uniparamétricos adequam-se, então, ao tratamento dos escoamentos cocorrente e contracorrente, com ocorrência de anomalias decorrentes da configuração do equipamento, como "bypass" e eventual

UNICAMP BIBLIOTECA CENTRAL

consideração de volume morto. Tem-se, adicionalmente, para sistemas em contracorrente, o modelo de dois parâmetros de tanques em série. Caso o comportamento do fluxo não se ajuste aos modelos individuais dispõe-se dos multiparamétricos combinados, com considerações de fluxo real (LEVENSPIEL, 1992; AUFDERHEIDE & VOGELPOHL, 1986).

1.4.2. Dispersão Axial

A necessidade da consideração da mistura longitudinal ("axial mixing"), radial ou lateral ("radial mixing"), retroativa das fases dispersa ("back mixing") e contínua ("back flow") em colunas de extração líquido-líquido foi evidenciada a partir de discussões sobre a influência dos efeitos finais nos perfis de concentração em colunas "spray", (GEANKOPLIS & HIXON, 1950). Os tipos de mistura acima citados originam-se na circulação vertical ou horizontal dos líquidos no sentido oposto àquele que seria o natural do fluxo e na circulação radial ou lateral dos líquidos, perpendicular ao sentido do escoamento. Reduzem os gradientes de concentração e portanto as taxas de transferência de massa. São percebidas pela presença de saltos de concentração resultantes de fatores como tipo de extrator e condições de escoamento dos líquidos. São causadas principalmente pela (SLEICHER, 1959):

* difusão molecular e turbulência ao longo do extrator, provocadas por correntes de circulação verticais, mistura dos turbilhões das gotas, arraste das gotas na fase contínua ou ação forçada do "back mixing", oriunda da turbulência no extrator e dos efeitos de pulsação;

* difusão de Taylor, causada pela mistura radial devido à existência de um perfil de velocidades não uniforme.

Embora os efeitos de difusão molecular e de turbulência sejam preponderantes na fase dispersa, uma contribuição adicional para a dispersão axial é devida à DTR das gotas, resultante dos vários tamanhos de gotas e da distribuição das velocidades de ascensão das gotas. Outra contribuição deve-se à existência de caminhos preferenciais, ausentes em aparelhos bem projetados e construídos.

Decorre, então, que a dispersão axial no sistema é o somatório, ao longo do extrator, das misturas radial e longitudinal. O coeficiente de dispersão devido à mistura retroativa das fases contínua e dispersa deveria ser calculado separadamente e apresentado como um termo à parte, ou seja, como o coeficiente de mistura retroativa. Entretanto, o usual é concentrar todas as não idealidades do sistema em um único termo, o coeficiente de dispersão axial. INGHAM (1971) apresenta correlações e técnicas experimentais para obtenção do coeficiente de dispersão axial em colunas "spray", empacotadas, empacotadas pulsadas, de pratos vibratórios, de pratos perfurados pulsados, discos rotativos e Oldshue-Rushton, onde a maior parte das pesquisas tem-se limitado ao estudo da dispersão axial empregando a água como única fase ou como um dos líquidos no fluxo bifásico. Consequentemente, dispõe-se de escassa literatura sobre os efeitos de mudanças nas propriedades físicas de fluídos.

A dispersão longitudinal em torres pode ser avaliada por diferentes métodos, sendo recomendado aquele que compara os perfis de concentração do soluto obtidos por predição e determinados experimentalmente em estado estacionário (MIYAUCHI & VERMEULEN, 1963; PROCHÁZKA & LANDAU, 1963). Visando contornar dificuldades experimentais provenientes de medidas da concentração do soluto, métodos alternativos e indiretos, usando injeção de traçadores são frequentemente empregados.

Diferentes modelos, à semelhança da DTR, são usados para caracterização do escoamento não ideal em equipamentos. Dentre eles tem-se os modelos da difusão, de

estágios, retroativo ou "back flow" e combinados (MISEK & ROD, 1971). Os mais estudados são o da difusão, ou de fluxo ideal tipo pistão, com dispersão, onde é assumida a sobreposição da difusão retroativa de soluto ao escoamento tipo pistão. E o modelo "back flow", com estágios não ideais mas completamente misturados, nos quais ocorre o fluxo retroativo. O primeiro implica na inexistência de bolsas estagnantes, de "bypass" ou de curto-circuito do fluído dentro da unidade. A sua principal vantagem é permitir o cálculo analítico dos perfis de concentração (HARTLAND & MECKLENBURG, 1966).

KUMAR & HARTLAND (1992), considerando que para elevadas taxas de agitação a fase dispersa se comporta como um meio contínuo, propuseram uma correlação para o coeficiente de dispersão axial, em extratores agitados, semelhante a expressões desenvolvidas para a fase contínua (NEMECEK & PROCHAZKA, 1974). Entretanto, os resultados obtidos foram contraditórios. LEVESNPIEL & FITZGERALD (1983) mostraram que para pequenos desvios do escoamento tipo pistão, o modelo da dispersão prediz a proporcionalidade entre a variância do tempo de residência e o comprimento do extrator. HOUGHTON *et alii* (1988), sugeriram que ocorre redução da mistura axial com alta frequência de quebra e coalescência de gotas, devido a uma maior homogeneização na concentração do soluto. No caso de uma distribuição de tamanhos de gotas muito próxima, com elevadas taxas de agitação, coalescência e redispersão, o modelo da difusão descreve adequadamente o comportamento da fase dispersa no escoamento. Mas, em geral, deve ser empregado com certo cuidado, já que muitas vezes os dados experimentais são destituídos de sentido físico devido à natureza polidispersa desta fase. As propriedades convectivas da fase dispersa devem ser consideradas e quantificadas em todas as outras situações.

Em vista da complexidade do padrão de escoamento no extrator, a sua representação através de modelos de fluxos teóricos partindo de experimentos com traçadores apresenta severas limitações. Particularmente pelo fato do domínio, onde as

considerações dos modelos são atingidas na prática, não se encontrar bem delineado. É importante, portanto, que os resultados experimentais sejam confirmados com determinações básicas de eficiência no estudo da transferência de massa (INGHAM, 1971).

1.4.3. Fração Retida da Fase, "Hold Up"

É um parâmetro importante no cálculo da transferência de massa e na teoria da inundação, por permitir a previsão do tamanho da gota e do ponto de inundação. O "hold up", ou fração de uma das fases, dispersa ou contínua, retida no equipamento e disponível para a extração, pode ser previsto a partir das dimensões do equipamento e, em princípio, de correlações para a velocidade superficial da gota. Esta forma elegante de cálculo permite o estudo do desempenho em uma grande faixa de trabalho, mas é limitada pela falta de boas correlações para os diferentes extratores. Isto se dá, em parte, pela falta de homogeneidade no tamanho da gota, pelo movimento das gotas no sentido radial e pela quebra e coalescência das gotas.

STEINER (1988), relaciona algumas correlações e técnicas para determinação experimental do "hold up" em plantas piloto de colunas de extração. Dependendo da técnica o "hold up" é medido em posições localizadas ("hold up" local) ou ao longo de todo o equipamento ("hold up" médio). Como não existe um método geral, é aconselhável usar diferentes procedimentos na mesma unidade para uma determinação confiável do "hold up". As técnicas mais empregados são:

* estancamento rápido, onde a coluna ou uma seção dela é repentinamente bloqueada. O volume da fase de interesse é então lido. Fornece valores médios de "hold up";

* amostragem rápida, onde, após a retirada de amostra de uma fase da região de extração, ocorre a decantação e subsequente leitura dos volumes das fases. É aplicável à sistemas com excelentes condições de mistura e dispersão. É de fácil execução e fornece valores locais de "hold up";

* queda de pressão, calculado através da densidade média do sistema;

* medida hidrostática, que é adequado para equipamentos com pouca turbulência;

* radiação gama; de condutividade térmica e capacitância e o de medidas ultra-sônicas (TSOURIS *et alii*, 1990).

1.4.4. Transferência de Massa em Equipamentos Contínuos

A transferência de massa entre duas fases líquidas é função do comportamento dos líquidos ao atravessarem o extrator e da taxa local de transferência de massa, que depende da resistência no filme líquido interfacial. O tipo de fluxo afeta a distribuição de tempos de residência e o gradiente de concentração, ou seja, a força motriz para a transferência. Assim, para predição da taxa global de transferência de massa, a modelagem do processo deve envolver o comportamento das fases ao escoarem e o processo de transferência de massa local.

Em equipamentos de contato contínuo o número de estágios, ou a altura da coluna, necessários para atingir o grau de separação desejado podem ser calculados com base nos conceitos de número de unidades de transferência (NTU-"Number of Transfer Unit") ou altura da unidade de transferência (HTU-"Height of Transfer Unit"). Para o líquido 1 (STEVENS & PRATT, 1992),

$$NTU_x = \int_{C_{x1}}^{C_{x0}} \frac{dC_x}{(C_x - C_{xi})} \qquad (1.3)$$

$$HTU_x = \frac{U_x}{k_x a} \int_{C_{x1}}^{C_{x0}} \frac{dC_x}{(C_x - C_{xi})} \qquad (1.4)$$

onde

a = área interfacial por unidade de volume do extrator ($L^2 .L^{-3}$)

C= concentração do soluto, adimensional

k_x = coeficiente de transferência de massa ($L.T^{-1}$)

U_x = velocidade linear da fase ($L.T^{-1}$)

x, 0, 1 e i referem-se, respectivamente, às concentrações de soluto na fase líquida 1, alimentação, final no líquido 1 e na interface. O líquido 2 é tratado de maneira igual.

Alguns dos mecanismos propostos para determinação dos coeficientes individuais de transferência tem origem nas teorias do filme, da superfície renovada e da camada limite. Uma revisão sobre o assunto foi feita por SKELLAND (1992). Para fins comparativos, um método aproximado de avaliação da altura é de grande utilidade, principalmente na ausência de dados experimentais. Alguns dos modelos existentes estão citados abaixo.

1.4.4. 1. Modelos de Transferência de Massa

Os modelos propostos para descrição do processo de transferência são fundamentados em dois tipos de escoamentos idealizados, fluxo pistão e completamente misturado. No

primeiro, assume-se que cada fase percorre o equipamento com velocidade constante, uniforme e independente da posição. A transferência de soluto se dá somente na direção perpendicular ao escoamento. No segundo, o conteúdo do extrator é considerado totalmente misturado. As fases são instantaneamente misturadas com todo o líquido no interior da unidade. Formam-se fases com composições de soluto homogêneas em todo o meio. A consideração de fluxo pistão contracorrente gera maior força motriz, sendo portanto preferível ao completamente misturado, no qual ambas as fases são sempre mantidas na mesma concentração de saída.

Os modelos ideais consideram que somente o soluto é transferido, que as concentrações de soluto são baixas, que são constantes o coeficiente de partição, a distribuição de tamanhos de gotas, as taxas de escoamento das fases e propriedades físicas, como viscosidade e densidade. Já que estas hipóteses, geralmente, não são obedecidas na sua totalidade em um processo industrial, outros modelos foram desenvolvidos para uma representação mais realista do comportamento do extrator. Entretanto, deve-se recordar que o fluxo no extrator é complexo e uma modelagem precisa é de difícil obtenção. As novas aproximações partem dos dois tipos de fluxos idealizados, considerando a existência da difusão molecular e de turbilhões na direção do escoamento das fases, variações das velocidades lineares dos líquidos nas direções radial e axial e, também, o arraste de uma fase pela outra.

Com relação à influência da agitação mecânica, pode-se dizer que é geralmente benéfica, por levar à formação de gotas de tamanho pequeno, proporcionando maiores áreas interfaciais e reduzindo a altura da coluna. Entretanto, a mistura axial poderá aumentar e, os efeitos negativos decorrentes desta, poderão não compensar a redução na altura da unidade de transferência de massa. O ideal seria manter a força motriz máxima, por meio de altos níveis de agitação, o que elevaria a eficiência e diminuiria a altura necessária para a transferência.

Um modelo dificilmente englobará todas estas variáveis, a menos que seja extremamente complexo. O procedimento mais frequente é assumir uma representação para o processo em estudo, aplicá-la e compará-la com as observações experimentais. Então, modificá-la até que se adeque ao equipamento de trabalho.

Modificações nos modelos de fluxo ideais, tipo pistão e completamente misturado, geraram os modelos da dispersão e o de estágios com mistura retroativa. Neste último, a coluna é tida como uma série de estágios completamente misturados. Em adição ao escoamento principal dentro do extrator supõe-se que uma porção do fluxo de cada fase ocorra na direção inversa, como por exemplo no arraste de uma fase pela outra. É assumido que frações das fases contínua e dispersa atravessam os N estágios em uma direção oposta a do fluxo principal. Os perfis de concentração para as duas fases são obtidos das equações diferenciais resultantes de balanço de massa no sistema. A agitação poderá também contribuir para a mistura retroativa. Este modelo é limitado, devido à dificuldade de medir as frações de fases que escoam em sentidos opostos. Soluções das equações diferenciais foram dadas por HARTLAND & MECKLENBURG (1966).

O modelo da dispersão, da difusão ou fluxo pistão com dispersão axial é aquele no qual ao escoamento pistão é adicionado um fluxo longitudinal, de difusão molecular e por turbilhões, dentro de cada fase. Considera a dispersão axial do soluto em cada fase. Assume que todos os desvios do escoamento tipo pistão são representados por um único parâmetro, o coeficiente de dispersão axial, que está incluído no número de Peclet, Pe. As equações de balanço levam a uma equação diferencial complexa, que pode ser resolvida com os dados das concentrações, em posições locais, propriedades físicas e vazões, entre outros A eficiência de extração é dependente tanto do número de unidades de transferência quanto do número de Peclet, que é uma medida quantitativa da influência da mistura axial no desempenho do extrator.

Os valores preditos de eficiência irão variar para um dado número de unidades de transferência entre aqueles fornecidos pelos fluxos ideais pistão, Pe = ∞, e completamente misturado, Pe = 0. Assim, se tem disponível um modelo flexível na predição do desempenho para uma grande variedade de comportamentos de escoamentos de fases, mesmo que a melhoria alcançada dependa somente da inclusão de um único parâmetro adicional, Pe.

2. METODOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL

Neste capítulo são apresentados a sistemática de realização dos experimentos, as condições operacionais, os materiais e os métodos de análise empregados.

2.1. Seleção e Caracterização do Sistema de Trabalho

2.1.1. Escolha do Sal

Quando comparados os sistemas PEG-citrato, PEG-fosfato ou PEG-sulfato, o primeiros aparece como uma alternativa viável para operações de médio porte onde maiores quantidades de sal são empregadas. Citratos são compostos orgânicos biodegradáveis, passíveis de descarte em uma estação biológica de tratamento de resíduos, e se ajustaram bem à separação da enzima R-oxinitrilase, do farelo de amêndoas, em um sistema PEG-citrato de sódio (VERNAU & KULA, 1990).

Neste trabalho, a separação de α-la e β-lg do soro bovino foi escolhida como exemplo de um meio real para o isolamento de proteínas usando SAB. Os sistemas PEG-citrato de sódio foram inicialmente testados com este objetivo, buscando evitar a poluição ambiental ocasionada por sulfatos e fosfatos. Mas, como será discutido a seguir não se adequaram bem à separação da α-la. Optou-se então pelo uso dos sistemas PEG-fosfato de potássio, apropriados para separação da α-la e da β-lg em SAB, como proposto inicialmente por CHEN (1992).

2.1.2. Preparação dos Sistemas de Fases

Sistemas aquosos bifásicos, compostos por PEG-fosfato de potássio e PEG-citrato de sódio, foram preparados a partir de soluções estoques de PEG (50% peso/peso, p/p) e sal (30% p/p, pH 7) para os experimentos objetivando determinar a relação de fases e o coeficiente de distribuição usando proteínas puras. As concentrações de PEG e dos sais nestas soluções estoques foram monitoradas durante aproximadamente 1 mês por liofilização verificando-se que não ocorriam alterações nos seus valores. Para atingir o pH 7, foram adicionadas quantidades de fosfato de potássio monobásico e dibásico na proporção mono:di igual a 1:1,82. Para o citrato de sódio, o pH 7 foi ajustado com soluções concentradas de hidróxido de sódio e ácido cítrico ou ácido cloridrico. Os sistemas nas concentrações desejadas foram formados pesando as massas dos componentes das soluções estoques em tubos centrífugos de 10 g. A estes foram adicionados água. Por exemplo, o sistema 14% PEG-18% sal (p/p), pH 7, foi formado, para 10 g, adicionando-se em tubo centrífugo de 15-20 ml, sobre uma balança analítica, 1,8 g de sal (na proporção 1 di:1,82 mono), 1,4 g do PEG (de peso molecular desejado) e água até completar 10 g. Ou adicionando volumes correspondentes das soluções estoques previamente preparadas. Este último procedimento agilizou a dissolução das substâncias. Os sistemas foram misturados manualmente por inversão (5 min) e separados por centrifugação (5 min, 4000 rpm) em uma centrífuga de bancada.

2.1.3. Relação de Fases

A influência de diferentes pesos moleculares de PEG e do teor do sal sobre a relação de volumes das fases formadas foi observada através da determinação dos volumes dos sistemas obtidos, com a adição dos componentes em diferentes concentrações de PEG e citrato de sódio ou fosfato de potássio monobásico e dibásico, pH 7.

2.1.4. Experimentos de Partição

Para a determinação do coeficiente de partição foram incorporadas aos sistemas, descritos em 2.1.2, 5 mg de α-la ou β-lg puras ou em solução (5 mg/ml) antes da adição de água. Posteriormente a massa do sistema era completada até 10 g com a adição do volume necessário de água. Alíquotas das fases superior e inferior foram retiradas com pipetas Pasteur para a determinação, por cromatografia, da concentração das proteínas. Todos os sistemas e soluções de proteínas foram preparados no mesmo dia de realização do experimento, pois as soluções aquosas de proteínas puras eram instáveis a 5^0C, temperatura de refrigeração. Isto é, as proteínas se agregavam se estocadas em geladeira em soluções água-proteínas puras.

2.1.5. Curva de Calibração

Os sistemas para a construção das curvas de calibração para determinação analítica das concentrações de α-la e β-lg, por cromatografia líquida de proteínas, foram obtidos com a adição de soluções das proteínas, em diferentes concentrações na proporção 1:2,5 de α-la:β-lg, ao sistema 14% PEG-18% fosfato de potássio, antes da adição da água e preparado conforme descrito anteriormente.

2.1.6. Quantificação de α-Lactoalbumina e β-Lactoglobulina

Um método cromatográfico foi desenvolvido, para a determinação simultânea de ambas as proteínas, a partir de uma curva de calibração construída em um sistema de cromatografia líquida, CLRP, (FPLC-"Fast Protein Liquid Chromatography") com soluções aquosas de α-la e β-lg. A coluna cromatográfica empregada foi a de troca

iônica Mono Q HR 5/5, com pressão de 1,5-2 MPa, fluxo 1,0 ml/min, volume de amostra 1 ml e a absorbância foi determinada a 280 nm, à temperatura ambiente (23^{o}C). As amostras da fase salina, ou inferior, retiradas dos sistemas de fases foram dessalinizadas por filtração em gel em uma coluna Sephadex PD-10, e depois filtradas (filtro 0,2 μm, membrana de acetato de celulose) antes de sua introdução na coluna. As amostras da fase polimérica, ou superior, foram diluídas na proporção 1:3 e filtradas (filtro 0,2 μm). Para sistemas com elevadas concentrações de sais, estas amostras foram também dessalinizadas como descrito acima.

Para determinação das condições ótimas foram testadas várias soluções tampões, em diferentes valores de pH, bem como diferentes combinações gradiente-platô.

A limpeza da coluna foi feita após cada análise com 2 M NaCl, 1 M NaOH, 2 M NaCl, 1 M HCl e 2 M NaCl e logo a seguir equilibrada com 100% do padrão B (1 M NaCl em solução 0,01 M de fosfato de potássio, pH 7), para garantir a repetibilidade da análise, conforme recomendação do fabricante. A limpeza após cada corrida foi necessária para evitar obstruções decorrentes da presença de lipídeos na amostra. Uma sugestão seria a eliminação dos lipídeos antes da introdução da amostra na coluna, mas para evitar prováveis perdas de proteínas, foi feita a referida limpeza, o que diminuiu o tempo de vida útil da coluna. Prevendo estes problemas, inicialmente foram testados outros métodos de análise das proteínas como densidade ótica a 280 nm e BRADFORD (1976), usando tanto albumina de soro bovino quanto α-la e β-lg para calibração. Foram abandonados por levarem à determinação de proteínas totais. A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, "sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis") na presença de mercaptoetanol também foi testada, mas além da periculosidade, as bandas obtidas não foram nítidas. Era necessária uma otimização da quantidade de gel e a determinação quantitativa, por intensidade de cor-densidade, se fazia trabalhosa e demorada para experimentos em

uma unidade contínua, onde os testes devem ser relativamente rápidos para controle imediato do processo. Este método foi também abandonado.

2.1.7. Propriedades Físicas das Fases

A densidade das fases foi determinada pesando separadamente as fases obtidas em tubos centrífugos de volumes calibrados. As viscosidades foram medidas em um viscosímetro Haake (Haake viskosimeter Rotovisco RV100-Messsystem CV 100, Karlsruhe, Alemanha).

2.2. Caracterização Hidrodinâmica do Equipamento

Para caracterização hidrodinâmica do extrator Graesser foram usados a distribuição de tempos de residência, o coeficiente de mistura axial e o "hold up".

2.2.1. Extrator Graesser

O extrator Graesser de 100 cm de comprimento por 10 cm de diâmetro interno (QVF Glastechnik Copm., Wiesbaden, Alemanha), Figura 2.1, diferente da maioria das colunas de extração usuais, é operado horizontalmente. É constituído por um vaso cilíndrico de vidro e um motor de 0,25 kW. Dentro do corpo cilíndrico se encontra o rotor formado por um eixo ao qual estão ligados 36 compartimentos. O motor é usado para a movimentação deste rotor através de catracas que permitem a alteração da velocidade. Os 36 compartimentos são formados por 36 placas circulares de aço inox

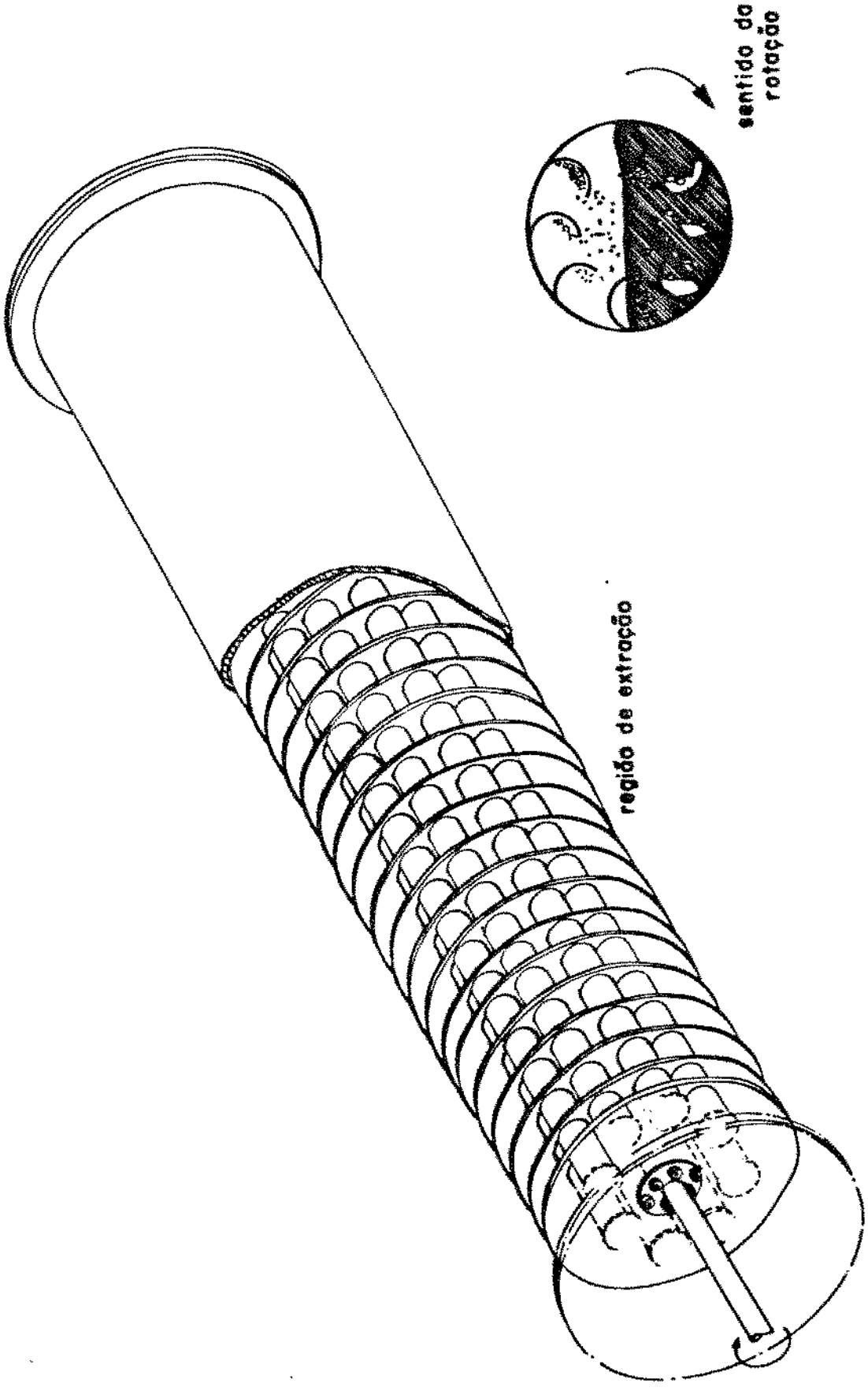

Figura 2.1.a. Extrator Graesser usado nos experimentos

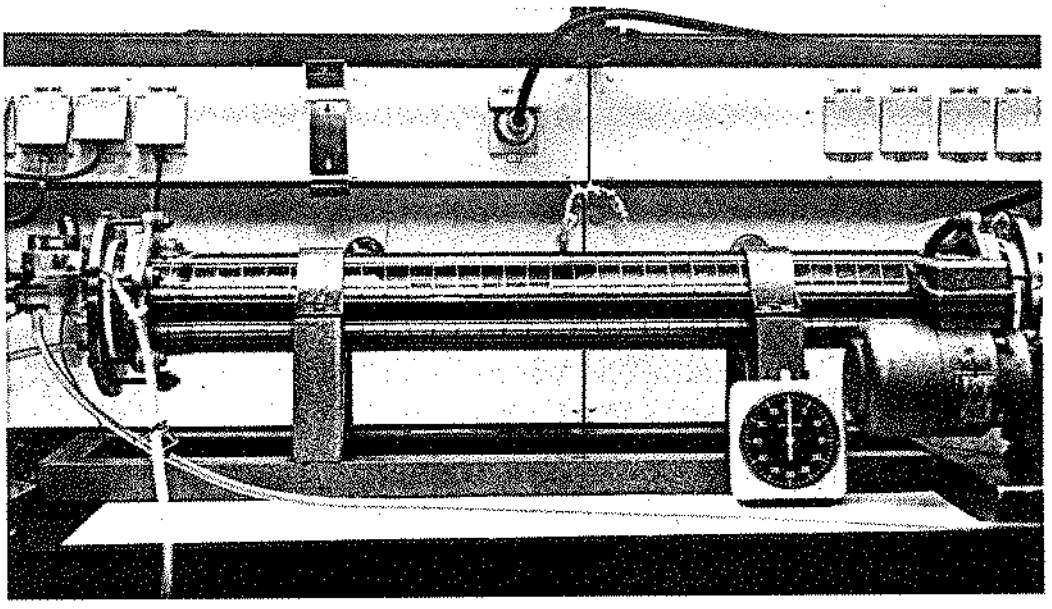

Figura 2.1.b. Montagem experimental do extrator Graesser

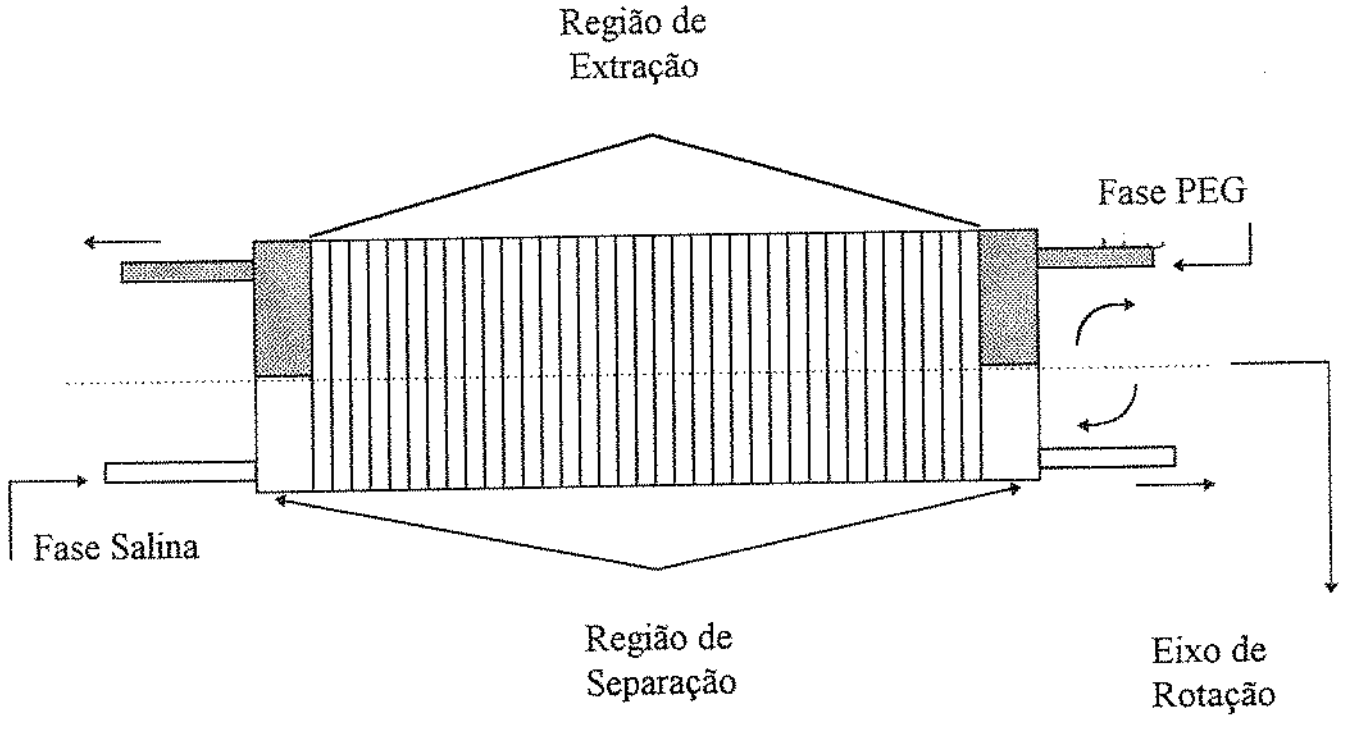

Figura 2.1.c. Diagrama esquemático das correntes de entrada e saída no extrator

(9,4 cm de diâmetro). Em cada placa estão presos 8 cestos semicilíndricos de aço inox (2,5 cm de diâmetro), parcialmente abertos na direção da mistura.

A direção do movimento do rotor foi invertida e a velocidade de agitação reduzida (0 a 10 rpm) para evitar a inundação e levando a condições operacionais mais estáveis (HUSTED *et alii*, 1980). No extrator, a fase rica em PEG foi introduzida e retirada na parte superior pelos lados direito e esquerdo, respectivamente. A fase rica em sal foi introduzida e retirada na parte inferior pelos lados esquerdo e direito, respectivamente. Escoaram portanto em modo contracorrente a partir das extremidades do corpo cilíndrico. O fluxo neste tipo de equipamento ocorre por um vazio anular (0,3 cm de espaço livre) entre as placas circulares que sustentam os cestos semicilíndricos e a parede interna do vaso cilíndrico. Quando em operação, o nível da interface dos líquidos é controlado na linha central do aparelho por meio de um controle hidrostático. As fases foram introduzidas por bombas peristálticas.

Uma mistura suave é gerada através do movimento dos cestos semicilíndricos que transportam porções de uma fase para o interior da outra. Por exemplo na parte inferior do extrator, o cesto se enche da fase que preenche esta região do equipamento. Com a rotação carrega-a para o lado superior, ocupado pela fase de topo. Acima da interface começa a descarregá-la na forma de gotas dentro da fase superior, a qual também escoa na direção da interface. À medida que descarrega a fase inferior, se enche da de topo que será levada para a fase de fundo. Portanto, a fase superior é conduzida simultaneamente e da mesma maneira para dentro do líquido inferior, escoando também na forma de gotas em direção à interface. O movimento dos líquidos causado por esta circulação na direção da interface é do tipo cascata. A separação das fases ocorre nas duas zonas de separação, localizadas nas extremidades direita e esquerda do corpo cilíndrico.

2.2.2. Condições Operacionais

As velocidades de rotação testadas para os experimentos de distribuição de tempos de residência, fração retida da fase rica em PEG ("hold up") e de transferência de massa foram de 3, 5, 7 e 9 rpm. Estes baixos valores de velocidade de rotação foram escolhidos visando minimizar a tensão de cisalhamento nos experimentos de transferência de massa e manter intacta a estrutura conformacional das proteínas, evitando assim a desnaturação por agitação. Estes valores encontram-se dentro da faixa sugerida por HUSTED *et alii* (1980) para o processamento de biomoléculas no extrator Graesser e entre aqueles estudados por SHEIKH *et alii* (1972) para o sistema querosene-n-butilamina-água. As relações das fases (rica em PEG/rica em sal) foram 2:1; 1,2:1 e 0,8:1 para os experimentos de distribuição de tempos de residência na fase polimérica e de 2:1; 1,2:1; 0,8:1 e 0,5:1 para os experimentos de distribuição de tempos de residência na fase salina. As correspondentes taxas de escoamento foram 36 ml/min, 66 ml/min e 88 ml/min para a fase rica em PEG e 44 ml/min e 70 ml/min para a fase rica em sal. A fase salina foi introduzida como a fase de fundo, ou pesada, e a fase polimérica como a fase de topo, ou leve.

2.2.3. Preparação dos Sistemas de Trabalho

Para os experimentos em processo contínuo no extrator Graesser, foram pesados diretamente 21 kg de PEG 1550, 19,6 kg de fosfato de potássio dibásico, 7,4 kg de fosfato de potássio monobásico, 102 kg de água, levando ao pH 7 e totalizando 150 kg, para a composição do sistema com 14% PEG-18% sal. Os componentes foram igualmente divididos e agitados por 2 horas em 4 tambores de 45 litros. Após a primeira agitação, os conteúdos dos tambores foram transferidos para um tanque de vidro de 300 litros para uma segunda agitação de 1 hora. O tanque é aberto no topo, com uma pequena cavidade na parte inferior ligada por uma mangueira a uma bomba,

o que possibilitava a agitação do sistema. Depois de interrompida a agitação, as fases lá permaneceram por 12 horas para decantar e atingir o estado de equilíbrio, necessário para evitar qualquer interferência no sistema, que não as decorrentes do escoamento e da transferência de massa dos componentes do soro. Após este intervalo de tempo, as fases foram retiradas e separadas em tambores de 75 litros. Foram também estocadas à temperatura ambiente, 23^{0}C, por um período de no máximo 15 dias até a realização dos experimentos. Não foi verificada qualquer alteração das fases nesse período.

2.2.4. Distribuição de Tempos de Residência

A distribuição de tempos de residência, tanto da fase polimérica quanto da fase salina, foram determinadas pelo método da injeção de um corante, na forma de um pulso Dirac concentrado, em um curto intervalo de tempo. As concentrações de corante foram testadas, partindo de valores baixos, até se atingir um teor no qual a resposta obtida estivesse bem clara, isto é, onde a cor não se perdesse ao longo do extrator, nem onde uma coloração extremamente forte fosse obtida, pois levaria a uma maior dispersão nas medidas de distribuição de tempos de residência. Na escolha do corante, procurou-se observar a capacidade de não distribuição do mesmo entre as fases, isto é o traçador deveria permanecer somente na fase a ser estudada, não interagindo com a outra fase líquida. O traçador foi injetado, em cada velocidade de rotação, a uma vazão fixa de uma das fases e a diferentes vazões da outra fase.

2.2.4.1. Fase Polimérica

Um pulso Dirac de azul de cibacron, foi usado como o traçador para a fase polimérica (15 mg/ml, 1 ml, tempo de injeção de 2 s). Foi introduzido no sistema pela entrada da

fase PEG. A concentração do traçador foi determinada por medidas on-line de absorbância, comprimento de onda 595 nm, na saída da fase polimérica.

2.2.4.2. Fase Salina

Para a fase salina foi usado um pulso Dirac de azul de dextrana (70 mg/ml em 5% de uma solução alcoólica, 1 ml, tempo de injeção de 4 s). O corante foi injetado no sistema pela entrada da fase salina e a sua concentração foi determinada medindo também a absorbância, 595 nm, na saída da fase salina.

Como a distribuição de tempos de residência do corante é influenciada por qualquer desvio do escoamento pistão, o coeficiente de dispersão resultante engloba todas as não idealidades do sistema (STEINER *et alii*, 1988). Um programa computacional, baseado nas equações para o modelo da dispersão, geraram o tempo de residência médio, a média, a variância e o número de Peclet (LEVENSPIEL, 1992). O número de Peclet foi usado para determinar os coeficientes de mistura axial. Através da variância das curvas de distribuição de tempos de residência foi avaliada a aplicabilidade dos modelos da dispersão e de tanques em série para o sistema estudado.

2.2.5. Determinação da Fração Retida da Fase, "Hold up"

Após ter sido atingido o estado estacionário, correspondente ao período de três tempos de residência para a fase salina, em uma predeterminada condição de velocidade de agitação e relação de vazões, foi determinado o "hold up" da fase rica em PEG pelo método do estancamento. Neste procedimento são interrompidas simultaneamente a agitação e todas as correntes de entrada e saída do extrator. O extrator foi então

descarregado, as fases levadas à decantação e os volumes das fases foram lidos. Esta técnica leva a medidas de "hold up" médio.

Para determinação do "hold up" local foram retiradas amostras de 10 ml, com seringas, das fases superior e inferior imediatamente acima e abaixo da interface. O ponto de amostragem se localizava no centro do extrator. Neste mesmo ponto foram retiradas amostras (10 ml, com seringas) próximas à parede superior e inferior para determinação do "hold up" no topo e no fundo do extrator, respectivamente.

2.3. Estudo da Transferência de Massa

2.3.1. Preparação do Sistema

Para os experimentos de transferência de massa, o soro em pó foi dissolvido na fase salina (15% p/p do total de fase salina foi composta por soro) preparada como descrito no item 2.2.3. A solução foi agitada por uma hora até completa solubilização. Foi filtrada antes de ser introduzida no extrator para evitar a formação de uma camada sólida na interface entre as fases dentro do equipamento, o que prejudicaria sensivelmente a transferência de massa. O permeado foi usado como a alimentação, ou fase salina, nos experimentos em processo contínuo, à temperatura ambiente (23^0C). Também foram feitos alguns experimentos com o soro dissolvido na fase polimérica.

2.3.2. Experimentos de Transferência de Massa

Os testes foram conduzidos em estado estacionário e nas condições preestabelecidas de velocidade de agitação (3, 5, 7 e 9 rpm) e relação de vazões (2:1; 1,2:1; 0,8:1 e 0,5:1).

As amostras foram retiradas, a intervalos de três tempos de residência da fase salina, nas correntes de saída e no ponto de amostragem localizado no meio do extrator. Neste local retirou-se amostras das fases superior e inferior, acima e abaixo do nível da interface, supondo a existência de uma mistura homogênea em ambas as fases.

2.4 Reagentes e Equipamentos

2.4.1. Reagentes

* acetato de sódio: Riedel-de Haën
* ácido clorídrico: Merck
* acrilamida, bis-acrilamida: Fluka
* albumina de soro bovino-grau eletroforético: Sigma
* azul de cibacron 3GA: Sigma
* azul de coomassie: Merck
* azul de dextrana T-200: Pharmacia
* Bis- Tris, 2 bis(2-hidroxietil)amino-2(hidroximetil)-1,3-propanodiol: Sigma
* citrato de sódio: Jungbunzlauer Landenburg Gmbh
* cloreto de sódio: Aldrich
* fosfato de potássio monobásico e dibásico: B.K. Landenburg
* hidróxido de sódio: Sigma
* α-lactoalbumina bovina, grau eletroforético: Sigma
* β-lactoglobulina bovina, grau eletroforético: Sigma
* mercaptoetanol: Merck
* padrão de proteínas para eletroforese: Böhringer
* piperazina: Sigma

* polietileno glicol com peso molecular de 400, 600, 1000, 1550, 4000 e 12000 (Lipoxol): Hülls AG
* SDS: Serva
* soro de queijo em pó, Fondolac SL: gentileza da Meggle Milchindustrie GmbH & Co. KG (Wasserburg, Alemanha).
* sulfato de amônio: Serva

Na Tabela 2.1. é apresentada, de acordo com as especificações do fabricante, a composição do soro de queijo em pó.

Tabela 2.1. Composição do soro de queijo em pó

Constituintes	Quantidade (%)
água	max. 4
N_{total} x 6,38	ca. 26
lipideos	ca. 2
lactose	ca. 46
cinzas	ca. 16
Na	1,8
K	5
Ca	1,1
P	1,3
Cl	3
pH	ca. 6,5

N_{total} = nitrogênio total

2.4.2. Equipamentos

* balança analítica: Sartorius
* bombas peristálticas: Verder
* bomba 50 000 psi: Omel
* centrífuga compacta, 15000 rpm: duPont
* coluna cromatográfica de troca aniônica Mono Q HR 5/5: Pharmacia
* sistema CLRP (FPLC-"Fast Protein Liquid Chromatography"): Pharmacia
* coluna para filtração em gel PD-10 sephadex: Pharmacia
* eletroforese: unidade Protein II da Bio-Rad e sistema Phast da Pharmacia
* espectrofotômetro uv-visível on-line: LKB Biochrom 4049
* espectrofotômetro uv-visível: Shimadzu UV-160
* extrator Graesser: QVF Glastechnik GmbH (Quickfit Graesser Contactor)
* filtro 0,2 μm: Sigma
* filtro prensa: Seitz Enziger Noll
* medidor de pH: Metrohm
* papel de filtro 4946: Seitz-Filterwerke
* tanque de agitação e decantação 300 litros: Glasstechnik GmbH
* tambores de plástico, 45 e 74 litros
* viscosímetro: RV 100, Haake
* materiais de rotina em laboratório, como béquer, tubos de ensaio, balões volumétricos, entre outros.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O conjunto parcial dos resultados obtidos experimentalmente será apresentado, analisado e discutido neste capítulo. A totalidade dos dados está representada no Apêndice A1.

3.1. Determinação da Concentração de α-Lactoalbumina e β-Lactoglobulina

Para a determinação do coeficiente de distribuição e para os estudos de transferência de massa foi necessário, em primeiro lugar, definir um método analítico para quantificar as concentrações das proteínas.

Na análise do coeficiente de partição foram usadas somente proteínas puras, α-la ou β-lg, possibilitando o emprego de técnicas analíticas para proteínas totais. Foram testadas a densidade ótica, a 280 nm, e Bradford, sendo que estes procedimentos não forneceram resultados satisfatórios. Optou-se então pelo estabelecimento de um método para quantificar individualmente as proteínas. Foram testados eletroforese em gel de acrilamida e cromatografia líquida, CLRP, com coluna de troca iônica. A eletroforese nas condições usadas também não se adequou bem à resolução das proteínas, apresentando bandas de separação largas. Foi escolhida portanto CLRP com coluna de troca iônica.

Neste último caso, os padrões empregados no desenvolvimento do método cromatográfico para quantificação da α-la e β-lg estão apresentados na Tabela 3.1. O sistema número 4 foi selecionado por levar a melhor separação. O procedimento empregado está dado na Tabela 3.2.

Tabela 3.1. Composição dos solventes para cromatografia líquida

	Solvente A (pH = 7)	Solvente B
1	0,02 M piperazina	0,02 M piperazina + 1 M NaCl
2	0,02 M Bis-Tris[a]	0,02 M Bis-Tris[a] + 1 M NaCl
3	0,02 M Bis-Tris[a]	0,02 M Bis-Tris[a] + 1 M NaAc[b]
4	0,01 M KP_i	0,01 M KP_i + 1 M NaCl

[a] Bis-Tris, 2 bis(2-hidroxietil)amino-2(hidroximetil)-1,3-propanodiol, [b] NaAc = acetato de sódio

Tabela 3.2. Programação gradiente-platô empregada na determinação analítica da α-lactoalbumina e β-lactoglobulina

	Tempo (min)	Solvente B (%)
Gradiente	0-20	10
Platô	20-25	10
Platô	25-40	30
Platô	40-50	100

De acordo com MORR & HA (1993), a β-lg é um dímero formado por β-lg A e β-lg B. Dois picos para β-lg foram obtidos usando as proteínas puras na construção da curva de calibração. No entanto, como pode ser visto nas Figuras 3.1 e 3.2, um único pico foi obtido usando amostras vindas do extrator, isto é, com o soro dissolvido.

As curvas de calibração para a α-la e β-lg, construídas com soluções puras destas proteínas na razão 1:2,5 α-la:β-lg em CLRP, estão representadas nas Figuras 3.3.a e 3.3.b.

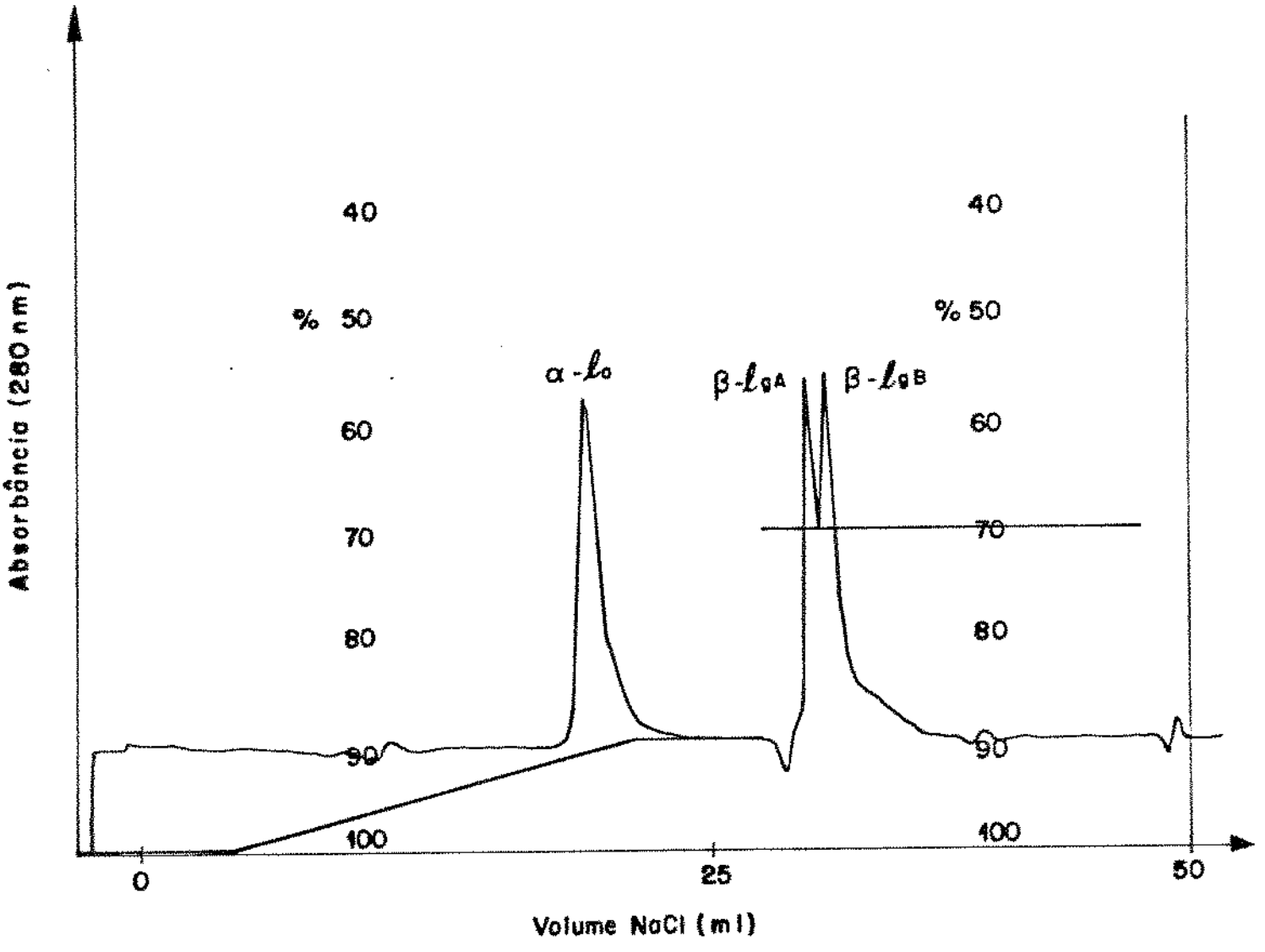

Figura 3.1. Cromatograma típico dos padrões de α-lactoalbumina e β-lactoglobulina. CLRP, coluna mono Q, fluxo 1,0 ml/min, pressão 1,5-2 MPa, solvente A: 0,01 M KP_i, solvente B: 0,01 M KP_i + 1 M NaCl

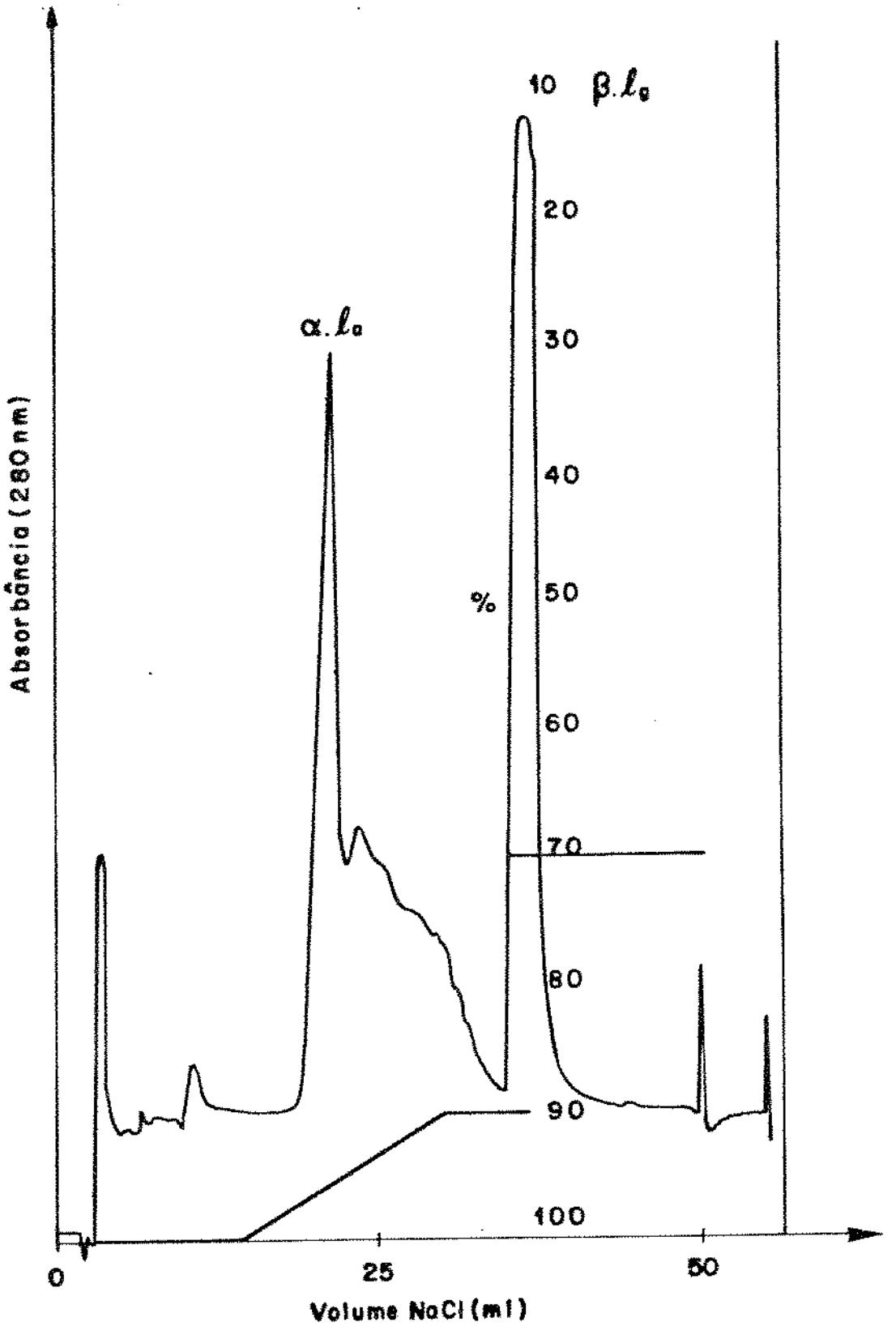

Figura 3.2. Cromatograma de uma amostra do permeado (soro dissolvido em uma solução 18% KP_i). CLRP, coluna mono Q, fluxo 1,0 ml/min, pressão 1,5-2 MPa, solvente A: 0,01 M KP_i, solvente B: 0,01 M KP_i + 1 M NaCl

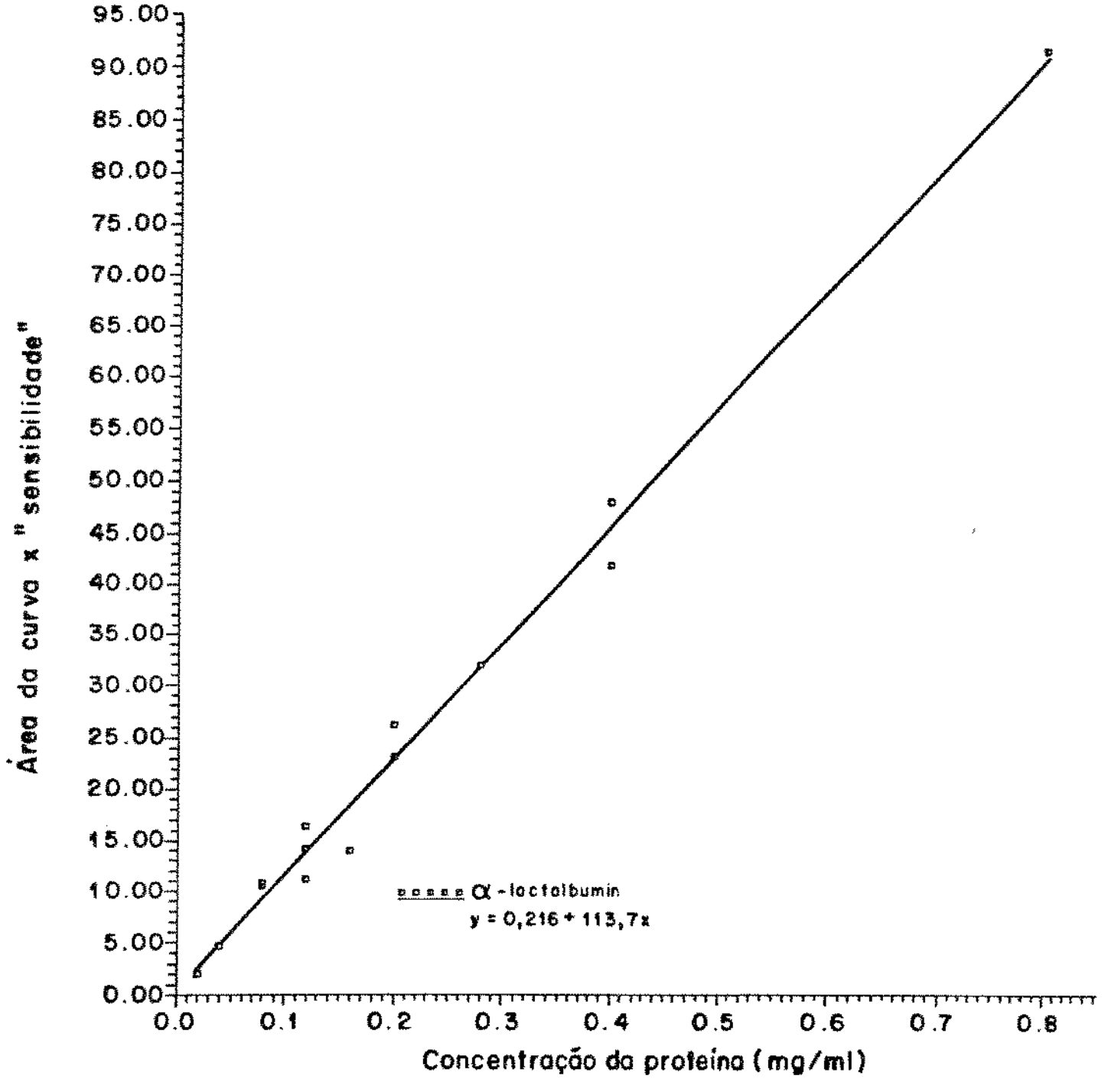

Figura 3.3. a. Curva de calibração construída em CLRP para α-lactoalbumina. Coluna mono Q, fluxo 1,0 ml/min, pressão 1,5-2 MPa, solvente A: 0,01 M KP_i, solvente B: 0,01 M KP_i + 1 M NaCl

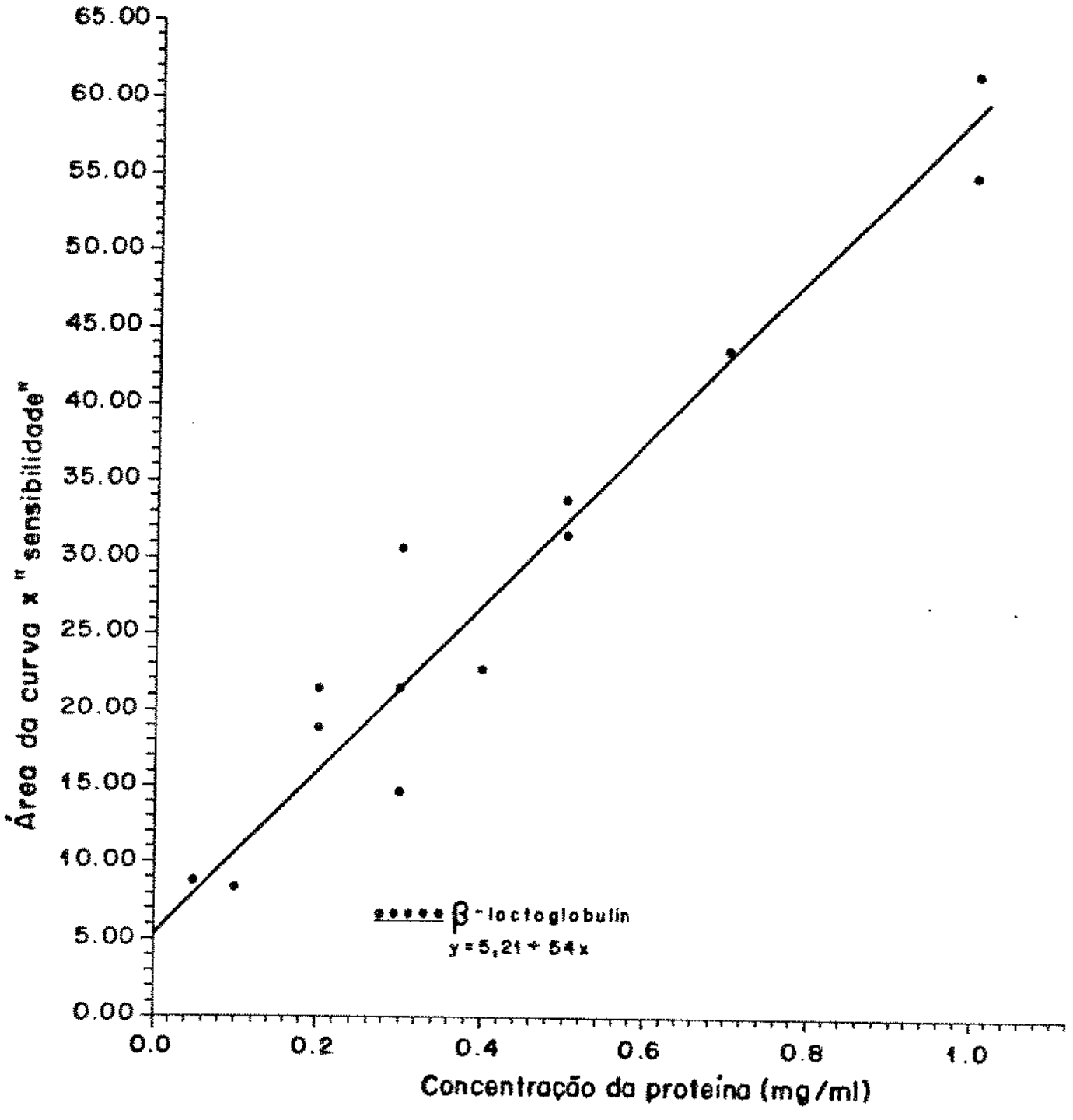

Figura 3.3. b. Curva de calibração construída em CLRP β-lactoglobulina. Coluna mono Q, fluxo 1,0 ml/min, pressão 1,5-2 MPa, solvente A: 0,01 M KP_i, solvente B: 0,01 M KP_i + 1 M NaCl

Os dados obtidos para a construção da curva de equilíbrio foram ajustados pelas equações (3.1) e (3.2), para a α-la e β-lg, respectivamente.

$$\% \text{ ml/mg} = 0{,}216 + 113{,}7 \text{ área do pico."sensibilidade"} \quad (3.1)$$

$$\% \text{ ml/mg} = 5{,}21 + 54 \text{ área do pico."sensibilidade"} \quad (3.2)$$

Foi necessário multiplicar a área do pico pela "sensibilidade" do equipamento para normalização da medida da área, o que permitiu a representação dos valores das áreas em um único gráfico. O motivo dessa consideração se deve ao fato das concentrações de α-la e β-lg estarem presentes em quantidades muito diferentes no soro (1:2,5). Assim em, por exemplo, concentrações muito baixas de β-lg, a α-la não era detectada, implicando em uma nova injeção da amostra, em uma "sensibilidade" maior, para que a α-la pudesse ser medida. Geralmente nesta segunda condição, a concentração de β-lg ultrapassava o limite de detecção, como pode ser visto na Figura 3.6 do item 3.2 usada para a quantificação de α-la.

3.2. Seleção do Sistema

A seleção do sistema foi feita segundo os resultados observados na relação de fases e nos coeficientes de distribuição das proteínas, apresentados a seguir.

3.2.1. Relação de Fases

Foi observada a influência do teor de sal e de diferentes pesos moleculares de PEG sobre a relação de volumes de fases formados. Por este critério o uso de PEG 400, 1000, 4000 e 12000 foram desfavoráveis, gerando sistemas com uma proporção de

fases muito distante da unidade, como mostrado na Tabela 3.3. Nestes casos, quando a razão entre volumes é muito distante da unidade, o uso de SAB tem o inconveniente de levar ao descarte de parte da fase presente em muito maior quantidade, já que a operação adequada do equipamento não possibilita a utilização de relações de vazão muito distante da unidade. Empregou-se portanto PEG 1550.

Tabela 3.3. Relação de volumes de fases

PEG	KP_i[a], pH 7 (%)	$V_{fsalina}/V_{fpolimérica}$	Citrato de sódio, pH 7 (%)	$V_{fsalina}/V_{fpolimérica}$
400				
10%	25	5,6	---	---
40%	7	0,1	---	---
1000				
12%	18	2,4	18	2,52
12%	20	2,5	20	2,49
1550				
12%	14	1,1	20	0,73
14%	14	0,9	---	---
14%	18	1,02	---	---
18%	---	---	10	0,43
12%	20	1,9	---	---
4000				
18%	7	0,15	---	---
22%	---	---	7	0,32
24%	7	0,33	7	0,32
12000				
14%	7	0,38	---	---
22%	7	0,4	---	---

[a] KP_i, fosfato de potássio monobásico e dibásico

3.2.2. Coeficiente de Distribuição

Além da relação de volume, outro critério empregado para escolha do solvente foi o coeficiente de partição das proteínas, definido de acordo com a equação (1.1), dada por

$$K = c_{\text{fase polimérica}}/c_{\text{fase salina}} \qquad (1.1)$$

Os valores do coeficiente de partição para a α-la encontram representados na Tabela 3.4. Praticamente toda a β-lg permanece na fase salina, como pode ser visto nos cromatogramas das Figuras 3.4 e 3.5.

Tabela 3.4. Coeficiente de partição para a α-lactoalbumina no sistema PEG-citrato de sódio, pH 7

Citrato de sódio	PEG 1550 (%)						
(%)	11	12	13	14	16	18	20
21	0,36						
20		0,84					
19			1,76				
18				0,25			
16					0,26		
14						0,19	
12							0,36

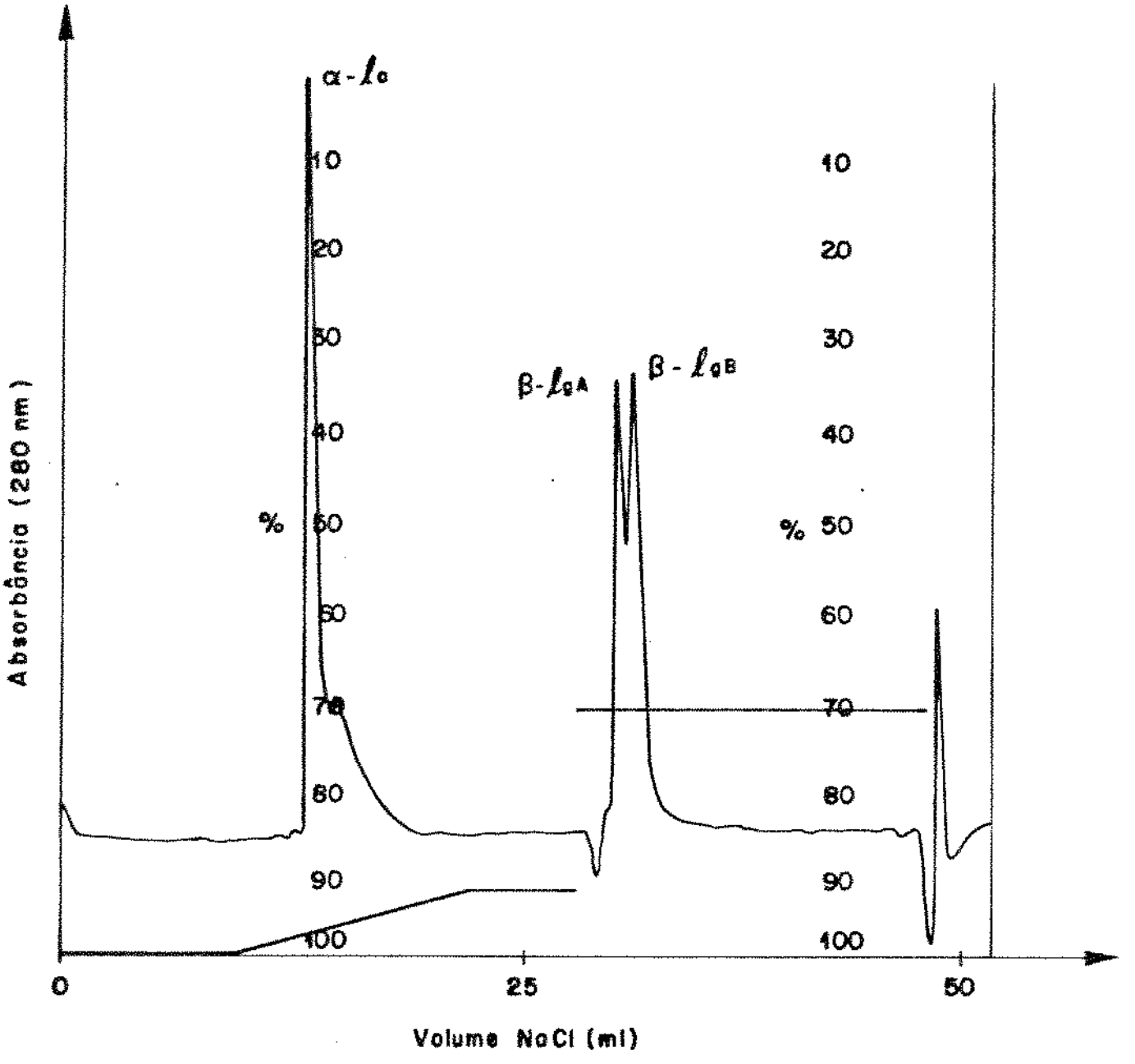

Figura 3.4. Cromatograma de uma amostra da fase salina do sistema 13% PEG-19% citrato de sódio, pH 7. CLRP, coluna mono Q, fluxo 1,0 ml/min, pressão 1,5-2 MPa, solvente A: 0,01 M KP_i, solvente B: 0,01 M KP_i + 1 M NaCl

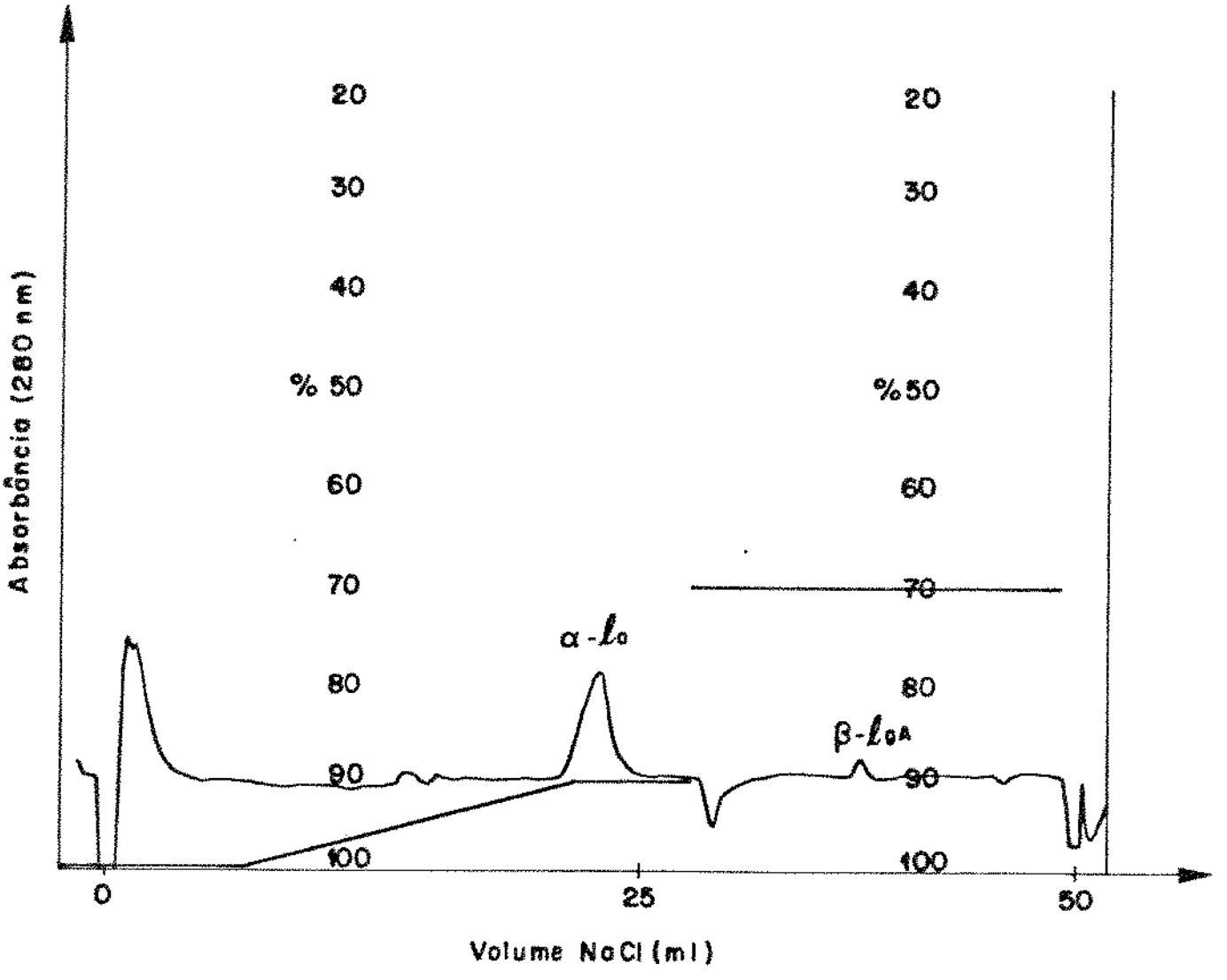

Figura 3.5. Cromatograma de uma amostra da fase polimérica do sistema 13% PEG-19% citrato de sódio, pH 7. CLRP, coluna mono Q, fluxo 1,0 ml/min, pressão 1,5-2 MPa, solvente A: 0,01 M KP_i, solvente B: 0,01 M KP_i + 1 M NaCl

Nos sistemas testados, exceto para 13% PEG-19% citrato de sódio, a α-la se concentra também na fase salina, o que inviabiliza a separação. Aparentemente, nesta situação de 13% PEG-19% citrato de sódio, é possível que ocorra uma boa separação das proteínas. Mas para valores de concentrações muito próximos, como os de 12% PEG-19% citrato e 14% PEG-16% citrato, a α-la volta a distribuir-se predominantemente na fase salina, gerando uma faixa de trabalho muito instável em torno dos valores 13% PEG-19% citrato de sódio. Este comportamento indica que se faz necessária uma otimização do sistema quanto ao pH, temperatura e outras concentrações além das estudadas. Esta etapa não foi conduzida neste estudo, pelo fato de ter-se optado pelo trabalho nas condições normais de temperatura e pressão, em pH 7 e com quantidades de sal e PEG reduzidas, facilitando tanto os estudos em planta piloto quanto a reciclagem dos constituintes.

De acordo com a Tabela 3.5, os sistemas PEG- KP_i levaram a valores dos coeficientes de partição mais favoráveis à separação das duas proteínas.

Tabela 3.5. Coeficiente de partição para α-lactoalbumina e β-lactoglobulina no sistema PEG- KP_i, pH 7

KP_i	PEG 1550 (%)			
(%)	12	14	12	14
	$K\alpha$		$K\beta$	
14	3,1	2,6	0,03	0,14
16	2,4	2,4	0,09	0,06
18	2,6	3,4	0,14	0,04
14[a]	2	3	0,06	0,05
18[b]	5,5	---	0,05	---

[a,b] dados de Chen (1992)

É possível observar na Tabela 3.5 que os dados para K_α e K_β obtidos por CHEN (1992) são próximos daqueles encontrados neste trabalho. CHEN (1992) determinou a concentração das proteínas pelo método segundo Bradford. A Tabela 3.5 mostra que o sistema mais indicado dentre aqueles testados é o composto por 14% PEG-18% KP_i. Este foi o escolhido para a realização do trabalho experimental, sendo que os cromatogramas da separação podem ser vistos nas Figuras 3.6. e 3.7.

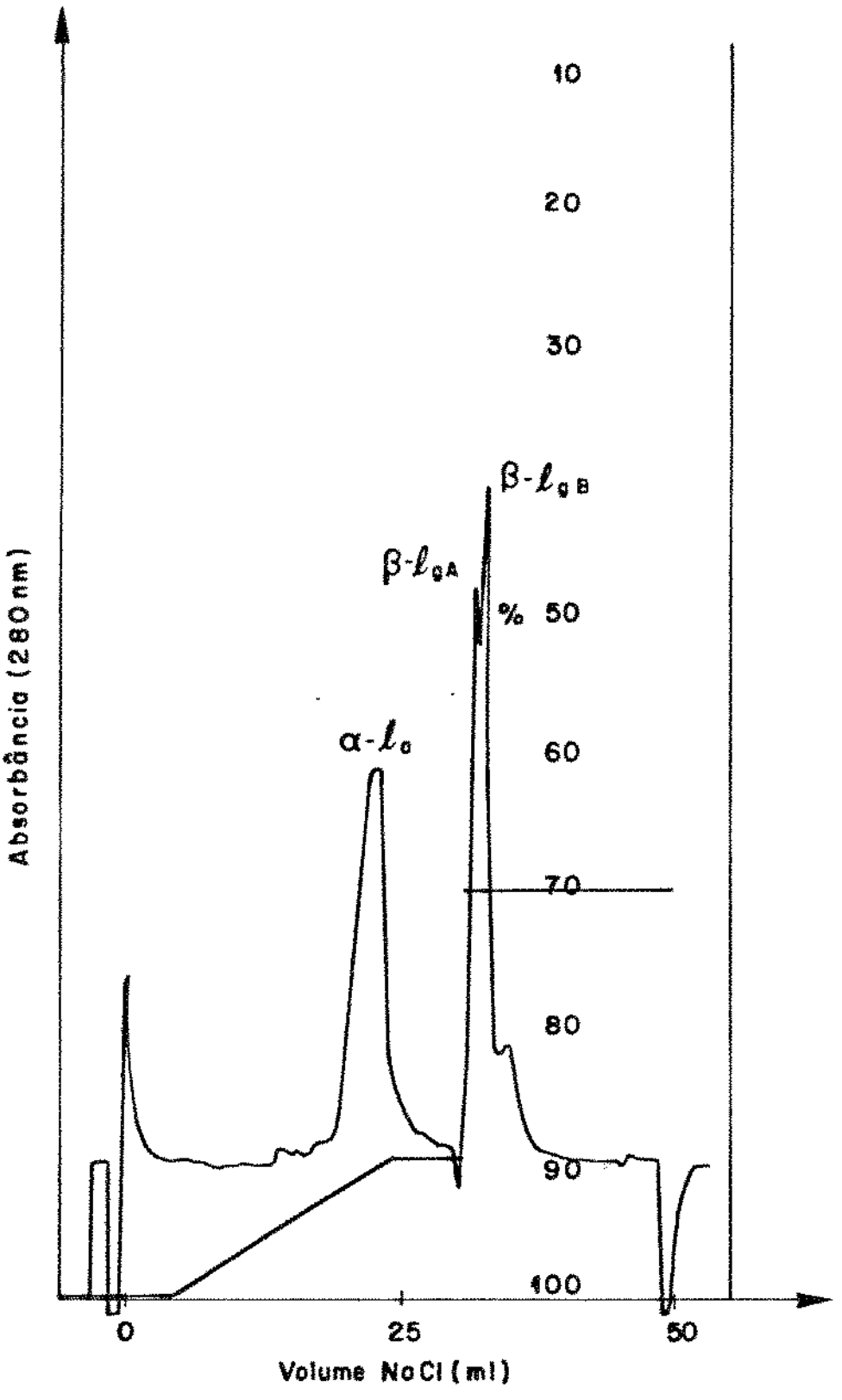

Figura 3.6. Cromatograma de uma amostra da fase salina do sistema 14% PEG-18% KP_i, pH 7. CLRP, coluna mono Q, fluxo 1,0 ml/min, pressão 1,5-2 MPa, solvente A: 0,01 M KP_i, solvente B: 0,01 M KP_i + 1 M NaCl

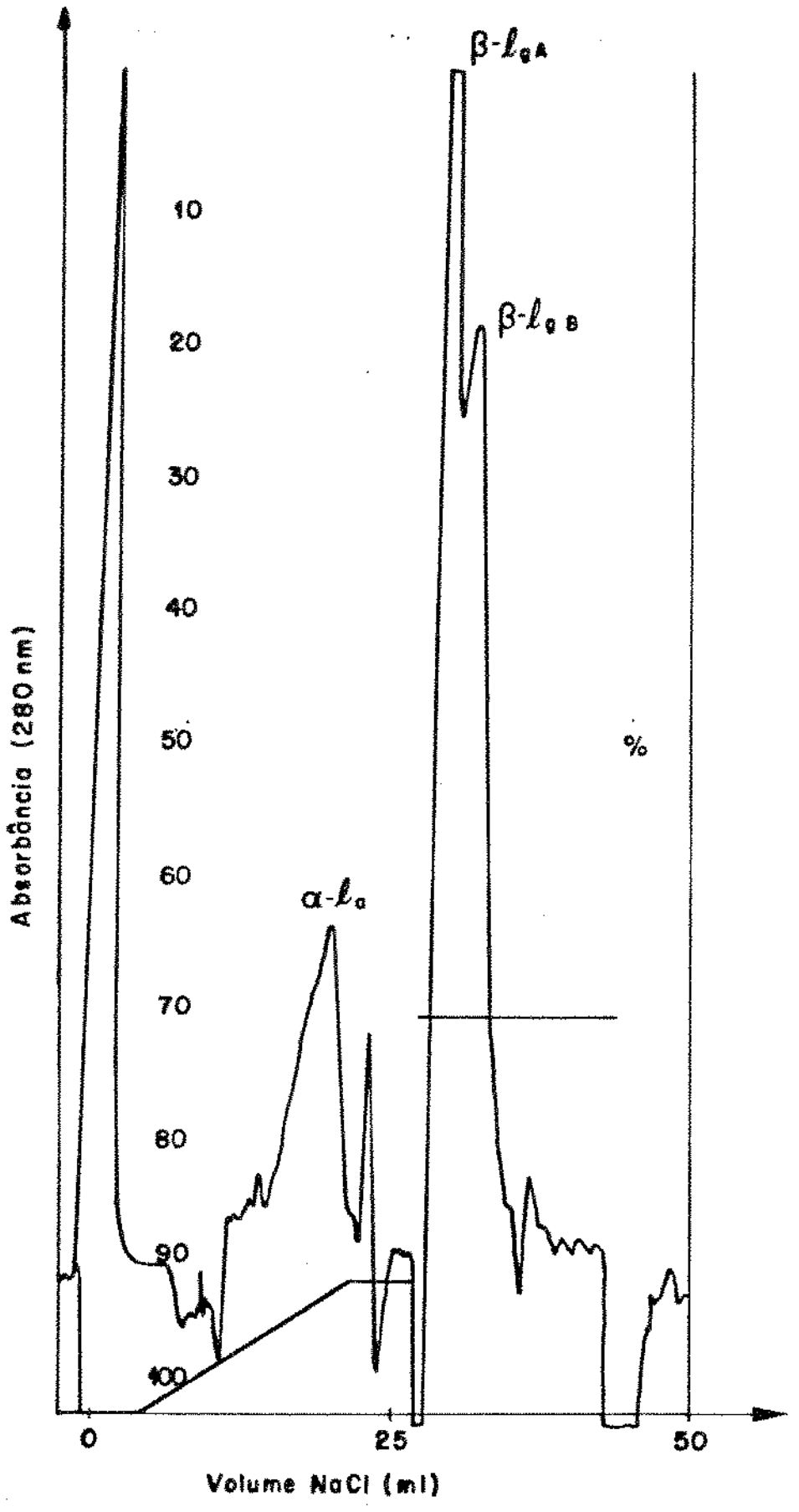

Figura 3.7. Cromatograma de uma amostra da fase polimérica do sistema 14% PEG-18% KP_i, pH 7. CLRP, coluna mono Q, fluxo 1,0 ml/min, pressão 1,5-2 MPa, solvente A: 0,01 M KP_i, solvente B: 0,01 M KP_i + 1 M NaCl

3.2.3. Propriedades Físicas

A Tabela 3.6 apresenta a viscosidade das fases, livres de biomassa, para o sistema 14% PEG-18% KP_i e para a fase salina com soro dissolvido. As Figuras 3.8, 3.9 e 3.10 mostram o comportamento newtoniano das fases polimérica, salina e salina com o soro dissolvido (permeado), já que a viscosidade não apresenta qualquer tendência de variação com a taxa de deformação, exceto aquelas flutuações decorrentes do erro experimental.

O que merece destaque nas propriedades físicas do sistema empregado é a elevada viscosidade da fase polimérica, incomum na maioria dos casos de extração líquido-líquido encontrados na literatura. Em particular, os poucos estudos existentes com o extrator Graesser empregam sistemas orgânicos usuais como querosene-n-butilamina-água, cujas viscosidades se encontram na faixa de $0{,}84 \times 10^{-3}$ Pa.s, para a fase aquosa, a $1{,}22 \times 10^{-3}$ Pa.s, para a fase orgânica (AL-HEMIRI & KAREEM, 1990). Esta diferença na viscosidade dos sistemas terá seu impacto no comportamento hidrodinâmico do extrator, como se verá posteriormente.

Apesar da pequena diferença de densidade entre as fases, 1×10^{-4} kg.m^{-3}, o tempo de decantação é relativamente curto. Por exemplo, durante a preparação de cerca de 150 litros de fases, para os experimentos em planta piloto (item 2.2.3. da Metodologia do desenvolvimento experimental), o tempo necessário para a completa separação dos líquidos foi aproximadamente de 15 min (Apêndice A2, Figura A2.1).

Tabela 3.6. Viscosidade das fases líquidas para o sistema estudado

Fase	Viscosidade (Pa.s)
polimérica	1.7×10^{-2}
salina	2.6×10^{-3}
salina com soro dissolvido (permeado)	4.2×10^{-3}

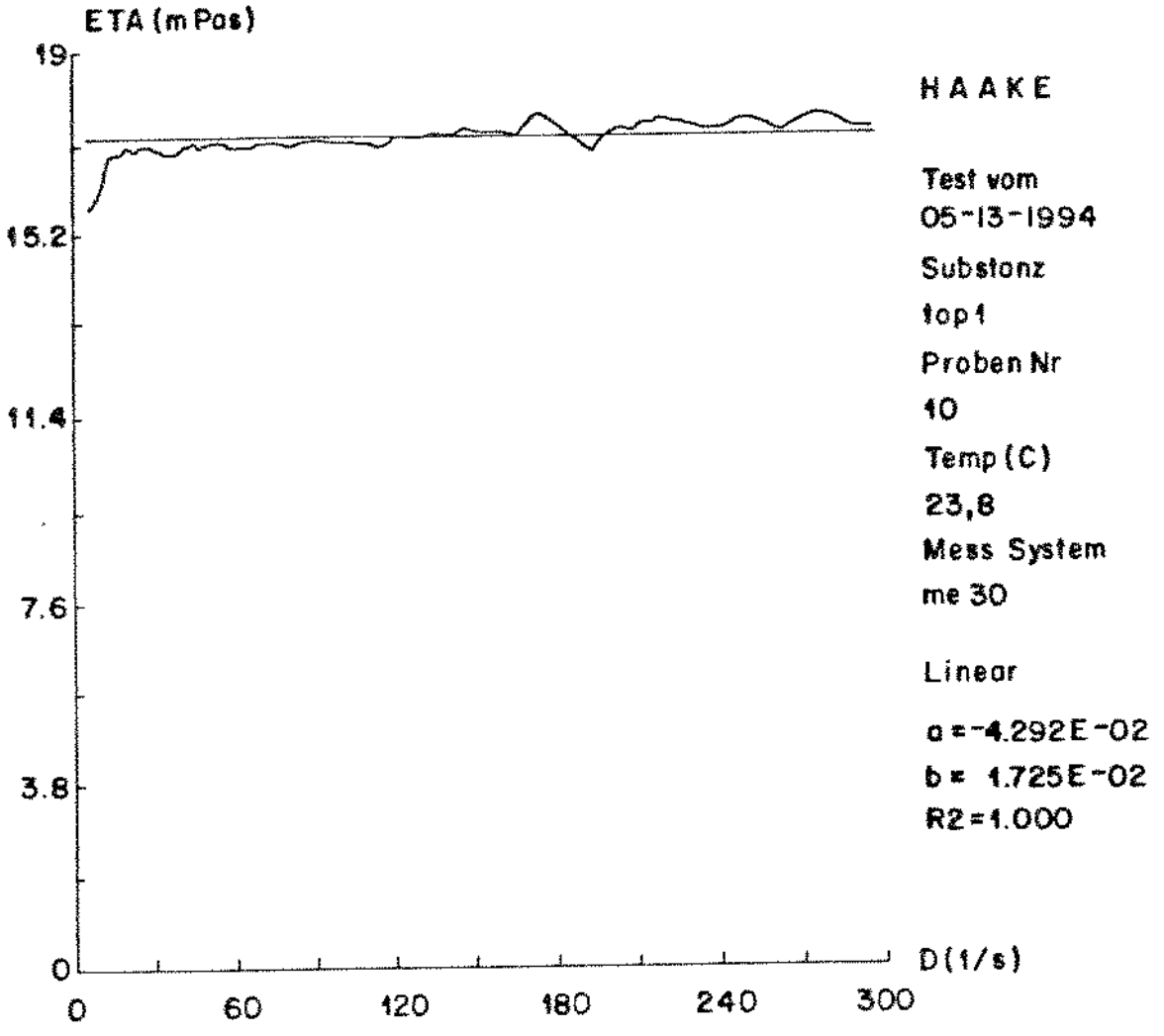

Figura 3.8. Viscosidade em função da taxa de deformação para a fase polímerica

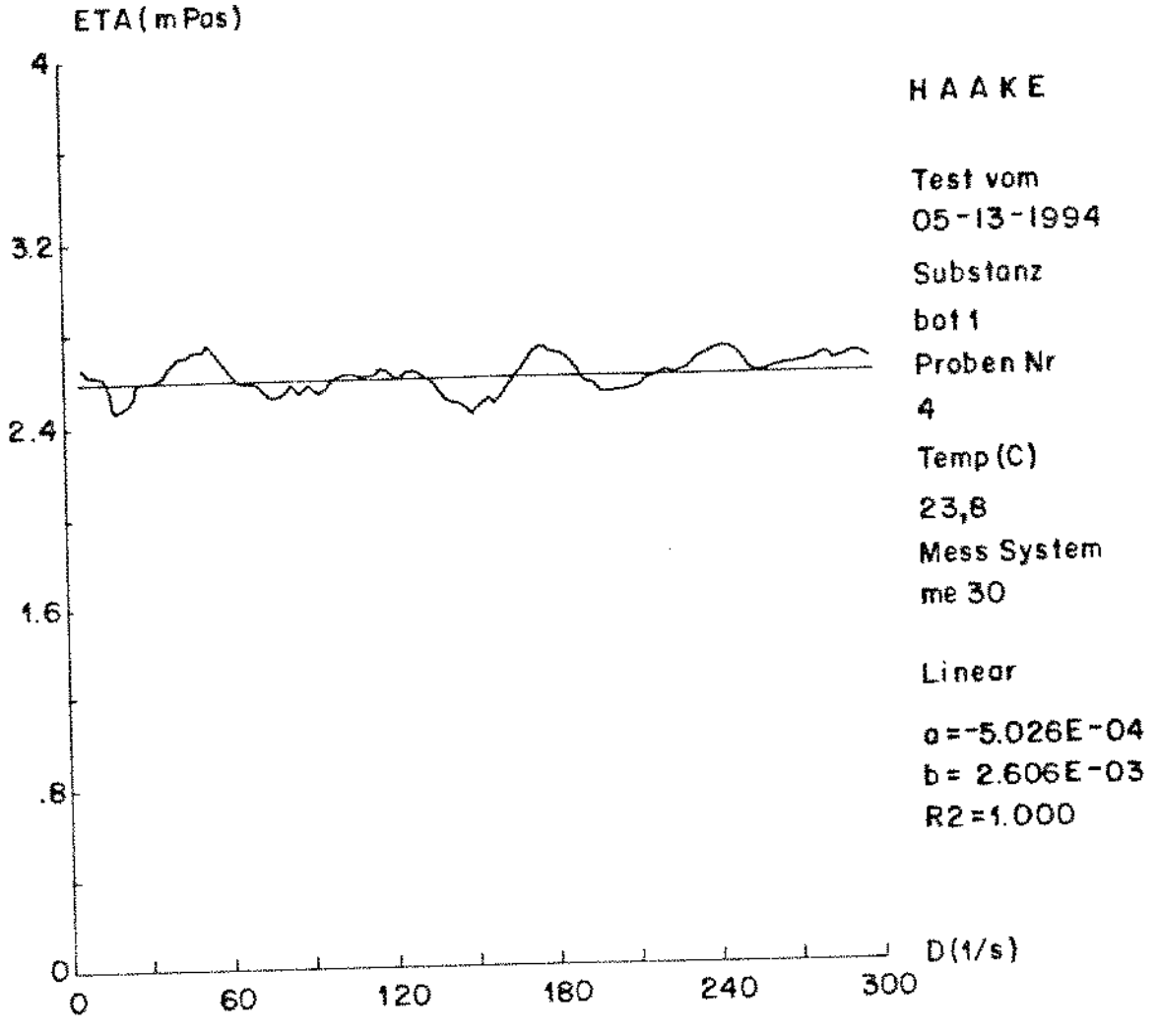

Figura 3.9. Viscosidade em função da taxa de deformação para a fase salina

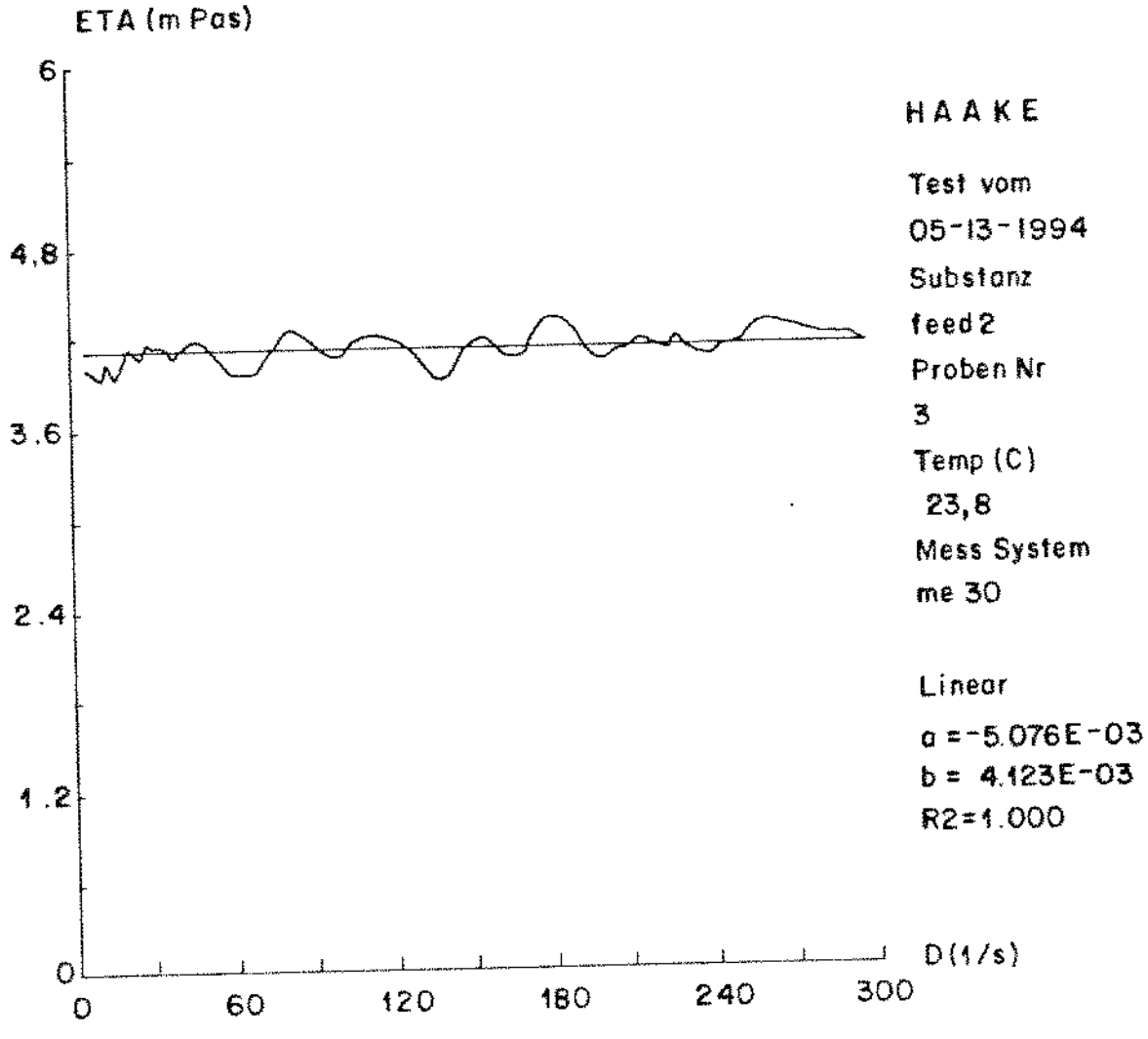

Figura 3.10. Viscosidade em função da taxa de deformação para a fase salina com o soro dissolvido

3.3. Caracterização Hidrodinâmica

A descrição do extrator em termos hidrodinâmicos foi feita com base nas medidas de distribuição de tempos de residência e de "hold up", sob condições preestabelecidas.

3.3.1. Distribuição de Tempos de Residência e Dispersão Axial

Considerando que a distribuição de tempos de residência do corante é influenciada por qualquer desvio da idealidade no que se refere ao fluxo dos líquidos, como misturas radial e retroativa, ocorrência de "bypass", bolsas estagnantes e volume morto, foram desenvolvidos modelos para descrição do comportamento do escoamento distante das condições ideais. De acordo com o item 1.4.1.1 (Revisão Bibliográfica), um destes é o modelo da difusão ou dispersão, que assume uma difusão retroativa turbulenta de soluto sobreposta ao fluxo tipo pistão, ou seja pressupõe escoamento ideal com considerações de mistura axial no equipamento. A mistura axial, ou retroativa, é quantificada pela determinação de um único parâmetro, o coeficiente de dispersão axial (D_X). Portanto em D_X estão concentradas todas as não idealidades do sistema previstas pelo modelo (STEINER *et alii*, 1988). Um aumento da mistura axial, que se reflete em D_x, provoca a redução na altura da unidade de transferência e o consequente aumento do comprimento da coluna quando comparado com o escoamento ideal. Assim, pode-se dizer que D_x tem efeito negativo sobre a qualidade da extração, diminuindo sua eficiência.

Um programa computacional, desenvolvido no "Institut für Biotechnologie", IBT/KFA, com base nas equações do modelo da dispersão (LEVENSPIEL, 1992) e nos dados experimentais de distribuição de tempos de residência, gerou o tempo de residência médio, a média, a variância e o número de Peclet. O número de Peclet foi usado para determinar os coeficientes de mistura axial. Através da variância das curvas foi avaliada a aplicabilidade do modelo da dispersão para o extrator em estudo.

As considerações inerentes ao modelo da dispersão e que serão abordadas na análise dos resultados de caracterização hidrodinâmica no extrator Graesser, são:

* representação da mistura retroativa pelo coeficiente de dispersão axial;

* constância da velocidade média e da concentração de cada fase em toda a seção transversal;

* constância do coeficiente de transferência de massa volumétrico, ou consideração de um valor médio;

* constância da miscibilidade parcial entre os líquidos, das vazões volumétricas e da carga do "solvente";

* difusão unicamente do soluto;

* relação de equilíbrio linear ou aproximadamente linearizável.

As equações diferenciais básicas em forma adimensional, que representam o modelo da dispersão, são (LEVENSPIEL, 1992):

$$\frac{dC}{d\theta} = \left(\frac{1}{Pe}\right)\frac{d^2C}{dz'^2} - \frac{dC}{dz'} \qquad (3.3)$$

com as variáveis adimensionais:

Pe = número de Peclet (UL/D_X)

C = concentração ($C_X=c_X/c_X^0$, $C_Y=c_Y/c_X^0$)

θ = tempo ($t/\bar{t}$)

z' = coordenada espacial (z/L)

onde

D_X = coeficiente de mistura axial ($m^2.s^{-1}$)

U = velocidade linear média ($m.s^{-1}$)

L = comprimento do extrator (m)

t = tempo determinado experimentalmente (s)

$\bar{t}$ = tempo médio de residência (s)

z = distância axial (m)

Considerando o sistema aberto como uma condição de contorno, a função resposta obtida tem a forma:

$$E_\theta = \frac{1}{2\sqrt{\pi\theta\left(\frac{1}{Pe}\right)}} \exp\left[-\frac{(1-\theta)^2}{4\theta\left(\frac{1}{Pe}\right)}\right] \tag{3.4}$$

com a média

$$\theta_c = 1 + 2\left(\frac{1}{Pe}\right) \tag{3.5}$$

e a variância

$$\sigma_\theta^2 = 2\left(\frac{1}{Pe}\right) + 8\left(\frac{1}{Pe}\right)^2 \tag{3.6}$$

3.3.1.1. Fase Polimérica

As concentrações do traçador medidas na saída da fase polimérica e aquelas calculadas com o programa computacional para o modelo da dispersão, descrito acima, foram representadas contra o tempo de residência para a avaliação da DTR. O modelo da dispersão foi aplicado, por regressão não-linear, e os resultados foram comparados com aqueles obtidos nos testes. O tempo médio de residência para cada experimento individual foi calculado com base nos dados normalizados e com a consideração de sistema aberto (LEVENSPIEL, 1992).

Os resultados foram então empregados para representar os valores de $E(\theta)$ contra o tempo adimensional, θ. Como exposto, o modelo da dispersão gera o número de Peclet, também conhecido como número de Bodenstein ou o inverso do número de dispersão, um adimensional que relaciona escoamento convectivo e difusional, contendo o coeficiente de mistura axial, D_X. D_X foi determinado de cada DTR e assim usado como uma medida da mistura axial em diferentes condições. A Figura 3.11 mostra um espectro de DTR depois da aplicação de um pulso de azul de cibacron na entrada da fase polimérica. Os valores determinados experimentalmente (pontos) foram ser bem reproduzidos com o modelo da dispersão (linha cheia), validando assim o uso dos resultados de DTR na representação das misturas axial e radial, calculadas pelo modelo da dispersão. Portanto o escoamento da fase polimérica pode ser considerado do tipo pistão com ocorrência de mistura axial e radial. Foram testados também o modelo de tanques em série, ao qual os dados obtidos no extrator não se ajustaram, e o modelo combinado com considerações de volume morto, que representou bem os dados experimentais, embora o ajuste tenha sido inferior ao do modelo da dispersão, conforme a Figura A2.2 do Apêndice A2.

Para caracterizar a mistura axial na fase rica em PEG foi examinada a influência da velocidade de agitação sobre D_X. Na Figura 3.12 representa-se D_X em função da

velocidade de agitação para os valores medidos experimentalmente. Como se observa, o coeficiente de mistura axial é praticamente independente da velocidade de agitação na faixa empregada. Baixas velocidades de agitação foram escolhidas por minimizarem as tensões de cisalhamento, que podem degradar compostos sensíveis, como proteínas lábeis.

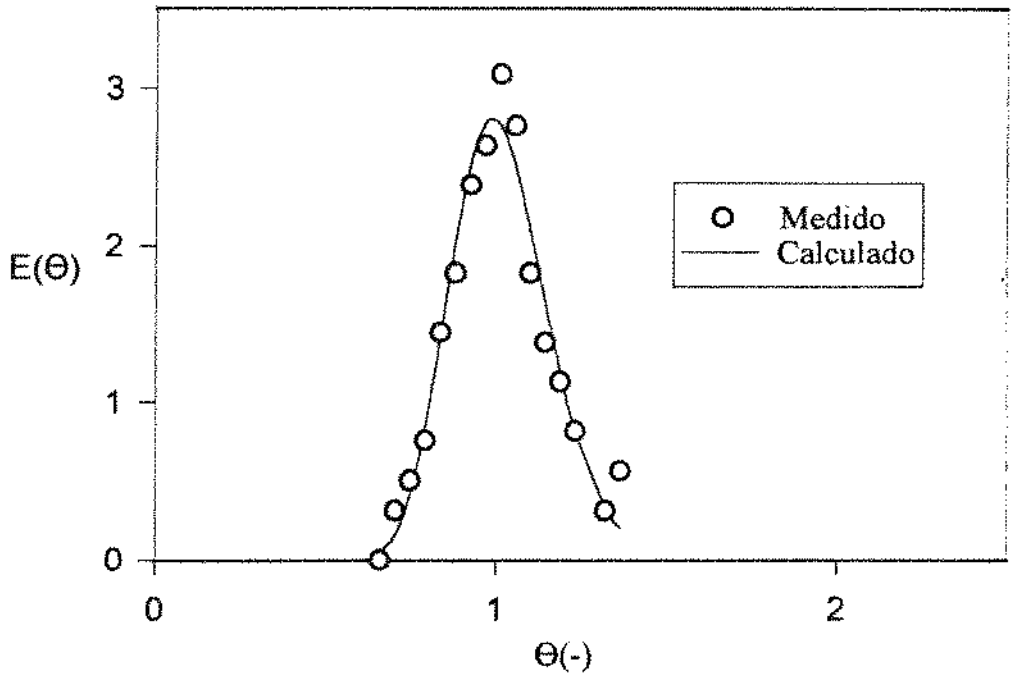

Figura 3.11. Distribuição de tempos de residência na fase polimérica, após a injeção de um pulso de azul de cibacron. $V_{fpolimérica}$ = 36 ml/min, $V_{fsalina}$ = 44 ml/min, 7 rpm

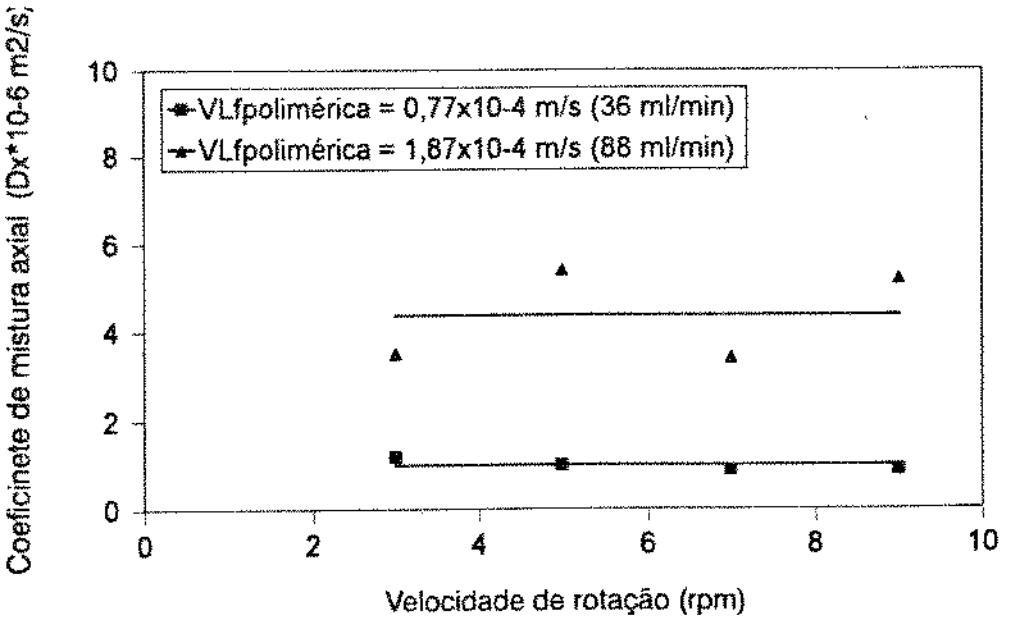

Figura 3.12. Influência da velocidade de rotação sobre a mistura axial na fase polimérica. Parâmetro: vazão da fase rica em PEG. $V_{fsalina}$ = 44 ml/min

A mistura axial também pode ser influenciada pela velocidade linear das duas fases ou pela relação entre as velocidades lineares das fases. Para analisar esta dependência, D_X foi medido como uma função da velocidade linear das fases polimérica e salina. Os experimentos foram realizados a diferentes velocidades de fase polimérica. Como mostrado na da Figura 3.12 maiores velocidades lineares da fase polimérica aumentaram o grau de mistura axial, expresso por maiores valores de D_X, sendo este coeficiente, de todo modo, independente da velocidade de agitação para velocidades lineares das fases constantes.

Um resultado importante obtido das medidas de DTR para a fase polimérica foi a constatação de que a taxa de escoamento da fase salina não influencia a DTR da fase polimérica. Fato observado após injetar um pulso de corante na fase rica em PEG, cuja vazão foi mantida fixa, em diferentes taxas de escoamento da fase salina. Como apresentado na Tabela 3.7, experimentos feitos sob mesmas condições de vazão e

diferentes velocidades de agitação, levaram a valores próximos do tempo de residência médio, indicativo de uma importante característica do equipamento, ou seja, a existência de duas fases escoando independentemente uma da outra e que se dispersam devido a ação da mistura suave. Na Figura 3.13 está demonstrado que a razão entre as velocidades lineares das fases, ou igualmente a vazão da fase salina, não influencia de forma apreciável o grau de mistura axial no extrator Graesser, já que a fase polimérica foi mantida constante. Apesar de certa flutuação dos valores, nota-se, que para as duas relações de vazão de fases, o coeficiente de dispersão axial mantém-se em uma mesma faixa. Novamente a independência de D_X com a velocidade do rotor é evidenciada.

Tabela 3.7. Tempo de residência médio (min) para a fase polimérica

$Vz_{fpolimérica}$	$Vz_{fsalina}$	Velocidade de rotação			
(ml/min)	(ml/min)	3 rpm	5 rpm	7 rpm	9 rpm
36	44	127	122	113	128
36	70	122	110	129	117
88	44	61	60	55	50

Vz_f = vazão da fase

Resumindo, para a fase polimérica pode ser constatada a independência da mistura axial com a velocidade de agitação e com a relação entre as velocidades lineares das fases. Mas não com a velocidade linear da fase polimérica, que isoladamente tem grande efeito sobre a mistura axial, levando ao estabelecimento de uma velocidade linear de fase limite, acima da qual a qualidade da extração é severamente diminuída.

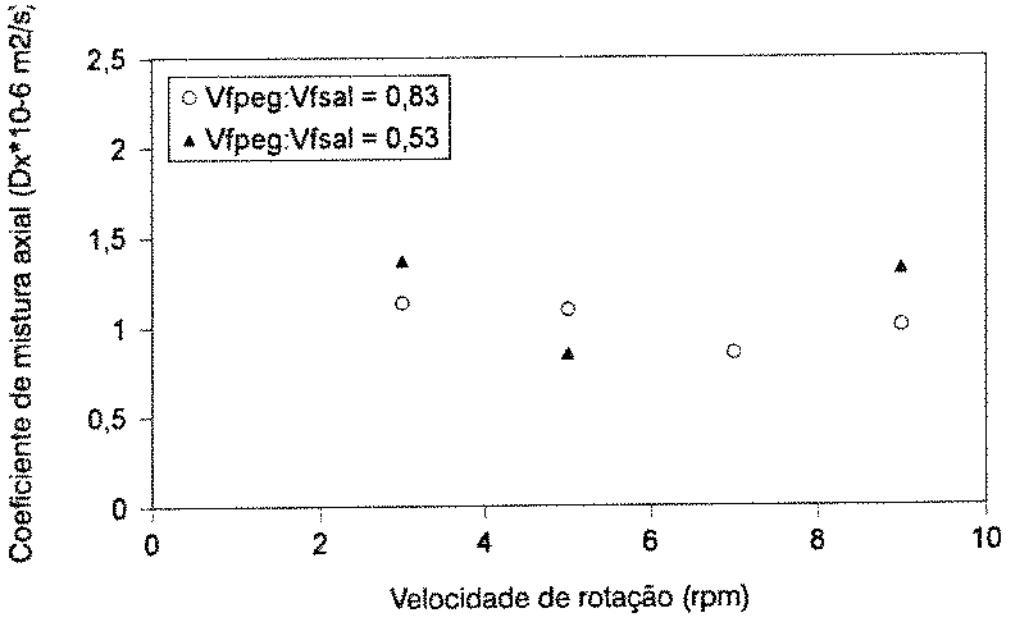

Figura 3.13. Influência da velocidade de rotação sobre a mistura axial na fase polimérica. Parâmetro: relação de fase (polimérica/salina). $V_{fpolimérica}$ = 36 ml/min

3.3.1.2. Fase Salina

A Figura 3.14 apresenta os valores para um teste típico de DTR na fase salina. Os pontos referem-se aos dados medidos experimentalmente e a linha cheia aos valores calculados pelo modelo da dispersão, o qual também previu adequadamente os resultados experimentais. Assim, para a fase salina o fluxo se comporta como sendo do tipo pistão com mistura axial associada. O que é uma justificativa para o uso dos dados de DTR para o cálculo do coeficiente da mistura axial na fase salina. As curvas obtidas para esta fase têm uma base mais largas do que às correspondentes na fase polimérica.

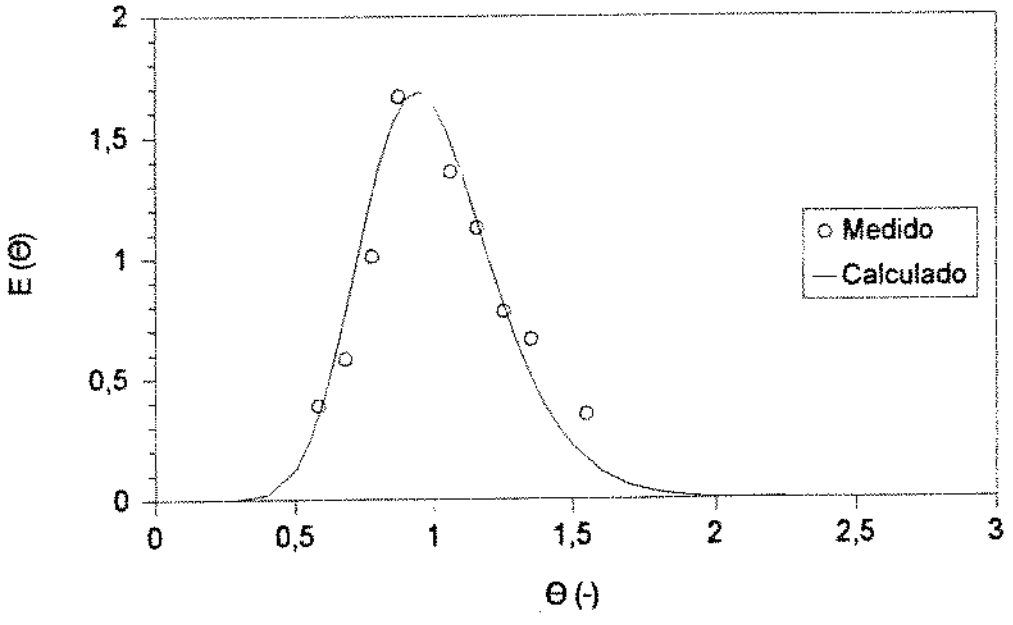

Figura 3.14. Distribuição de tempos de residência na fase salina, após a injeção de um pulso de azul de dextrana. $V_{fapolimérica}$= 88 ml/min, $V_{fsalina}$ = 70 ml/min, 3 rpm

Este comportamento é uma indicação de que as misturas axial e, provavelmente, a radial tenham um efeito mais significativo sobre a fase salina do que sobre a fase polimérica. Afirmativa que se confirma com a análise dos valores de D_X obtidos para a fase salina. Da Figura 3.15, observa-se que os valores de D_X para a fase salina são levemente maiores do que os da fase polimérica. D_X variou, para a fase rica em sal, de um mínimo próximo de $1{,}5 \times 10^{-6}$ até um máximo de quase 3×10^{-6} $m^2.s^{-1}$, e para a fase rica em PEG seus valores ficaram em torno de 1×10^{-6} $m^2.s^{-1}$.

A Figura 3.15 mostra a dependência suave da mistura axial com relação ao aumento da velocidade de agitação. Os pontos de máximo exibidos por cada curva mostram que existe uma região inapropriada para o trabalho, mas cuja faixa não é muito larga. Observa-se que maiores velocidades lineares da fase salina também levam a um

aumento do grau de mistura axial expresso por maiores valores de D_X. A mesma tendência foi percebida na fase polimérica. Os valores de D_X para a fase salina alertam para a conveniência de trabalho nas mais baixas e mais altas velocidades de agitação estudadas. Para a fase rica em PEG as grandezas obtidas mostraram a independência de D_X com a velocidade de rotação. É novamente enfatizado que a baixa faixa de velocidades estudada foi escolhida para evitar a desnaturação das proteínas.

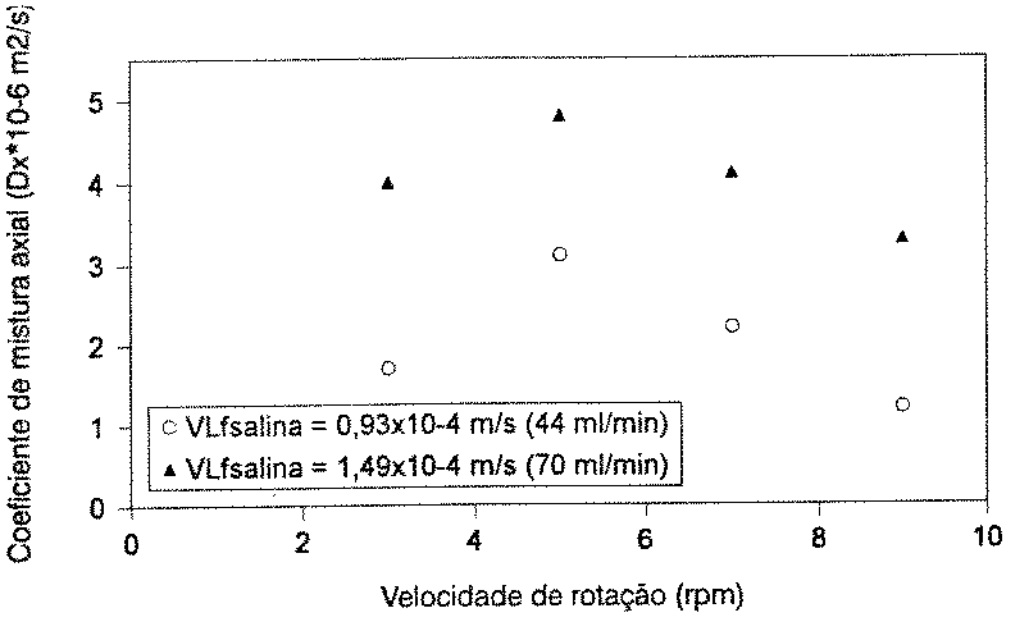

Figura 3.15. Influência da velocidade de rotação sobre a mistura axial na fase salina. Parâmetro: vazão da fase salina. $V_{fpolimérica} = 88$ ml/min

SHEIKH *et alii* (1972) e WANG *et alii* (1977) estudaram o comportamento hidrodinâmico de um extrator Graesser, empregando o sistema querosene-n-butilamina-água. Seus resultados mostraram que os valores de D_X situaram-se na ordem de grandeza de 10^{-5} para a fase aquosa e de 10^{-6} para a fase orgânica, indicando que a fase de maior viscosidade, querosene, exibia menores valores de D_X. Quando comparado com os autores acima citados, os dados deste trabalho encontraram-se na faixa de menores D_X e apresentaram a mesma tendência com relação à viscosidade das

fases, já que a maior viscosidade é apresentada pela fase polimérica. No entanto, o tipo de dependência dos coeficientes de mistura axial com a velocidade de rotação divergiu nas duas pesquisas. De acordo com SHEIKH *et alii* (1972) D_x aumentou com a velocidade de agitação para a fase aquosa, enquanto que para WANG *et alii* (1977) diminuiu com a velocidade de agitação para a fase orgânica. Os autores discutiram a considerável influência das propriedades físicas sobre a mistura axial e sugeriram o uso de baixas taxas de agitação e altas relações solvente/alimentação para se obter uma extração eficiente.

A Figura 3.16 mostra que a velocidade linear da fase polimérica tem influência mínima sobre os valores do coeficiente de mistura axial, D_X, da fase salina. O mesmo comportamento foi anteriormente constatado para a fase polimérica. Portanto, pode-se assumir a existência de duas fases escoando independentemente uma da outra, como já constatado na discussão anterior para o tempo de residência médio e para a mistura axial na fase polimérica. A Tabela 3.8 apresenta os resultados de tempo de residência médio para a fase salina. As fases se dispersam uma na outra provocando a queda e ascensão das gotas em direções opostas. Pode-se assumir que sejam dois líquidos contínuos se dispersando mutuamente. A suavidade da mistura evita a formação de emulsões, comuns em sistemas com baixa tensão interfacial e pequena diferença de densidade, que retardariam e dificultariam a separação das fases.

Tabela 3.8. Tempo de residência médio (min) para a fase salina

$Vz_{fpolimérica}$	$Vz_{fsalina}$	Velocidade de rotação			
(ml/min)	(ml/min)	3 rpm	5 rpm	7 rpm	9 rpm
36	70	61	46	42	41
88	70	52	57	53	51
88	44	99	84	89	95

Vz_f = vazão da fase

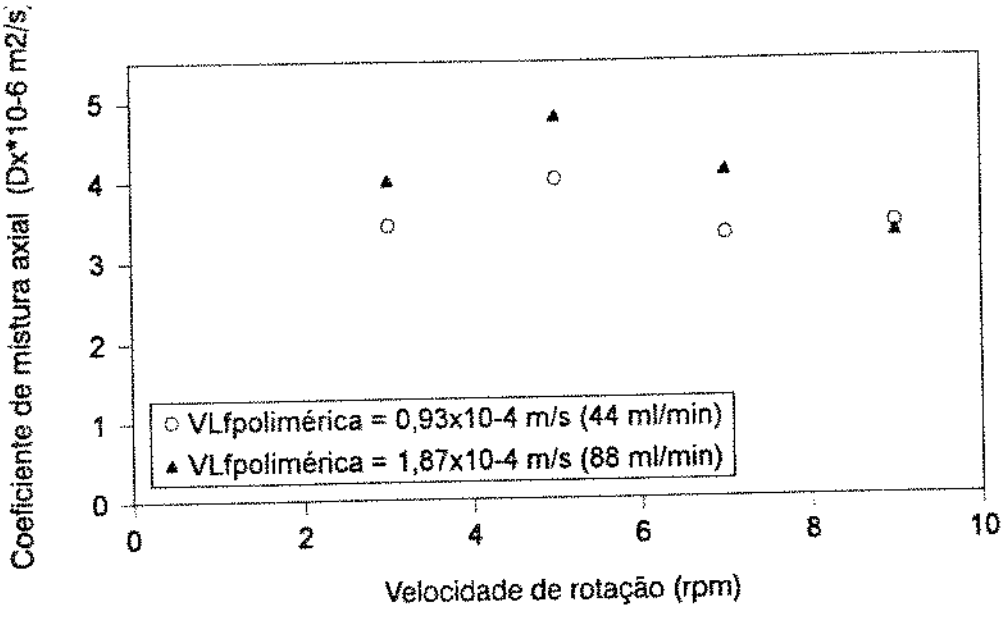

Figura 3.16. Influência da velocidade de rotação sobre a mistura axial na fase salina. Parâmetro: vazão da fase polimérica. $V_{fsalina}$ = 70ml/min

3.3.2. Fração Retida da Fase Polimérica

Outro parâmetro importante para a caracterização hidrodinâmica do extrator é a fração retida de uma das fases, que está disponível para a transferência de massa dentro do equipamento, ou seja, o "hold up". Neste trabalho, o "hold up" se refere à fração retida da fase rica em PEG. Significa portanto o percentual da fase polimérica presente no equipamento capaz de extrair α-la da mistura de proteínas contida na fase salina, oriunda da dissolução do soro de queijo em pó. Pode ser uma medida feita em um determinado ponto do equipamento, "hold up" local, ou em toda a unidade, "hold up" médio. Tais medidas de "hold up" são informações valiosas para a estimativa da qualidade da transferência de massa de uma unidade de extração sob condições predefinidas.

Após ter sido atingido o estado estacionário, ou seja após três tempos de residência para a fase polimérica, em uma condição de operação preestabelecida, foi determinado o "hold up" da fase rica em PEG pelo método do estancamento rápido. Este método leva a medidas de "hold up" médio, calculado por:

$$H_d = V / V_t \qquad (3.7)$$

onde

Hd = "hold up", (adimensional)

V = volume da fase polimérica (m^3)

V_t = volume total (m^3)

O desempenho de uma unidade de extração em processo contínuo é altamente dependente da quantidade de solvente que está presente no equipamento para remover o soluto da alimentação. Altas relações solvente/alimentação tendem a formar gradientes de concentração favoráveis à transferência do soluto na direção da alimentação para o "solvente". No caso analisado, foi observada a influência das razões de velocidade das fases e da rotação sobre o "hold up" da fase polimérica. A Figura 3.17 mostra a independência do "hold up" da fase polimérica tanto em relação à velocidade de rotação quanto em relação à razão de velocidades das fases. Assim, a capacidade e desempenho do extrator não foram reduzidos pela operação em baixas velocidades de agitação, o que leva a condições de mistura favoráveis para produtos lábeis, como proteínas.

O "hold up" é um parâmetro, peculiar de um processo de extração, que depende do equipamento selecionado, das condições operacionais empregadas e das propriedades físicas das fases. Neste sentido, o primeiro aspecto que merece destaque é a diferença entre equipamentos horizontais, do tipo do extrator Graesser, e as colunas verticais. Nestas últimas, o aumento do "hold up" com a relação de vazões é um comportamento

característico. Para o extrator Graesser, no entanto, o controle externo da interface predetermina que a separação de fases seja fixada na linha equatorial do equipamento, estabelecendo desta forma uma faixa bem estreita para a variação do "hold up" médio. Por isso, mesmo modificando as relações de velocidades ou, então, a soma das vazões, os valores de "hold up" ficam sempre restritos a uma pequena faixa.

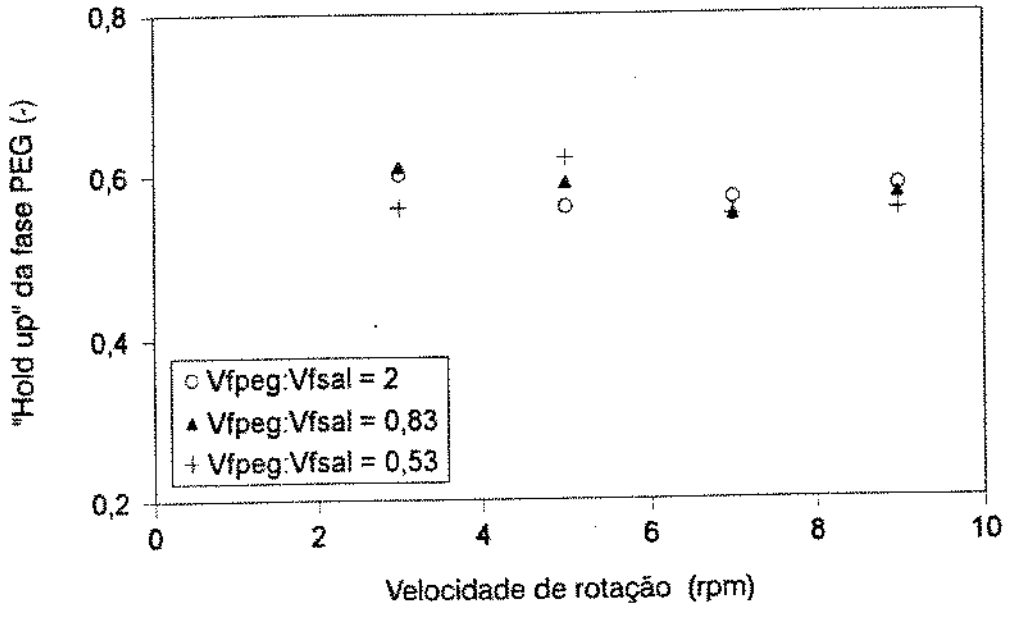

Figura 3.17. Dependência do "hold up" com a velocidade de rotação. Parâmetro: relações de fase (polimérica/salina)

SHEIKH *et alii* (1972) e WANG *et alii* (1977) relataram os mesmos resultados aqui obtidos, no que se refere à influência da velocidade de agitação sobre o "hold up". No entanto, ao contrário dos resultados aqui apresentados, estes autores observaram um aumento do 'hold up' com as relações de vazões. É provável que esta diferença derive das propriedades físicas particulares de cada sistema, dos sistemas orgânicos de extração convencional (querosene-n-butilamina-água) e de SAB (polietileno glicol-fosfato de potássio-água). Os SAB apresentam baixa tensão interfacial e elevada viscosidade. Pode-se, assim, esperar algumas diferenças entre o comportamento

hidrodinâmico dos SAB e dos sistemas de extração tradicionais, água-solvente. Mas, apesar desses desacordos, as características hidrodinâmicas especiais do extrator Graesser o adequam satisfatoriamente para operar com SAB, permitindo o emprego de sistemas com baixa diferença de densidade e baixa tensão interfacial.

A Figura 3.18 mostra que com as medidas de "hold up" local, no centro do equipamento nas regiões superior e inferior junto às paredes do extrator, a metade superior do extrator foi predominantemente preenchida com a fase polimérica (Hd entre 96 e 98%) e a metade inferior com a fase salina (Hd entre 2 e 3%). Da Figura 3.18 observa-se também a independência do "hold up" da fase polimérica com a velocidade de rotação. Este comportamento vem reforçar a afirmativa da existência de duas fases escoando independentemente no extrator.

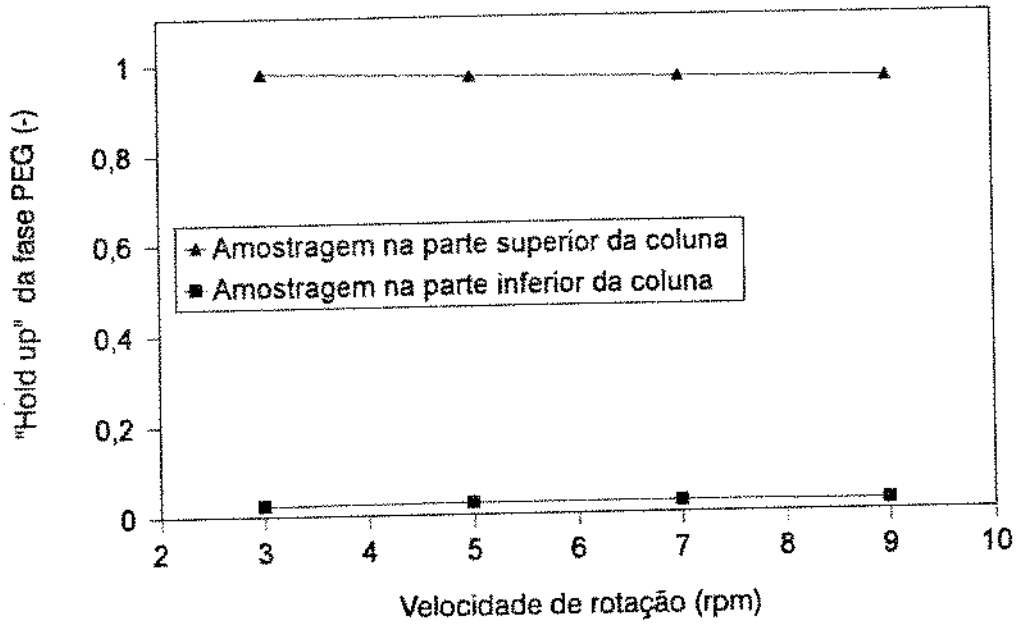

Figura 3.18. Dependência do "hold up" com a velocidade de rotação. Amostragens das fases salina e polimérica no centro do extrator. $V_{fpolimérica}$ = 36 ml/min, $V_{fsalina}$ = 70 ml/min

Por fim procurou-se determinar o "hold up" local no ponto de amostragem no centro longitudinal do extrator em três posições, ou seja, imediatamente acima e abaixo da linha da interface e no centro radial da unidade, isto é, na região da interface. Estes dados infelizmente não puderam ser empregados para uma avaliação detalhada do comportamento local do "hold up", por ser uma região de alta imprecisão de medida. A agitação não permitiu fazer uma amostragem adequada em nenhuma das três posições acima citadas, pois a mangueira usada para drenar a amostra oscilava muito no meio líquido. Apesar desta imprecisão, é mostrado na Figura A2.3, do Apêndice A2, uma parcela dos resultados obtidos no centro radial do equipamento. Observa-se a redução do "hold up" com o aumento da velocidade de agitação e uma leve tendência de crescimento do "hold up" com a relação de vazão entre as fases.

3.4. Transferência de Massa

Os resultados promissores dos testes de caracterização hidrodinâmica no extrator Graesser incentivaram a continuação dos estudos no equipamento com sistemas reais. O caso escolhido foi a separação de α-la e β-lg do soro de queijo com o sistema 14% PEG 1550- 18% fosfato de potássio, pH 7.

Para interpretar os dados de extração foi selecionada uma aproximação teórica do modelo da difusão (MIYAUCHI & VERMEULEN, 1963; MOON *et alii*, 1963) que inclui o efeito da mistura axial sobre a avaliação de desempenho de operações de colunas em contracorrente. Como no caso do modelo da dispersão para distribuição de tempos de residência, o coeficiente de dispersão axial, que descreve a mistura axial, é análogo a uma difusividade efetiva. É também o resultado de duas contribuições, sendo a primeira delas a turbulência associada com a difusão na direção axial e, a segunda, a difusão de Taylor, que é devida a uma mistura radial causada por um perfil

de velocidade não uniforme. Ambos os tipos de difusão provocam uma diminuição nos gradientes de concentração, a força motriz para a transferência de massa, reduzindo a eficiência e portanto o número de estágios teóricos.

A opção pelo modelo da difusão é apropriada para o extrator Graesser, posto que as duas fases podem ser consideradas como contínuas. Convém recordar que o modelo da dispersão, usado na descrição do comportamento hidrodinâmico do extrator, tem a mesma origem que o da difusão, sendo igualmente capaz de representar satisfatoriamente o comportamento das curvas de distribuição de tempos de residência no extrator.

No modelo da difusão assume-se que um fluxo difusional turbulento é adicionado ao escoamento tipo pistão. A dispersão axial do soluto em cada fase é considerada separadamente. Assume-se também que todos os desvios do escoamento tipo pistão nas fases estão concentrados em um único parâmetro, o coeficiente de dispersão axial, incluso no número de Peclet, Pe. As equações de balanço levam a uma equação diferencial, que pode ser resolvida com dados de concentrações locais ou de saída das fases, propriedades físicas e vazões. A eficiência de extração é dependente tanto do número de unidades de transferência quanto do número de Peclet, que é uma medida quantitativa da influência da mistura axial no desempenho do extrator.

As equações para o modelo da difusão, em forma adimensional, foram obtidas a partir do balanço de massa em uma altura diferencial do extrator. Para a fase X (MOON *et alii*, 1963):

$$\frac{d^2C_x}{dZ^2} - \frac{Pe_x B dC_x}{dZ} - N_{ox} Pe_x B\left[C_x - \left(Q + mC_y\right)\right] = 0 \qquad (3.8)$$

e para a fase Y

$$\frac{d^2C_y}{dZ^2} + \frac{Pe_y B dC_y}{dZ} + N_{oy} Pe_y B\left[C_x - \left(Q + mC_y\right)\right] = 0 \qquad (3.9)$$

As equações (3.10) e (3.11), dadas abaixo, definem as condições de contorno necessárias para solucionar as equações (3.8) e (3.9). Z = 0 significa a posição axial na entrada da alimentação e Z =1 a posição axial na saída da alimentação. Os subscritos 0 e 1 representam a posição Z dentro do extrator. Os sobrescritos 0 e 1 representam as concentrações do soluto nas correntes de entrada e saída, respectivamente.

em Z = 0,

$$\begin{cases} -\dfrac{dC_x}{dZ} = Pe_x B\left(1 - C_{x0}\right) \\ -\dfrac{dC_y}{dZ} = 0 \end{cases} \qquad (3.10)$$

em Z = 1,

$$\begin{cases} -\dfrac{dC_x}{dZ} = 0 \\ -\dfrac{dC_y}{dZ} = Pe_y\left(C_{y1} - C_y^1\right) \end{cases} \qquad (3.11)$$

com os adimensionais

B = comprimento adimensional (h/L)

C = concentração ($C_x = c_x/c_x^0$, $C_y = c_y/c_x^0$)

m = coeficiente de distribuição do soluto

Pe = número de Peclet (UL/D_x)

No = número de unidades de transferência global (NTU)

Q = interseção na curva de equilíbrio ($C_x^* = Q + mC_y$)

Z = fração de comprimento na coluna (z/L)

onde

c = concentração do soluto ($kg.m^{-3}$)

D_X = coeficiente de mistura axial ($m^2.s^{-1}$)

h = largura do compartimento do extrator (L/ número de compartimentos, m)

L = comprimento do extrator (m)

U = velocidade linear média ($m.s^{-1}$)

z = distancia axial, medida da entrada da fase X na direção do escoamento (m)

Os subscritos x, y representam as fases X e Y. O sobrescrito * significa equilíbrio.

Soluções para as equações (3.8) e (3.9) foram derivadas por MIYAUCHI & VERMEULEN (1963). Dentre elas, a selecionada para ser usada neste trabalho é aquela baseada em sucessivas iterações do NTU verdadeiro (Nox), usando valores experimentais X_1, Pe_xB e Pe_yB. X_1 é a concentração generalizada de soluto, adimensional, na fase X, dada pela equação (3.12) na saída do extrator:

$$X_1 = \frac{C_{x1} - \left(Q - mC_y^1\right)}{1 - \left(Q - mC_y^1\right)} \qquad (3.12)$$

Neste procedimento é necessário uma definição para o NTU aparente (Noxp). Assumindo fluxo pistão, obtém-se (TREYBAL, 1980):

$$N_{oxp} = \frac{1}{1-\lambda}\left[X_1(1-\lambda)+\lambda\right] \qquad (3.13)$$

com λ= fator de extração (U_x/mU_y, adimensional) e o subscrito p = tipo pistão ideal.

O NTU verdadeiro está relacionado com o aparente pela equação (3.14):

$$\frac{1}{N_{oxp}} - \frac{1}{N_{ox}} = \frac{1}{N_{oxd}} \tag{3.14}$$

onde Noxd é o número de unidades de dispersão global, uma função de λ, Pe_xB e Pe_yB. Para $\lambda \neq 1$,

$$N_{oxd} = \frac{\ln \lambda}{\lambda - 1}\Phi + (PB)_y \tag{3.15}$$

com Φ igual a um fator de correlação adimensional, dado por:

$$\Phi = 1 - \frac{0{,}05}{\lambda^{0,5} N_{ox}^{0,5} (PB)_y^{0,25}} \tag{3.16}$$

$(PB)_y$ é fornecido pela equação (3.17) abaixo:

$$(PB)_y = \left(\frac{\lambda}{f_x Pe_x B} + \frac{1}{f_y Pe_y B} \right)^{-1} \tag{3.17}$$

onde f_x e f_y são fatores de peso adimensionais segundo as equações (3.18) e (3.19):

$$f_x = \frac{N_{ox} + \kappa N_{ox}^{2\alpha} \lambda^{-0,5-\alpha}}{N_{ox} + \kappa N_{ox}^{2\alpha} \lambda^{-1,5-\alpha}} \tag{3.18}$$

$$f_y = \frac{N_{ox} + \kappa N_{ox}^{2\alpha} \lambda^{-0,5-\alpha}}{N_{ox} + \kappa N_{ox}^{2\alpha} \lambda^{0,5-\alpha}} \tag{3.19}$$

sendo α um expoente ajustável e κ um coeficiente numérico. MOON *et alii* (1963) obtiveram para uma coluna de extração pulsada os valores 0,0 e 6,8 para α e κ, respectivamente. SHEIKH *et alii* (1972) e WANG *et alii* (1977) extenderam esta aproximação para o extrator Graesser, empregando os mesmos valores para os parâmetros α e κ. Esta consideração foi mantida neste trabalho.

O número de Peclet para as duas fases foi calculado tomando por base os experimentos de distribuição de tempos de residência e a α-la foi selecionada como o componente chave. Assim sendo, o número de unidades de transferência foi calculado a partir dos dados de extração da α-la, sob a consideração de independência entre as concentrações de α-la e β-lg.

3.4.1. Separação Contínua de Proteínas do Soro de Queijo

Foram testadas as duas direções de transferência, tanto a da fase polimérica para a fase salina (topo para fundo) quanto a da fase salina para a fase polimérica (fundo para topo). No primeiro caso verificou-se a impossibilidade do uso da condição pelo fato da maior parte da α-lactoalbumina, presente na solução formada por soro-fase rica em PEG, ficar retida na torta da filtração. Também foi verificada a ocorrência de separação de fases no permeado. Por estes motivos todos os experimentos foram feitos com a direção de transferência de solutos da fase salina para a polimérica. A concentração da alimentação foi de 15% p/p de soro dissolvido na fase salina. Outras concentrações de soro na fase salina, 7% e 10%, foram igualmente testadas, mas as proteínas não foram detectadas pela técnica analítica, por CLRP.

A Figura 3.19 mostra a permanência da β-lg na fase salina e a independência velocidade de rotação na extração de β-lg. Praticamente toda β-lg ficou na fase salina,

levando a uma boa separação da β-lg com o sistema pesquisado. Este comportamento permite o tratamento desta proteínas como um componente que não se transfere, o que foi verificado nos experimentos de transferência de massa realizados, conforme as Tabelas A8 e A9 do Apêndice A1.

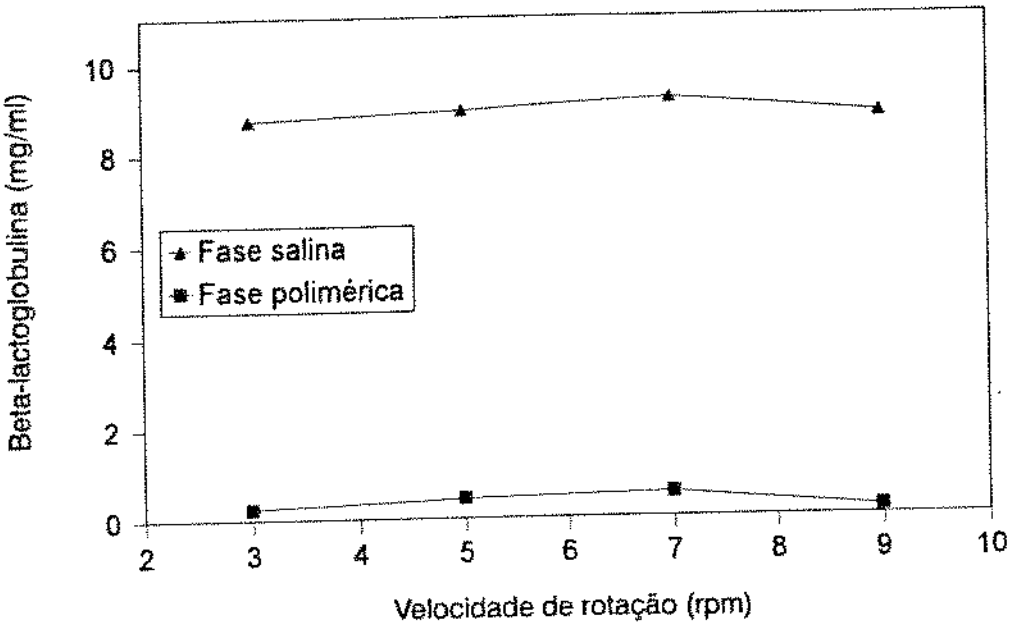

Figura 3.19. Distribuição de β-lactoglobulina entre as fases polimérica e salina. $V_{fpolimérica} = 88$ ml/min, $V_{fsalina} = 44$ ml/min

Em um segundo conjunto de experimentos, duas relações de fases foram empregadas para mostrar o efeito do aumento da relação PEG/sal sobre a separação. Para a β-lg a extração não é influenciada pelo aumento da razão PEG/sal. Mas para a α-la existe uma diferença significativa entre as duas condições. Como pode ser observado na Figura 3.20, com a razão de vazões V_{PEG}/V_{sal} menor que 1, tem-se um maior enriquecimento da α-la na fase polimérica. Apesar da velocidade de rotação não apresentar uma grande influência sobre a partição de α-la, verifica-se que altas rotações podem levar a desnaturação da proteína. Afirmativa que se justifica pelo fato

do balanço de massa, para a α-la, apresentar erros superiores a 10%, valor previamente estabelecido como limite de erro. O mesmo não ocorreu para a β-lg no mesmo experimento, e portanto nas mesmas condições operacionais, cujo balanço apresentou erros inferiores a 10%. Assim uma explicação para tal comportamento é a desnaturação da α-la com o aumento da velocidade de agitação. Adicionalmente, é importante notar a existência de uma significativa extração de α-la na fase superior, fazendo desta técnica uma ferramenta adequada para a separação das proteínas do soro. Para altas relações PEG/sal, a partição é favorável em toda a faixa de velocidade estudada, mas para baixas relações PEG/sal existe uma considerável extração somente na região de baixa velocidade de rotação.

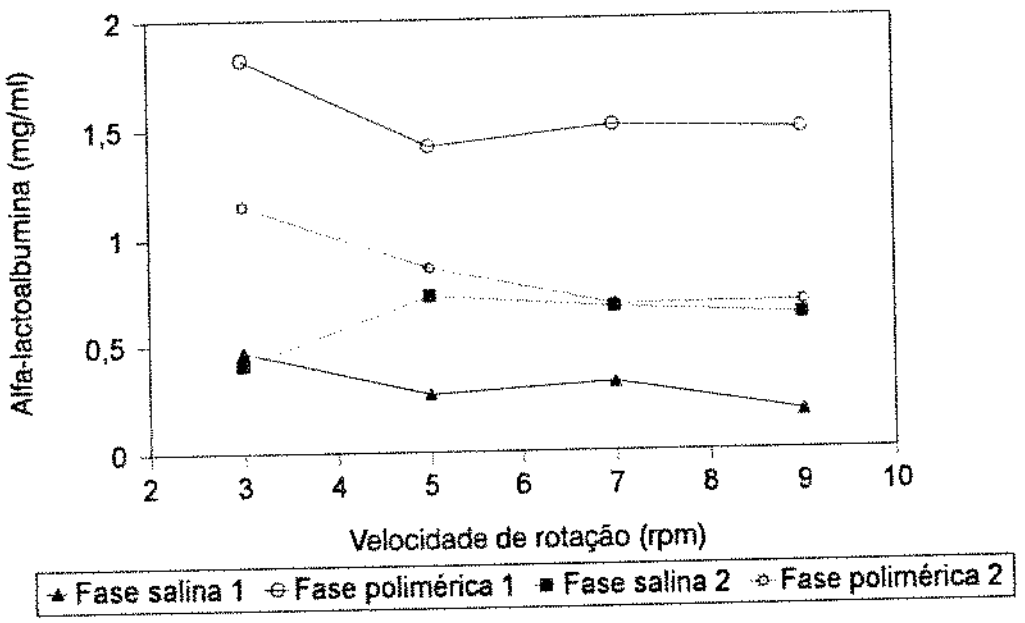

Figura 3.20. Distribuição de α-lactoalbumina entre as fases polimérica e salina. Parâmetro: relação de fase (polimérica/salina). 1: $V_{fpolimérica}$ = 36 ml/min e $V_{fsalina}$ = 44 ml/min. 2: $V_{fpolimérica}$ = 88 ml/min e $V_{fsalina}$ = 70 ml/min

A análise da concentração de β-lg na fase rica em PEG forneceu sempre um valor menor que 0,5 g/l, indicando que esta proteína praticamente não se transfere, permanecendo na fase salina. Por outro lado foi verificado um apreciável enriquecimento da α-la na fase polimérica. Por esta razão os cálculos de transferência de massa tiveram por base exclusivamente a concentração do soluto α-la.

Os resultados para os experimentos de transferência de massa em estado estacionário foram discutidos empregando-se números de Peclet para cada fase, como derivados dos experimentos de DTR, para a determinação do número de unidades de transferência de massa.

A Figura 3.21 mostra que os valores de N_{ox}/N_{oxp} exibem quase que uma independência da velocidade de rotação e que a razão N_{ox}/N_{oxp} variou, geralmente, na faixa de 1,2 a 1,5 para baixas relações PEG/sal e, na faixa de 1,5 a 2,2 para altas relações PEG/sal. Portanto, o comportamento do equipamento para a razão PEG/sal na proporção 0,8:1 levou a um aumento do comprimento do extrator por um fator de 20 a 50% quando comparado com aquele requerido para as condições ideais de fluxo pistão. Já para a relação PEG/sal igual a 2:1, o aumento no comprimento do extrator oscilou entre 50 e 120%. Nesta condição, a elevação da relação de fases (polimérica/salina) tem um considerável efeito negativo sobre a razão N_{ox}/N_{oxp} exceto para 3 rpm.

Com base nestes resultados é recomendável a operação do extrator em baixas velocidades de rotação e com baixas relações PEG/sal, o que garantirá a boa separação das proteínas. É também importante enfatizar que a extração de α-la foi satisfatória em 3 rpm e na relação PEG/sal de 0,8:1.

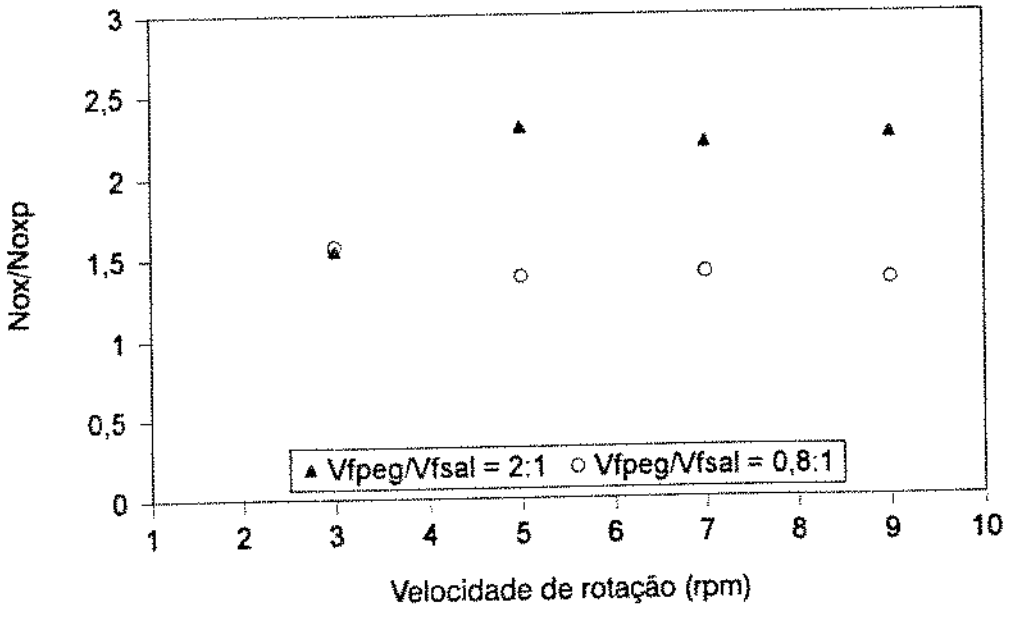

Figura 3.21. Relação entre o número de unidades de transferência considerando escoamento com mistura axial (Nox) e comportamento ideal do tipo pistão (Noxp)

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo inicial do trabalho foi verificar o comportamento de sistemas aquosos bifásicos na recuperação de biomoléculas em um extrator líquido-líquido diferencial, operado continuamente em modo contracorrente, já que a operação em batelada encontra-se bem definida (KULA *et alii*, 1982). Devido às características de baixa tensão interfacial ($1x10^{-4}$ a $1x10^{-3}$ $N.m^{-1}$ para os sistemas PEG-sal e $1x10^{-7}$ a $1x10^{-6}$ $N.m^{-1}$ para os sistemas PEG-dextrana), de pequena diferença de densidade dos SAB e da faixa de aplicabilidade do extrator Graesser, que foi desenvolvido para tratar sistemas de extração convencional com as mesmas peculiaridades acima citadas, optou-se pelo estudo dos SAB neste tipo de equipamento.

Os bons resultados encontrados na caracterização hidrodinâmica do extrator com os referidos sistemas incentivaram o estudo da transferência de massa com sistemas reais na unidade Graesser. Para tanto foi escolhida para teste a separação de proteínas do soro de queijo com SAB. Esta opção foi motivada pelo fato do soro possuir um alto conteúdo de proteínas disponível, especialmente α-la e β-lg, que têm elevado valor nutricional e funcional. São portanto uma fonte potencial para uso como suplemento alimentar na dieta humana.

Uma área de interesse dentro desse segmento relaciona-se com a alimentação infantil, de gestantes e de pacientes que necessitem da administração de alimentos por via parenteral. De acordo com a Tabela 1.1 (Revisão de Literatura), a constituição do leite bovino e do leite materno são muito semelhantes, com exceção da β-lg e da lisozima. Como o soro de queijo é praticamente o leite bovino de onde foi retirada a fração da caseína, pode ser qualificado para emprego na formulação de alimentos infantis em substituição ao leite materno.

A β-lg é considerada o maior componente alergênico do leite bovino (MÄKINEN-KILJUNEN & PALOSUO, 1992) e a sua separação do soro produz uma fração pobre em β-lg mas rica nas outras proteínas que o compõem. Esta fração apresenta uma constituição apropriada para ser administrada à pacientes hipoalergênicos (CHIANCONE & GATTONI, 1993). A fração rica em β-lg pode ser usada como complemento alimentar, pois, assim como a α-la, possui elevado valor nutricional. Uma pesquisa recente feita com pacientes HIV-soro positivos (BOUNOUS *et alii*, 1993) aos quais foi administrada uma fortificação alimentar à base de proteínas de soro de queijo, relatou o aumento de peso dos pacientes quando comparado com aqueles que não receberam a fortificação.

4.1. Conclusões

* O extrator Graesser demonstrou que é uma unidade de extração apropriada para o trabalho com SAB.

* As características hidrodinâmicas descritas para os sistemas orgânicos tradicionais foram reproduzidas nos experimentos com SAB, principalmente no que concerne à independência das fases, que se separam na linha central do vaso cilíndrico, e à existência de duas fases com uma pequena e suave dispersão mútua. Não existe uma fase dispersa e outra contínua, na faixa de velocidades de agitação estudadas.

* O coeficiente de mistura axial na fase polimérica é independente da velocidade de agitação. Não ocorre o mesmo para a fase salina, onde existe uma região que deve ser evitada, entre 3 e 7 rpm, por aumentar a mistura axial.

* Foram escolhidas baixas velocidades de agitação visando minimizar a desnaturação das proteínas pela agitação.

* As taxas de escoamento (2:1; 1,2:1; 0,8:1 e 0,5:1) usadas na operação contínua indicaram uma grande capacidade de processamento da planta em escala piloto.

* Foram estabelecidas condições operacionais favoráveis (baixas velocidades de rotação, em torno de 3 rpm, e baixas relações fase polimérica/fase salina) durante o processamento de proteínas, as quais levaram a boas taxas de extração. A α-la e a β-lg foram separadas satisfatoriamente do soro de queijo. A α-la foi concentrada na fase superior ou fase rica em PEG e a β-lg na fase inferior ou fase salina.

* Os tempos de residência de 1 hora para a fase polimérica e de 1,5 horas para a fase salina levam a um curto tempo de processamento, realçando uma alta capacidade do extrator (em torno de 660 g por dia do total de proteínas sob as condições estudadas).

* O extrator trabalhou dentro da faixa de eficiência especificada pelo seu projetista (COLEBY, 1962, 1983), 35%-50%.

4.2. Sugestões

* Prosseguir com o processamento das proteínas em planta piloto, estudando a recuperação de PEG e de sal das fases.

* Obtenção das proteínas livres de PEG e de sal, isto é, com alto grau de pureza. Fator importante quando se considera o alto custo das proteínas isoladas (5g de α-la em grau eletroforético tem um custo aproximado de 1700 dólares e 5 g de β-lg de 250 dólares).

* Especificar a composição de um complemento alimentar para pacientes alérgicos ao leite bovino com base nas proteínas do soro de queijo.

* Otimizar os sistemas PEG-citrato de sódio, com relação ao pH, temperatura e composições do polímero e do sal para a separação das proteínas do soro de queijo.

* Determinar o ponto de inundação do extrator Graesser, o diâmetro médio das gotas nas condições testadas, alterar a geometria do extrator, a região de extração, de decantação, o número de cestos semicilíndricos e retirar amostras, para o estudo da transferência de massa, ao longo do extrator que possibilitem a determinação dos perfis de concentração e a apresentação de correlações para "hold up" e eficiência, com um maior conjunto de experimentos.

* Testar a separação de outras biomoléculas em processo contínuo, ou mesmo o uso de células com proteínas intracelulares em maiores velocidades de agitação, já que, teoricamente, o extrator se adequa ao tratamento de sólidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOT, N.L., BLANKSCHTEIN, D. and HATTON, T.A., Proteins Partitioning in Aqueous Polymer Systems. 4. Proteins in Solutions of Entangled Polymers, **Macromelecules, 25,** 5192-5200, 1992

ALBERTSSON, P.A., Chromatography and Partition of Cells and Cell Fragments, **Nature, 177,** 771-774, 1956

ALBERTSSON, P. A., **Partition of Cell Particicles and Macromolecules**, John Wiley, 3rd Ed., 1986

AL-HEMIRI. A.A. and KAREEM, A Drop Size Distribution in a Graesser Contactor, **Can. J. Chem. Eng., 68**, 569-576, 1990

AL-MASHIKI, S.A. and NAKAI, S., Reduction of β-Lactoglobulin Content of Cheese Whey by Polyphosphate Precipitation, **J. Food Sci., 52**, 1237-1240, 1987

AMRANE, A. and PRIGENT, Y., Influence of Media Composition on Lactic Acid Production Rate from Whey by *Lactobacilus helveticus*, **Biotechol. Lett., 15,** 239-244, 1993

ATKINSON, B. and SAINTER, P.J., Development of Downstream Processing, **J. Chem. Technol. Biotechnol., 32,** 100, 1982

AUFDERHEIDE,E. and VOGELPOHL. Q., A Convective Model To Interpret Dispersed-Phase Residence Time Measurements in Pulsed Liquid/Liquid Extractors, **Chem. Engng. Sci., 41**, 1747-1757, 1986

AXELSSON, C.-G., Changes in Structure and Hydrophobic Surface Properties of β-Lactoglobulin Determined by Partition in Aqueous Two-Phase Polymeric Systems, **Biochim. Biophys. Acta, 533**, 34-42, 1978

BAMBERGER, S., SEAMAN, G.V.F., BROWN, J.A. and BROOKS, D.E., The Partitioning of Sodium Phosphate and Sodium Chloride in Aqueous Dextran Polyrthylene Glycol Two Phase Systems, **J. Coll. Interf. Sci., 99**, 187-193, 1984

BAMBERGER, S., BROOKS, D., SHARP, K., VAN ALSTINE, J and WEBBER, T., Preparation of Phase Systems and Measurement of their Physicochemical Properties, in: **Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems: Theory, Methods, Uses and Applications to Biotechonolgy**, ed's: Walter H., Brooks D.E. and Fischer, D., Academic Press, NY, pp 85-130, 1985

BASKIR, J.N., HATTON, T.A. and SUTER, U.W., Protein Partitioning in Two -Phase Aqueous Polymer Systems, **Biotech. Bioengng., 34**, 541-558, 1989

BRADFORD, M., A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principles of Protein-Dye Binding, **Anal. Biochem., 72**, 248-254, 1976

BOUNOUS, G., BARUCHEL, S., FALUTZ, J. and GOLD, P., Whey as a Food Supplement in HIV-Seropositive Individuals, **Clin. Invest. Med., 16**, 204-209, 1993

BUFFHAM, B.A. and MASON, G., Holdup and Dispersion: Tracer Residence Times, Moments and Inventory Measurements, **Chem. Engng. Sci., 48**, 3879-3887, 1993

CABEZAS, H., EVANS, J.and SZLAG, D., Statistical Thermodynamics of Aqueous Two-Phase Systems, in: **Downstream Processing and Bioseparation - Recovery and Purification of Biological Products**, ed's: Hamel, J., Hunter, J. and Sikdar, S., ACS Symposium Series, pp 38-52, 1990

CHEFTEL, J.C., CUQ, J.L and LORIENT, D., **Lebensmittelproteine: Biochemie, Funktionelle Eigenschaften, Ernährungsphysiologie, Chemische Modifizierung,** Behr's Verlag, Hamburg, pp. 193-228, 1985

CHEN, J.-P, Partitioning and Separation of α-Lactalbumin and β-Lactoglobulin in PEG/Potassium Phosphate Aqueous Two-Phase Systems, **J. Ferm. Bioenging., 73**, 140-147, 1992

CHIANCONE, E. and GATTONI, M., Selective Extraction of Native β-Lactoglobulin, **J Chromatogr., 539,** 455-463, 1991

CHIANCONE, E. and GATONI, M, Selective Removal of β-Lactoglobulin Directly from Cow's Milk and Preparation of Hypoallergenic formulas; a Bioaffinity Method, **Biotechnol. Appl. Biochem., 18,** 1-8, 1993

COLEBY, J., Apparatus for Countercurrent Tratment of Immiscible Fluids, **United States Patent,** Nr.3, 017,253, 1962

COLEBY, J., The RTL (Formerly Graesser Raining-Bucket) Contactor, in: **Handbook of Solvent Exctraction,** ed's: L.O.Baird and Hanson, Wiley, NY,Ch. 13.6, 1983

COIMBRA, J. R., TÖMMES, J. and KULA, M.-R., Continuous Separation of Whey Proteins with Aqueous Two-Phase Systems in a Graesser Contactor, **J. Chromatog., 668,** 85-94, 1994

CORDES, A., FLOSSDORF, J and KULA, M-R., Development of a Mathematical Model Describing the Behavoiur of Biomolecules in Aqueous Two-Phase Systems, **Biotechnol. Bioengng., 30,** 514-520, 1987

CUSACK, R and KARR, A., A Fresh Look at Liquid-Liquid Extraction. Part 3: Extractor Design and Specification, **Chem. Engng., April,** 112-119, 1991

DANCKWERTS, P.V., Continuous Flow Systems:Distribution of Residence Time, **Chem. Engng. Sci., 2,** 1-13, 1953

DARLING, P, WYKES, L.J., CLARKE, R., PAPAGEORGIOU, A. and PENCHARZ, P.B., Utilization of Non-Protein Nitrogen in Whey-Dominant Formulae by Low-Birthweight Infant, **Clin. Sci., 84,** 543-548, 1993

DAVIES, P.T. and LAW, A., The Content and Composition of Protein in Creamery Milks in South-West Scotland, **J. Dairy Res., 47,** 83,1980

DEBYE, P. and HUECKEL, E., Theory of Electrolytes 1. Freezing Point Lowering and Related Phenomena, **Physik Z., 24,** 185, 1923

EDMOND, E. and OGSTON, A.G., An Approach to the Study of Phase Separation in Ternary Aqueous systems, **Biochem. J., 109,** 569-576, 1968

EIGEL, W.N., BUTLER, J.E., ERNSTROM, C.A., FARRELL, H.M.J., HARWALKER, V.R., JENNESS, R. and WHITNEY, R.M., Nomenclature of Proteins of Cow's Milk: Fifth Revision, **J. Dairy Sci., 67**, 1599, 1984

EITEMAN, M. and GAINER, J., A Correlation for Predicting Partition Coefficients in Aqueous Two-Phase Systems, **Sep. Sci. Technol., 27**, 325-339, 1992

EITEMAN, M., Prediction Partition Coefficients of Multi-Charged Solutes in Aqueous Two-Phase Systems, **J. Chromatogr., 668**, 21-30, 1994

EYNARD, L., IAMETTI, S. RELKIN, P. and BONOMI, F., Surface Hydrophobicity Changes and Heat-Induced Modifications of α-Lactalbumin, **J. Agric. Food Chem., 40**, 1731-1736, 1992

FLORY, P.J., **Principles of Polymer Chemistry**, Cap. 13, Cornell University Press, NY, 1953

FORCINITI, D. and HALL, C.K., Theoretical Treatment of Aqueous Two-Phase Extraction by Using Virial Expansions-a Preliminary Report, in: **Downstream Processing and Bioseparation - Recovery and Purification of Biological Products**, ed's: Hamel, J., Hunter, J. and Sikdar, S., ACS Symposium Series, pp 53-70, 1990

FRANCO, T.T., ANDREWS, A.T. and ASENJO, J.A., Partitioning of Modified β-Lactoglobulin and Bovine Serum Albumin. Effect of Surface Hydrophobicity in Aqueous Two-Phase Systems, 8th International Conference on Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems, Leipzig, August, P15, 1993

GATT, The World Market of Dairy Products. Dairy Products International Accord, **12 th Annual Report**, Geneva, November, pp. 65-66, 1991

GEANKOPLIS, C.J. and HIXON, A.N., Mass Transfer Coefficients in a Extraction Spray Tower, **Ind. Engng. Chem., 42**, 1141, 1950

GREVE, A. and KULA, M-R, Cost Structure and Estimation for the Recycling of Salt in a Protein Extraction Process, **Bioproc. Engng., 6,** 173-177, 1991a

GREVE, A. and KULA, M-R., Recycling of Salt from the Primary Bottom Phase of a Protein Extraction Process, **J. Chem. Tech. Biotechnol., 50**, 27-42, 1991b

GRIKO, Y.V. and PRIVALOV, P.L., Calorimetric Study of Heat Denaturation of β-Lactoglobulin in Solutions Containing Urea and Phosphate Ions, **Inst. Protein Res., Russian Acad. Sci., 26**, 150-157, 1992

GROßMAN, P.D. and GAINER, J.L., Correlation of Aqueous Two-Phse Partitioning of Proteins with Changes in Free Volume, **Biotechnol. Progress, 4,** 6-11, 1988

GROßMANN, C. ZHU, J. and MAURER, G., Phase Equilibrium on Aqueous Two-Phase Systems Containing Amino Acids and Peptides, **Fluid Phase Equilibria, 82**, 275-282, 1993

GU, W. and BRADY, J.W., Molecular Dynamics Simulations of the Whey Protein β-Lactoglobulin, **Protein Engng., 5**, 17-27, 1992

GUAN, Y., LILLEY, T. and TREFFRY, T., A New Excluded Volume Theory and Its Application to the Coexistence Curves of Aqueous Two-Phase Systems, **Macromolecules, 26**, 3971-3979, 1993

GUGENHEIM, E.A., **Thermodynamics**, North Holland Publishing Co., Amsterdam, 1959

GUIRGUIS, N., BROSNAHAN,C. and HICKEY, M.W., Whey Disposal: Recovery of Nutrients for Animal Feeding,. **Wat Sci. Technol., 27**, 149-157, 1993

HAYNES, C.A., BEYNON, R.V., KING, R.S., BLANCH, H. and PRAUSNITZ, J.M., J. Thermodynamic Properties of Aqueous Polymer Splutions: Poly(ethylene Glycol)/Dextran, **Phys. Chem., 93**, 5612-5617, 1989

HARTLAND, S. and MECKLENBURGH, J.C., A Comparasion of Diferential and Stagewise Countercurrent Extraction with Backmixing, **Chem. Engng. Sci., 21**, 1209-1221, 1966

HARRIS, J.M., **Poly(ethylene Glycol) Chemistry - Biotechnical and Biomedical Applications**, Plenium Press, NY, 1992

HOUGHTON, P.A., MADURAWE, R.U. and HATTON, T.A., A Convective and Dispersion Models for Dispersed Phase Axial Mixing - The Significance of Polydispersity Effects in Liquid-Liquid Contactors, **Chem. Engng. Sci., 43**, 617-639, 1988

HUSTED, H., KRONER, K.H. and KULA, M-R., Applications of Phase Partitioning in Biotechnology, in: **Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems: Theory, Methods, Uses and Applications to Biotechonolgy**, ed's: Walter H., Brooks D.E. and Fischer, D., Academic Press, NY, pp 529-587, 1985a

HUSTED, H., KRONER, K.H., MENGE, U and KULA, M.-R., Protein Recovery Using Two-Phase Systems, **Trends Biotech., 3**, 139-144, 1985b

HUSTED, H., KRONER, K.H., MENGE, U. and KULA, M.-R., Enzyme Purification by Liquid-Liquid Extraction, **Enzyme Enging., 5,** 45-47, 1980

HUSTED, H., KRONER, K.H. and PAPAMICHAEL, N., Continuous Cross-Current Aqueous Two-Phase Extraction from Biomass-Automated Recovery in Production Scale, **Process Biochemistry, 23,** 129-137, 1988

INGHAM, J., The Stydy of Longitudinal Mixing in Liquid-Liquid Contactors, in: **Recent Advances in Liquid-Liquid Extraction**, ed.: C. Hanson, Pergamon Press, NY, Ch. 8, 1971

JAFARADAB, K.R., PATIL, T. A., SAWANT, S.B. and JOSHI, J.B., Enzyme and Protein Mass Transfer Coefficient in Aqueous Two-Phase Systems-II. York-Scheibel Extraction, **Chem. Eng. Sci., 47**, 69-73, 1992

KANEKO, T., WU, B.T. and NAKAI, S., Selective Concentration of Bovine Immunoglobulins and a-Lactalbumins from Acid Whey Using FeCl3, **J. Food Sci., 50,** 1531-1536, 1985

KANG, C.H. and SANDLER, S.I., A Thermodynamic Model for Two-Phase Aqueous Polymer Systems, **Biotechnol. Bioengng., 32**, 1158-1164, 1988

KIM, C.Y., BREWER, J.W., BROTHERS, C.E., FARVER, T.F. and LEE, E.K., Recovery of Extracellular Enzyme from Fermentation Broth by Aqueous Phase Systems, **3rd Chem. Congress of North America, June** *5-10*, Toronto, 1988

KING, R., BLANCH, H.W. and PRAUSNITZ, J.M., Molecular Thermodynamics of Aqueous Two-Phase Systems for the Phase Separations, **AIChE J., 34**, 1585-1594, 1988

KOSIKOWSKI, F.V. **Cheese and Fermented Milk Foods**, 2nd Ed., Edwards Brothers, Inc., Ann. Arbor, Michigan, USA, 1977

KRONER, K.H., SCHÜTTE, H., STACH, W. and KULA, M-R., Scale-up of Formate Dehydrogenase by Partition, **J. Chem. Technol. Biotechnol., 32**, 130-137, 1982

KRONER, K.H., HUSTED, H. and KULA, M-R., Exctractive Enzyme Recovery: Economic Considerations, **Proc. Biochem., 19**, 170-179, 1984

KULA, M-R., Trends and Future Prospects of Aqueous Two-Phase Extraction, **Biosep., 1**, 181-189, 1990

KULA, M-R., KRONER, K.H. and HUSTED, H., Purification of Enzymes by Liquid-Liquid Extraction, in: **Adv. Biochem. Engng**, ed.: Fiechter A., Spring Verlag, Berlin, Vol. *24*, pp. 73-118, 1982

KUMAR, A. and HARTLAND, S., Prediction of Axial Mixing Coeficients in Rotating Disc and Asymmetric Rotating Disc Columnns, **Can. J. Chem. Engng., 64, 77-87**, 1992

LEBENTHAL, E., Cow's Milk Protein Allergy, **Pediatr. Clin. N. Amer**., 22, 827-830, 1975

LEHNINGER, A.L., **Biochemistry**, Worth, NY, 1982

LEVENSPIEL, O., **Chemical Reaction Engineering,** Wiley, NY, 1992

LEVENSPIEL, O. and FITZGERALD, T.J., A Warning on the Misuse of the Dispersion Model, **Chem. Engng. Sci., 38**, 1141-1149, 1983

LEVENSPIEL, O. and SMITH, W.K., Notes on the Diffusion-Type Model for the Longitudinal Mixing of Fluids in Flow, **Chem. Engng. Sci., 6**, 227-233, 1957

LIN, K.H., VAN NESS, H.C. and ABBOT, M.M., Cinética de Reação, Projeto de Reator e Termodinâmica, in: **Manual de Engenharia Química**, ed's R. Perry and C.H. Chilton, Editora Guanabara Dois, RJ, seção *4*, 1980

MACEDO, E., SKOVBORG, P. and RASMUSSEN, P., Calculation of Phase Equilibria for Solutions of Strong Electrolytes in Solvent-Water Mixtures, **Chem. Engng. Sci., 45**, 875-882, 1990

MÄKINEN-KILJUNEN, S. and PALOUSUO, T.A., A Sensitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the determination of Bovine β-Lactoglobulin in Infant Feeding Formulas and in Human Milk, **Allergy, 47**, 347-352, 1992

MÄKINEN-KILJUNEN, S. and SORVA, R., Bovine β-Lactoglobulin Levels in Hidrolysed Protein Formulas for Infant Feeding, **Clin. Exp. Allergy, 23**, 287-291, 1993

MAILLART, P and RIBADEAU-DUMAS, B., Preparation of beta-Lactoglobulin Free Proteins from Whey Retentate by NaCl Salting Out at Low pH, **J. Food Sci., 53**, 743-745, 1988

MATTIASSON, B. and LARSSON, M., Bioconversions with Emphasis on Solvent Production, in: **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, ed: G.E. Russel, Intercept Ltd., Newcastle, UK, vol. *3*, pp. 147-174, 1985

MEHRA, R.K. and DONNELLY, W., Fractionation of Whey Protein Components through a Large pore Size Hydrophilic, Cellulosic Membrane, **J. Dairy Res., 60,** 89-97, 1993

MENIAI, A.-H. and NEWSHAM, M.T., The Selection of Solvents for Liquid-Liquid Extraction, **Trans. Inst. Chem. Engng., 70**, 78-87, 1992

MISEK, T and ROD, V., Calculations of Contactors with Longitudinal Mixing, in: **Recent Advances in Liquid-Liquid Extraction**, ed: C. Hanson, Pergamon Press, NY, Ch. 7, 1971

MIYAUCHI, T. and VERMEULEN, T., Longitudinal Dispersion in Two-Phase Continuous-Flow Operations, **Ind. Enging. Chem. Fundamentals, 2**, 113-127, 1963

MOLYNEAUX, P., **Water Soluble Synthetic Polymers: Properties and Behavior,** CRC, Boca Raton, FL, Vol. 1, 1984

MULVIHILL, D.M., and KINSELLA, J.E., Gelation Characteristics of Whey Proteins and β-Lactoglobulin, **Food Technol., 41**, 102-111, 1987

MOON, J.S., HENNICO, A., and VERMEULEN, T., Longitudinal Dispersion in a Packed Extraction Columns with and without Pulsation, **Univ. of California Lawrence Rad. Lab. Report,** UCRL-10928, October, 1963

MORR, C.V. and HA, Y.W., Whey Concentrates and Isolates: Processing and Functional Properties, **CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 33**, 431-476, 1993

NASER, S.F. and FOURNIER, R.L., A System for the Design of an Optimum Liquid-Liquid Extractant Molecule, **Computers Chem. Engng., 15**, 397-414, 1991

NEMECEK, M. and PROCHAZKA, J., Longitudinal Mixing in a Vibrating Sieve-Plate Column-Two Phase Flow, **Can. J. Chem. Engng., 52**, 739-749, 1974

ORTIN, A, CEBRIAN, J and JOHANSSON, G., Large Escale Extraction of α-Lactalbumin and β-Lactoglobulin from Bovine Whey by Precipitation with Polyethylene Glycol and Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems, **Preparative Biochem., 22**, 53-66, 1992

OWUSU, R.K., Thermodynamic Analysis of the Effect of Calcium on Bovine Alpha-Lactalbumin Conformational Stability, **Food Chem., 44**, 189-194, 1992

PAPAMICHAEL, N, BOERNER, B. and HUSTED, H., Continuous Aqueous Phase Extraction of Proteins: Automated Processing and Recycling of Process Chemicals, **J. Chem. Tech. Biotechnol., 54**, 47-55, 1992

PATIL, T.A., JAFARADAB, K.R., SAWANT, S.B. and JOSHI, J.B., Enzyme Mass Transfer Coefficient in Aqueous Two-Phase System Using a Packed Extraction Column, J.B., **Can. J. Chem. Eng., 69**, 548-556, 1991

PEARCE. R.J., Analysis of Whey Proteins by Hihg Performance Liquid Chromatography, **Aust. J. Dairy Technol., 38**., 114-117, 1983

PEARCE, R.J. and MARSHALL, S.C., New Ways with Whey Components, **Aust. J. Dairy Technol., Nov**.,105-107, 1991

PEREA, A., UGALDE, U., RODRIGUES, I. and SERR, J.L., Preparations and Characterization of Whey Protein Hydrolysates: Applications in Industrial Whey Bioconversion Process, **Enzyme Microb. Technol., 15**, 418-423, 1993

PEREZ, M.D., SANCHEZ, L., ARANDA, P., ENA, J.M., ORIA, R. and CALVO, M., Effects of β-Lactoglobulin on the Activity of Pregastric Lipase. A Possible Role for this Protein in Ruminant Milk, **Bioch. Bioph. Acta, 1123**, 151-155, 1992

PROCHÁZKA, J and LANDAU, J., **Colln. Czech. Chem. Commun., 28**, 1927, 1963

RICHARDSON, J.F., Future for Separation Processes, **J. Chem. Tech. Biotechnol., 56,** 304-307, 1993

RYDEN, J and ALBERTSSON, P.A., Interfacial Tension of Dextran-Polyethylene Glycol-Water Two Phase Systems, **J. Coll. Interf. Sci., 37**, 219-222, 1971

SASAKAWA, S. and WALTER, H., Partition Behaviour of Native Proteins in Aqueous Dextran-Polyethylene Glycol Phase Systems, **Biochem., 11,** 2760-2765, 1972

SAWANT, S.B., SIKDAR,S.,K. and JOSHI, J.B., Hydrodynamics and Mass Transfer in Two-Phase Aqueous Extraction Using Spray Columns, **Biotech. Bioenging., 36,** 109-115, 1990

SHEIKH, A.R., INGHAM, J. and HANSON, C., Axial Mixing in a Graesser Raining Bucket Liquid-Liquid Contactor, **Trans. I. Chem. Engng., 50**, 199-207, 1972

SHEN, Z.J., HU, J., SU, Y.F. and BAIRD, M.H.I., Modelling of Mixing and Mass Transfer in a Raining Bucket (MRTL) Extractor, **Proc. 2nd. Intl. Conf. Sepn.**

Sci. Technology, Hamilton, 1, 282-288, Can. Soc. Chem. Eng. , Ottawa, Ontario, October, 1989

SHIGERU, Y. and YE-XIUYUN, Isolation of Lactoperoxidase and Lactoferrin from Bovine Milk Rennet Whey and Acid Whey by Sulphopropyl Cation-Exchange Chromatography, **Neth. Milk Dairy J., 45**, 273-280, 1991

SKELLAND, A.H.P., Interphase Mass transfer, in: **Science and Practice of Liquid-Liquid Extraction,** ed.: Thornton, J., Claredon Press, Oxford, UK, Vol 1., Ch. 2, 1992

SKUDDER, P.J., Evaluation of a Porous Silica-Based Ion-Exchange Medium for the Production of Proteins Fractions from Rennet-and Acid Whey, **J. Dairy Res., 52**, 167-181, 1985

STEINER, L., KUMAR, A. and HARTLAND, S., Determination and Correlation of Axial Mixing Parameters in a Agitated Liquid-Liquid Extraction Column, **Can. J. Chem. Enging., 66,** 241-247, 1988

SLEICHER, C.A., Axiall Mixing and Extraction Efficiency, **AIChE J.,** *5*, 145-149, 1959

STEINER, L., **Rechenerische Erfassung der Arbeitsweise vom Fluessig-Fluessig Extraktionskolonnen**, Reihe 3: Verfahrenstechnik, Nr. 154, VDI Verlag, Duesseldorf, 1988

STEVENS, G.W. and PRATT, H.R.C., Plug Flow Analysis, in: **Science and Practice of Liquid-Liquid Extraction**, ed.: Thornton, J., Claredon Press, Oxford, UK, Vol 1., Ch. 6, 1992

SZLAG, D.C. and GIULIANO, K.A., A Low Cost Aqueous Two-Phase System for Enzyme Extraction, **Biotech. Techniques, 4,** 277-82, 1988

THORNTON, J. **Science and Practice of Liquid-Liquid Extraction**, ed.: Thornton, J., Claredon Press, Oxford, UK, Vol 1., 1992

TIN, C.S.F. and MAWSON, A.J., Ethanol Production from Whey in a Membrane Recycle Bioreactor, **Proc. Biochem., 28**, 217-221, 1993

TSOURIS, C., FERREIRA, R. and TAVLARIDES, L.L., Characterization of Hydrodynamic Parameters in a Multistage Column Contactor, **Can. J. Chem. Engng, 69**, 913-923, 1990

TREYBAL, R.E. **Mass transfer Operations**, 3rd Edn., McGraw-Hill, NY, 1980

VERNAU, J. and KULA, M-R., Extraction of Proteins from Biological Raw Material Using Aqueous Polyethylene Glycol-Citrate Phase Systems, **Biotechnol. App. Biochem., 12,** 397-404, 1990

WANG, P.S.M., INGHAM, J. and HANSON, C., Further Studies on the Performance of a Graesser Raining Bucket Liquid-Liquid Contactor, **Trans. I. Chem. Eng., 55**, 196-201, 1977

YOSHIDA, S., Isolation of β-Lactoglobulin and α-Lactalbumin by Gel Filtration Using Sephacryl S-200 and Purificaton by Diethylaminoethyl Ion-Exchange Chromatography, **J. Dairy Sci., 73**, 2292-2298, 1990

ZASLAVSKY, Y., MESTECHKINA, N.M. and ROGOZHIN, J., Characteristics of Protein-Aqueous Medium Interactions Measured by Partition in Aqueous Ficoll-Dextran Biphasic Sistem, **J. Chromatogr., 260**, 329-336, 1983

APÊNDICE

Nos apêndices A1 e A2 estão apresentados, respectivamente, o conjunto global dos resultados obtidos experimentalmente e figuras adicionais referentes à análise dos resultados, como citadas no Capítulo 3 (Resultados e Discussões).

A1. Conjunto global dos resultados obtidos experimentalmente

Tabela A1. Tempo de residência na fase polimérica. Corante: azul de cibacron. Parâmetro: densidade ótica a 595 nm. $V_{fpolimérica} = 88$ ml/min, $V_{fsalina} = 44$ ml/min

Tempo	Velocidade de rotação (rpm)			
(min)	3	5	7	9
0	---	---	---	---
30	---	0,011	---	0,005
40	0,019	0,073	0,011	0,018
45	0,049	0,102	0,052	0,022
50	0,098	0,120	0,104	0,018
55	0,102	0,115	0,098	0,023
60	0,108	0,104	0,087	0,024
65	0,092	0,088	0,062	0,019
70	0,095	0,064	0,036	0,008
75	0,072	---	0,027	0,003
80	0,030	---	0,012	0,001
85	0,026	---	0,007	---
90	0,020	---	0,003	---

Tabela A2. Tempo de residência na fase polimérica. Corante: azul de cibacron. Parâmetro: densidade ótica a 595 nm. $V_{fpolimérica}$ = 36 ml/min, $V_{fsalina}$ = 44 ml/min

Tempo	Velocidade de rotação (rpm)			
(min)	3	5	7	9
0	---	---	---	---
55	0,001	---	0,003	---
60	---	0,003	0,006	---
65	---	0,009	0,005	---
70	0,003	0,004	0,005	---
75	---	---	0,006	---
80	---	---	0,005	0,002
85	---	0,006	0,008	0,006
90	0,050	0,007	0,012	0,009
95	0,057	0,006	0,023	0,024
100	0,068	0,008	0,029	0,048
105	0,076	0,039	0,038	0,052
110	0,084	0,046	0,042	0,089
115	0,092	0,057	0,049	0,092
120	0,100	0,066	0,044	0,104
125	0,103	0,077	0,029	0,088
130	0,105	0,078	0,022	0,086
135	0,104	0,081	0,018	0,073
140	0,096	0,079	0,013	0,087
145	0,087	0,076	0,013	0,082
150	0,079	0,074	0,005	0,076
155	0,070	0,069	0,009	0,052
160	0,063	0,062	0,002	0,049
165	0,057	0,059	0,002	0,029
170	0,049	0,054	0,002	0,014
175	0,015	0,049	---	0,011
180	0,002	0,045	---	0,008
185	0,002	0,040	---	0,010
190	0,002	0,002	---	0,04

Tabela A3. Tempo de residência na fase polimérica. Corante: azul de cibacron. Parâmetro: densidade ótica a 595 nm. $V_{fpolimérica}$ = 36 ml/min, $V_{fsalina}$ = 70 ml/min

Tempo	Velocidade de rotação (rpm)			
(min)	3	5	7	9
0	---	---	---	---
75	---	---	0,010	0,003
80	---	---	0,019	0,015
85	0,036	---	0,029	0,047
90	0,045	0,09	0,043	0,055
95	0,061	0,039	0,050	0,069
100	0,073	0,020	0,073	0,073
105	0,075	0,023	0,087	0,098
110	0,078	0,065	0,096	0,093
115	0,082	0,038	0,104	0,089
120	0,080	0,033	0,072	0,082
125	0,079	0,022	0,064	0,072
130	0,076	0,013	0,061	0,070
135	0,070	0,006	0,055	0,068
140	0,063	0,006	0,051	0,061
145	0,059	0,006	0,046	0,052
150	0,055	0,004	0,043	0,044
155	0,041	---	0,031	0,033
160	0,037	---	0,011	0,025
165	0,034	---	0,04	0,017
170	0,022	---	0,006	0,011
175	0,016	---	---	---

Tabela A4. Tempo de residência para a fase salina. Corante: azul de dextrana. Parâmetro: densidade ótica a 595 nm. $V_{fpolimérica}$ = 36 ml/min, $V_{fsalina}$ = 70 ml/min

Tempo (min)	Velocidade de rotação (rpm)			
	3	5	7	9
0	---	---	---	---
25	---	0,002	---	0,017
30	---	0,004	0,045	0,092
35	0,006	0,030	0,051	0,096
40	0,014	0,045	0,071	0,129
45	0,029	0,042	0,059	0,109
50	0,034	0,035	0,042	0,142
55	0,029	0,027	0,031	0,081
60	0,022	0,018	0,024	0,023
+65	0,019	0,015	0,007	---
70	0,010	0,009	---	---

Tabela A5. Tempo de residência para a fase salina. Corante: azul de dextrana. Parâmetro: densidade ótica a 595 nm. $V_{fpolimérica}$ = 88 ml/min, $V_{fsalina}$ = 70 ml/min

Tempo	Velocidade de rotação (rpm)			
(min)	3	5	7	9
0	---	---	---	---
25	---	0,013	---	---
30	0,010	0,023	0,026	0,018
35	0,015	0,032	0,061	0,020
40	0,026	0,042	0,104	0,027
45	0,043	0,062	0,148	0,057
50	0,048	0,092	0,125	0,041
55	0,035	0,094	0,112	0,045
60	0,029	0,085	0,109	0,050
65	0,020	0,082	0,098	0,040
70	0,017	0,068	0,091	0,032
75	0,015	0,049	0,095	0,016
80	0,009	0,044	0,018	---
85	---	0,024	---	---

Tabela A6. Tempo de residência para a fase salina. Corante: azul de dextrana. Parâmetro: densidade ótica a 595 nm. $V_{fpolimérica}$ = 88 ml/min, $V_{fsalina}$ = 44 ml/min

Tempo	Velocidade de rotação (rpm)			
(min)	3	5	7	9
0	---	---	---	---
40	---	0,026	---	---
45	---	0,034	---	---
50	---	0,050	0,007	---
55	---	0,069	0,032	---
60	---	0,094	0,062	---
65	0,018	0,113	0,085	0,002
70	0,029	0,126	0,095	0,156
75	0,042	0,118	0,107	0,202
80	0,045	0,115	0,122	0,229
85	0,046	0,110	0,132	0,234
90	0,057	0,105	0,104	0,234
95	0,044	0,102	0,113	0,212
100	0,075	0,093	0,099	0,210
105	0,062	0,085	0,087	0,192
1100	0,059	0,077	0,086	0,148
115	0,033	0,069	0,079	0,146
120	0,033	0,062	0,071	0,110
125	0,028	0,055	0,063	0,153
130	0,025	0,020	0,027	---
135	0,024	---	---	---
140	0,023	---	---	---

Tabela A7. Medidas de "hold up" determinadas pelo método do estancamento rápido

$V_{fpolimérci}/V_{fsalina}$	Velocidade de rotação (rpm)			
(ml/min)/(ml/min)	3	5	7	9
88/44	0,60	0,57	0,58	0,60
36/44	0,62	0,60	0,55	0,59
36/70	0,57	0,63	0,55	0,56

Tabela A8. Concentração de α-lacotalbumina e β-lactoglobulina na saída das fases polimérica e salina. Alimentação: permeado da solução de soro de queijo dissolvido em KP_i. $V_{fpolimérica}$ = 36 ml/min, $V_{fsalina}$ = 44 ml/min

Velocidade	α-La (mg/ml)		β-Lg (mg/ml)	
de rotação (rpm)	Polimérica	Salina	Polimérica	Salina
3	1,15	0,40	0,20	9,47
5	0,86	0,72	0,39	10,48
7	0,66	0,65	0,41	10,05
9	0,69	0,66	0,19	10,21

Tabela A9. Concentração de α-lacotalbumina e β-lactoglobulina na saída das fases polimérica e salina. Alimentação: permeado da solução de soro de queijo dissolvido em KP_i. $V_{fpolimérica}$ = 88 ml/min, $V_{fsalina}$ = 44 ml/min

Velocidade	α-La (mg/ml)		β-Lg (mg/ml)	
de rotação (rpm)	Polimérica	Salina	Polimérica	Salina
3	1,83	0,47	0,22	8,64
5	1,41	0,26	0,35	8,89
7	1,48	0,28	0,52	8,92
9	1,45	0,18	0,18	8,83

A2. Figuras adicionais relativas aos experimentos realizados

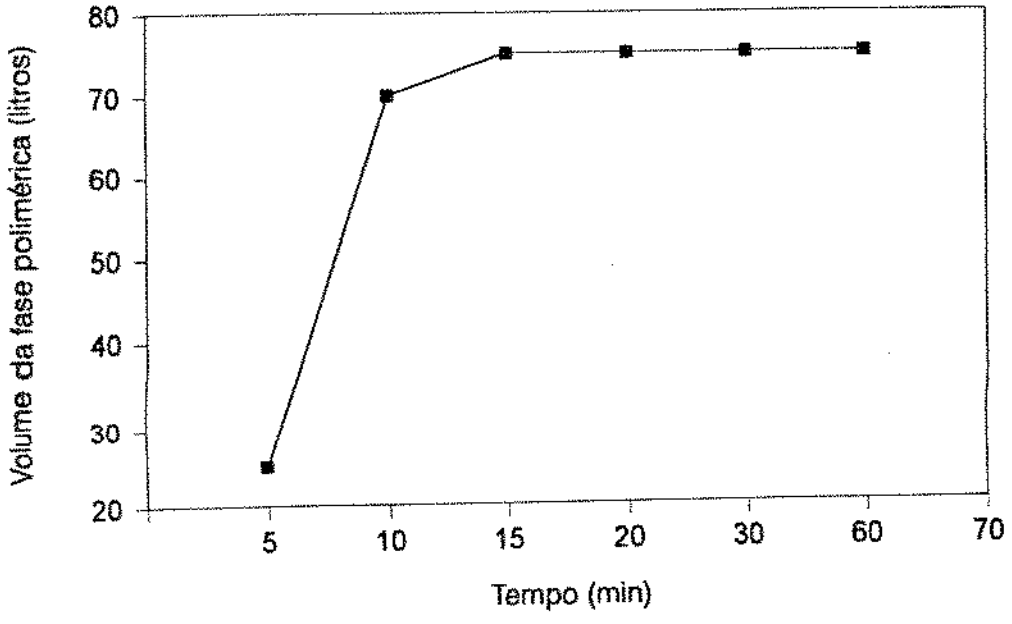

Figura A2.1. Tempo de decantação para a fase polimérica após mistura com a fase salina em um tanque de agitação

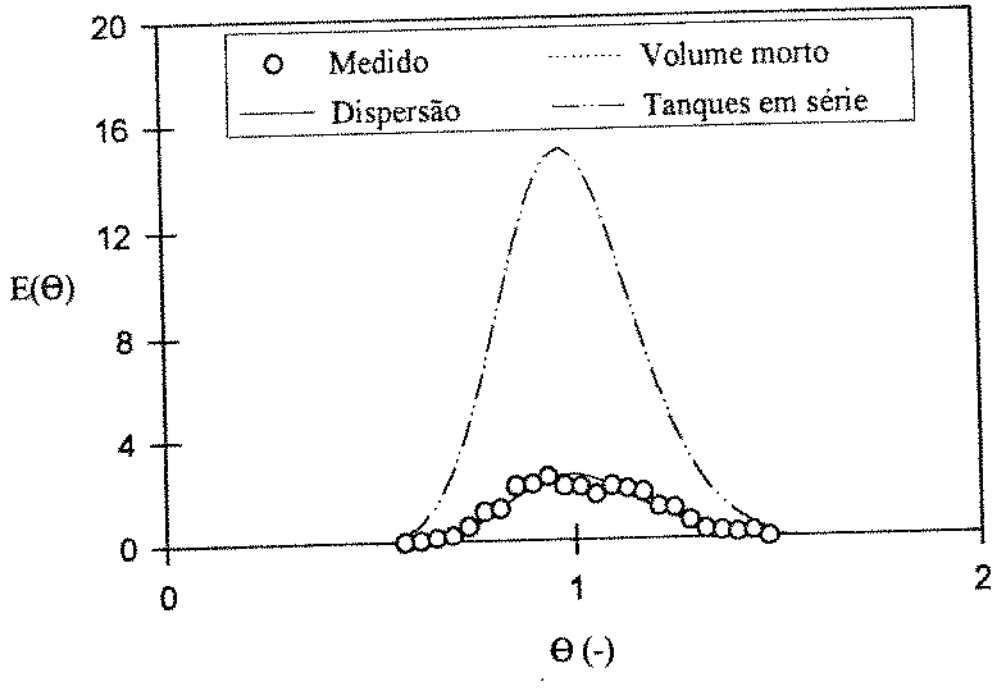

Figura A2.2. Distribuição de tempos de residência para um pulso de azul de cibacron na fase polimérica. 5 rpm, $V_{\text{fase polimérica}}$=36 ml/min, $V_{\text{fase salina}}$=44 ml/min