



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**SEPARAÇÃO DE PROTEÍNAS DE SORO DE QUEIJO
COM SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO EM UMA COLUNA
DE DISCOS ROTATIVOS**

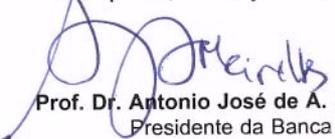
Lucy Doris Aburto Chumpitaz
Engenheira Química
Mestre em Engenharia Química

Prof. Dr. Antonio José de Almeida Meirelles
Orientador

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Lucy Doris Aburto Chumpitaz**, aprovada pela Comissão Julgadora em 12 de julho de 2002.

Campinas, 12 de julho de 2002



Prof. Dr. Antonio José de A. Meirelles
Presidente da Banca

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

CAMPINAS - SP
JULHO/2002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE 30
Nº CHAMADA T/UNICAMP
C471s
V _____ EX _____
TOMBO BCI 50606
PROC 16.837/02
C _____ D^x _____
PREÇO R\$ 11,00
DATA 28/08/02
Nº CPD _____

CM00172451-5

BIB ID 253623

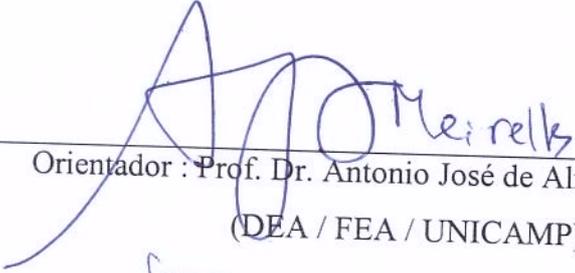
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

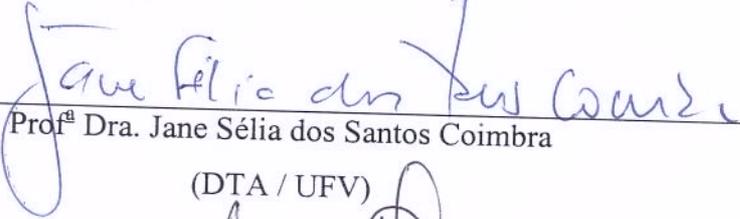
C471s Chumpitaz, Lucy Doris Aburto
Separação de proteínas de soro de queijo com sistema aquoso
bifásico em uma coluna de discos rotativos / Lucy Doris Aburto
Chumpitaz. – Campinas, SP: [s.n.], 2002.

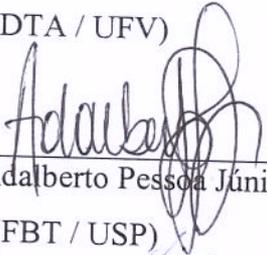
Orientador: Antonio José de Almeida Meirelles
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Proteínas – Separação. 2. Polietileno. I. Meirelles, Antonio
José de Almeida. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

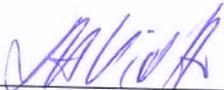
BANCA EXAMINADORA


Orientador : Prof. Dr. Antonio José de Almeida Meirelles
(DEA / FEA / UNICAMP)


Prof^ª Dra. Jane Sélia dos Santos Coimbra
(DTA / UFV)


Prof. Dr. Adalberto Pessoa Júnior
(FBT / USP)


Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi
(DESQ / FEQ / UNICAMP)


Prof. Dr. Luiz Antônio Viotto
(DEA / FEA / UNICAMP)

Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre
(DEA / FEA / UNICAMP)

Prof^ª Dra. Telma Teixeira Franco
(DPQ / FEQ / UNICAMP)

107638002

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Antonio José De Almeida Meirelles, pela valiosa orientação e apoio oferecidos.

Ao programa de estudantes de convênio de Pós-Graduação PEC/PG (Cooperação Internacional – CAPES) pelo suporte financeiro.

À professora Dra. Telma Teixeira Franco, pela disponibilidade em esclarecer dúvidas, pelo apoio, amizade e acesso ao laboratório do departamento de Processos Químicos da Faculdade de Engenharia Química (UNICAMP).

Aos membros da banca examinadora pelas observações, correções e sugestões.

Ao Professor Dr. Watson Loh do Instituto da Química (UNICAMP) pelo acesso ao laboratório e ao Engenheiro Antonio Carlos pela ajuda na obtenção dos valores de tensão interfacial.

Às alunas Marina Santos Cruz, Juliana Abbade da Silva e Wong, pela auxílio dado durante a execução desde trabalho.

À firma Davisco Foods International, Inc. e ao Dr. Anand Rao pelo fornecimento da matéria prima (BiPRO).

À todos os integrantes do Laboratório de Separações Físicas (LASEFI) do Departamento de Engenharia de Alimentos (UNICAMP), pelo companheirismo oferecidos.

À Professora Dra. Miriam Dupas Hubinger, Coordenadora da Comissão da Pós-Graduação, pela oportunidade proporcionada.

A meu eterno companheiro Wilfredo e a meu querido filho Serginho.

A meus amigos de sempre Antonio e Fátima Costa; Delson e Yemiko; Ana e Ezequías; Roseli e José Luiz ; José Guilherme; Nohora Lopes, pela amizade e ajuda oferecidas.

SUMÁRIO

| | |
|--|-------|
| INDICE DE TABELAS..... | xi |
| INDICE DE FIGURAS..... | xiv |
| NOMENCLATURA..... | xvi |
| RESUMO | xxiii |
| ABSTRACT | xxvi |
| INTRODUÇÃO | 1 |
| OBJETIVOS E APRESENTAÇÃO DA TESE | 3 |
| CAPITULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 4 |
| 1.1 IMPORTÂNCIA DA PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS | |
| NO SORO DE QUEIJO | 4 |
| 1.2 SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS OU SISTEMA | |
| AQUOSO BIFÁSICO (SAB)..... | 5 |
| 1.2.1 Polietileno Glicol | 8 |
| 1.2.2 Fosfato de Potássio | 8 |
| 1.3 COEFICIENTE DE PARTIÇÃO | 9 |
| 1.4 DIAGRAMA DE FASES | 10 |
| 1.5 MATERIA PRIMA | 11 |

| | | |
|---|--|----|
| 1.5.1 | Isolado Protéico de Soro de Queijo | 11 |
| 1.5.2 | Principais Proteínas do Isolado Protéico de Soro de Queijo..... | 15 |
| 1.5.2.1 | α -Lactalbumina (α -La) | 16 |
| 1.5.2.2 | β -Lactoglobulina (β -Lg) | 17 |
| 1.5.3 | Quantificação de Proteínas | 19 |
| 1.6 | EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO | 19 |
| 1.6.1 | Tipos de Extratores..... | 21 |
| 1.6.2 | Coluna de Discos Perfurados (PRDC)..... | 23 |
| 1.7 | HIDRODINÂMICA EM EXTRATORES..... | 24 |
| 1.7.1 | Fração Volumétrica Retida da Fase Dispersa <i>Hold-up</i> (x_d) e Velocidade Característica | 24 |
| 1.8 | TRANSFERÊNCIA DE MASSA EM EQUIPAMENTOS CONTÍNUOS E DISPERSÃO AXIAL (E_c) | 31 |
| CAPITULO II – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL | | |
| 2.1 | CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA PRIMA | 35 |
| 2.1.1 | Proteínas Totais | 35 |
| 2.1.2 | Umidade | 37 |
| 2.1.3 | Cinzas | 37 |

| | |
|---|----|
| 2.1.4 Determinação da Gordura | 38 |
| 2.2 CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA QUANTIFICAR AS PROTEÍNAS | 39 |
| 2.3 ESCOLHA DA CONCENTRAÇÃO DA MATERIA PRIMA – COEFICIENTE DE PARTIÇÃO | 42 |
| 2.4 PROPRIEDADES FÍSICAS DAS FASES | 46 |
| 2.4.1 Medida de Densidade | 46 |
| 2.4.2 Medida da Viscosidade | 47 |
| 2.4.3 Medida da Tensão Interfacial | 48 |
| 2.5 CURVA BINODAL | 49 |
| 2.6 CONSTRUÇÃO DAS LINHAS DE AMARRAÇÃO (<i>TIE LINE</i>) | 50 |
| 2.7 COLUNA PRDC (COLUNA DE DISCOS ROTATÓRIOS PERFURADOS) | 51 |
| 2.8 <i>HOLD – UP</i> (FRAÇÃO VOLUMÉTRICA RETIDA DA FASE POLIMÉRICA) .. | 51 |
| 2.9 TRANSFERÊNCIA DE MASSA DE PROTEÍNAS NA COLUNA PRDC | 53 |
| CAPITULO III – RESULTADOS E DISCUSSÕES | |
| 3.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA PRIMA | 56 |
| 3.2 CURVA DE CALIBRAÇÃO DE PROTEÍNAS..... | 59 |
| 3.3 LINHAS DE AMARRAÇÃO | 65 |
| 3.4 CURVA BINODAL | 67 |
| 3.5 COEFICIENTE DE PARTIÇÃO | 69 |

| | |
|---|-----|
| 3.6 PROPRIEDADES FÍSICAS DAS FASES DO SAB COM BIPRO | 72 |
| 3.7 HIDRODINÂMICA NO EXTRATOR PRDC | 76 |
| 3.7.1 Fração Volumétrica Retida (<i>Hold-Up</i>) da Fase Dispersa | 76 |
| 3.8 TRANSFERÊNCIA DE MASSA | 87 |
| 3.8.1 Coeficiente Global de Transferência de Massa..... | 90 |
| | |
| CAPITULO IV – PUBLICAÇÕES..... | 95 |
| CAPITULO V - CONCLUSÕES..... | 99 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 101 |
| ANEXO A..... | 110 |
| ANEXO B | 111 |

Índice de Tabelas

| | | |
|------------|--|----|
| Tabela 1.1 | Sistemas de duas fases aquosas e seus componentes | 7 |
| Tabela 1.2 | Características dos Dejetos de Processamento de Alimentos (VIOTTO, 1993) | 12 |
| Tabela 1.3 | Produção Brasileira de Queijos - 1993/97 (em mil toneladas) | 13 |
| Tabela 1.4 | Composição química em porcentagem (%) de WPC e WPI | 14 |
| Tabela 1.5 | Composição das Proteínas do WPI Comercial (%) | 15 |
| Tabela 1.6 | Massa molar das proteínas de soro | 16 |
| Tabela 1.7 | Composições do leite humano e bovino | 18 |
| Tabela 2.1 | Características da coluna PRDC sem chicanas | 51 |
| Tabela 3.1 | Composição Química de BiPRO, produto comercial, segundo <i>Davisco Foods International, Inc.</i> | 56 |
| Tabela 3.2 | Composição Química do BiPRO segundo análises realizadas no Laboratório de Separações Físicas (LASEFI) e no Laboratório de Laticínios – UNICAMP | 57 |
| Tabela 3.3 | Programa gradiente-plató para a construção da curva de calibração | 59 |
| Tabela 3.4 | Linhas de amarração a 25 °C, pH 7, para o sistema PEG 1500 e Fosfato de Potássio contendo 0,6 % de BiPRO | 66 |
| Tabela 3.5 | Concentrações utilizadas para obter o coeficiente de partição a 25 °C e pH 7,0 | 70 |

| | | |
|-------------|---|-----|
| Tabela 3.6 | Coefficiente de partição (K) com sua respectiva propagação de erros ($\pm \Delta K$) e a seletividade correspondente a 25 °C | 70 |
| Tabela 3.7 | Rendimento e Pureza das proteínas do BiPRO em ambas fases do SAB a 25°C | 71 |
| Tabela 3.8 | Estudo da solubilidade de BiPRO no sistema 14 % p / p PEG e 18 % p / p KPi | 71 |
| Tabela 3.9 | Estudo de solubilidade de BiPRO no SAB (14 % p / p PEG-1 8 % p / p KPi) a 25 °C | 72 |
| Tabela 3.10 | Rendimento e Pureza das proteínas do BiPRO em ambas fases do SAB a 25 °C | 72 |
| Tabela 3.11 | Densidades das fases do SAB (em equilíbrio) com proteínas (0,6 - 1,0 % BiPRO) a 25 °C | 74 |
| Tabela 3.12 | Densidades das fases do SAB (em equilíbrio) a 25 °C, pH 7,0 | 75 |
| Tabela 3.13 | Viscosidades das fases do SAB (em equilíbrio) a 25 °C | 75 |
| Tabela 3.14 | Tensão interfacial entre as fases do SAB (em equilíbrio) a 25 °C | 76 |
| Tabela A.1 | Valores de velocidade característica (V_K) obtidas do ajuste de dados experimentais a partir da equação de Gayler e Pratt (1951) de uma PRDC (4 discos) | 110 |
| Tabela A.2 | Valores de velocidade característica (V_K) obtidas do ajuste de dados experimentais a partir da equação de Gayler e Pratt (1951) de uma RDC (4 discos) | 110 |
| Tabela B.1 | Proteínas α -La e β -Lg do BiPRO no extrato e no refinado de uma PRDC. | 111 |

| | | |
|------------|--|-----|
| Tabela B.2 | Erros no Balanço de Massa em Base Livre da Proteína α -La | 111 |
| Tabela B.3 | Coefficientes Volumétricos de Transferência de Massa (Kr^*a) para a PRDC | 112 |

Índice de Figuras

| | | |
|------------|--|----|
| Figura 1.1 | Diagrama de Duas Fases Aquosas (PEG % p/p - Sal % p/p) | 10 |
| Figura 1.2 | Cristal de α -La bovina | 17 |
| Figura 1.3 | Estrutura na forma de fitas da β -Lg..... | 18 |
| Figura 1.4 | Efeito da mistura axial sobre o gradiente de concentração em contato contracorrente: _____ fluxo com dispersão axial;-----fluxo pistão | 32 |
| Figura 2.1 | Célula de Equilíbrio | 44 |
| Figura 2.2 | Diagrama de operação da PRDC para medidas de Hold-up (inclui circuito de linha pontilhada) e Transferência de Massa (exclui linha pontilhada). .. | 55 |
| Figura 3.1 | Curva de calibração para a α -La | 60 |
| Figura 3.2 | Curva de calibração para a β -Lg. | 61 |
| Figura 3.3 | Proteínas do BiPRO, α -La e β -Lg, identificadas em HPLC-WATERS | 62 |
| Figura 3.4 | Proteínas do BiPRO, α -La e β -Lg, identificadas em HPLC-WATERS | 63 |
| Figura 3.5 | Proteínas do BiPRO, α -La (11:32 min) e β -Lg (27:15 min), da corrente extrato da coluna PRDC, obtidas em HPLC-ÄKTA PURIFIER..... | 64 |
| Figura 3.6 | Proteínas do BiPRO, α -La (11:19 min) e β -Lg (27:02 min), da corrente de refinado da coluna PRDC, obtidas em HPLC-ÄKTA PURIFIER | 65 |
| Figura 3.7 | Linhas de Amarração para o Sistema PEG 1500-Fosfato de Potássio a pH 7,0 e 25 °C, contendo 0,6 % de BiPRO | 67 |

| | | |
|-------------|--|----|
| Figura 3.8 | Curva Binodal a 25 °C | 68 |
| Figura 3.9 | Resultados obtidos para as linhas de amarração e a curva binodal a 25 °C e pH 7..... | 69 |
| Figura 3.10 | Cromatograma de análise da polidispersabilidade PEG 1500 – Aldrich ... | 73 |
| Figura 3.11 | Fração Volumétrica Retida <i>Hold-Up</i> em PRDC e RDC | 78 |
| Figura 3.12 | Dependência do <i>Hold-Up</i> com a velocidade de rotação em coluna PRDC; (Vd / Vc = relação de vazões polimérica e salina) | 81 |
| Figura 3.13 | Comparação dos valores preditos e experimentais de <i>hold-up</i> , usando a correlação de KUMAR e HARTLAND (1995). | 83 |
| Figura 3.14 | Representação de dados experimentais utilizando o Método de GAYLER e PRATT (1951) em PRDC | 84 |
| Figura 3.15 | Representação de dados experimentais utilizando o Método de GAYLER e PRATT (1951) em RDC | 85 |
| Figura 3.16 | Velocidade característica para cada velocidade de rotação em coluna PRDC e RDC | 86 |
| Figura 3.17 | Concentração das proteínas α -La e β -Lg do BiPRO no extrato e no refinado (Vd / Vc = 0,5:1; 50 rpm) | 89 |
| Figura 3.18 | Concentração de α -La na Corrente de Extrato para cada Velocidade de Rotação no PRDC e para três (03) Relações de Vazões | 90 |
| Figura 3.19 | Coefficientes Volumétricos de Transferência de Massa K_E^*a (kg de α -La / (m ³ . s. (kg de α -La / kg fase polimérica))..... | 92 |

NOMENCLATURA

- A** : área de transferência de massa por unidade de volume da região de extração [m^2 / m^3]
- ABIQ** : Associação Brasileira das Indústrias de Queijo
- BiPRO** : nome comercial do isolado protéico de soro de queijo fabricado pela Davisco Foods International Inc. – USA
- CLA** : comprimento da linha de amarração
- CMA** : *cow milk allergy*, alergia ao leite de vaca
- C_{p,t}** : concentrações de PEG (% p / p) na fase superior
- C_{p,b}** : concentrações de PEG (% p / p) na fase inferior
- C_{s,t}** : concentrações de sal (% p / p) na fase superior
- C_{s,b}** : concentrações de sal (% p / p) na fase inferior
- D_c** : Diâmetro da coluna (m)
- D_R** : Diâmetro do disco ou rotor [m]
- D_S** : Diâmetro do *stator* ou *chicana* [m]
- d** : diâmetro das gotas [m]
- DBO** : Demanda biológica de oxigênio
- DQO** : Demanda química de oxigênio
- E_E** : Vazão mássica total do extrato [kg de fase polimérica / s]

FAO/WHO : *Food and Agricultural Organization of the United Nations/ World Health Organization*

FDA : *Food and Drug Administration*

FPLC : *Fast Protein Liquid Chromatography*

GRAS : *Generally Recognized As Safe*

g : aceleração da gravidade [m/s^2]

H_C : Altura do compartimento [m]

HTU : Altura de uma unidade de transferência

KPi : Fosfato de Potássio Mono e Dibásico

K : Coeficiente de Partição

$K_{E.a}$: [kg de α -La / ($m^3 \cdot s \cdot (kg$ de α -La / kg de fase polimérica))]

K_{OE} e K_{OR} : Coeficientes globais de transferência de massa

l : comprimento característico [m]

Milli-Q : água destilada e deionizada

m : expoente

n : expoente

N : velocidade do disco [s^{-1}]

N_p : Número de potência

NTU : Número de unidades de transferência

PEG : Polietileno Glicol

- PRDC : Coluna de Discos Perfurados
- P : Potência [w]
- RDC : *Rotating Disc Column*
- Re_R : Número de Reynolds do agitador
- SAB : sistemas aquosos bifásicos
- S_{a/b} : Seletividade
- Tie Line* (LA) : linha de amarração
- WPC : *whey protein concentrate*, concentrado protéico de soro
- WPI : *whey protein isolate*, isolado protéico de soro
- W'_{ET, α-La} : concentração de α-La na saída da fase polimérica em base livre de α-La [kg α-La / kg da fase polimérica]
- W'_{EF, α-La} : concentração de α-La na entrada da fase polimérica em base livre de α-La [kg α-La / kg da fase polimérica]
- V : volume da região de extração em m³
- V_{slip} : Velocidade de deslizamento [m/s]
- V_d : Velocidade superficial da fase dispersa [m/s]
- V_c : Velocidade superficial da fase contínua [m/s]
- V_K : Velocidade característica [mm/s]
- V : Volume da fase dispersa [m³]
- V_t : Volume total [m³]

x_d : Fração de volume retida da fase dispersa (*hold-up*) [adimensional]

$(1 - x_d)$: Fração volumétrica da fase contínua

$(1 - w_{E, \alpha-La})_{iM}$: média logarítmica de $(1 - w_{E, \alpha-La})$ e $(1 - w_{Ei, \alpha-La})$

SUBÍNDICES

b : *bottom*, fase inferior

c : fase contínua

d : fase dispersa

E : fase extrato

i : na interface

0 : global

p : pistão ou verdadeiro

R : fase refinado

t : *top*, fase superior

LETRAS GREGAS

$\alpha-La$: Alfa Lactoalbumina

$\beta-Lg$: Beta lactoglobulina

Φ : fator de correlação adimensional

ε : potência de dissipação por unidade de massa das fases

ρ : densidade [kg/m^3]

γ : tensão interfacial [mN/m]

μ : viscosidade (Pa.s)

$\Delta\rho$: diferença de densidade entre as fases (kg/m^3)

SOBRESCRITOS

' : base livre de α -La

* : equilíbrio

SUBSCRITOS

a : componente a

b : componente b

c : fase contínua

d : fase dispersa

E : fase extrato

F : fundo

i : interface

P : escoamento tipo pistão

R : fase refinado

T :topo

w : água

AMINOÁCIDOS

Ala : Alanina

Arg : Arginina

Asp : Ácido aspártico

Asn : Asparagina

Cys : Cisteina

Glu : Ácido glutâmico

Gly : Glicina

Gln : Glutamina

His : Histidina

Ile : Isoleucina

Lys : Lisina

Leu : Leucina

Met : Metionina

Phe : Fenilalanina

Pro : Prolina

Ser : Serina

Thr : Treonina

Trp : Triptofano

Tyr : Tirosina

Val : Valina

RESUMO

O presente trabalho visou a purificação das proteínas α -Lactoalbumina e β -Lactoglobulina do isolado protéico de soro de queijo (BiPRO, Davisco Food International Inc., USA), utilizando um sistema aquoso bifásico (PEG 1500 / Sal, pH 7,0) em coluna de discos rotativos perfurados (PRDC) à temperatura ambiente (25 °C).

Inicialmente, foi estudada a composição química da matéria prima (BiPRO), que apresenta elevado teor de proteínas (99,6 % base seca), baixo teor de cinzas (1,94 %), umidade (5,1 %) e é quase isenta de gorduras.

Posteriormente, realizou-se a quantificação das proteínas do BiPRO utilizando o Método de Cromatografia Líquida (HPLC), a partir da construção de curvas de calibração com proteínas puras, obtendo-se um coeficiente de determinação (R^2) de 0,996.

As linhas de amarração foram determinadas a partir dos dados experimentais obtidos da quantificação dos componentes do sistema aquoso bifásico (PEG 1500 + Fosfato de Potássio Mono e Dibásico pH 7,0 + Água + Proteínas, 0,6 % p / p).

O método da névoa, foi usado para obtenção dos dados de equilíbrio as quais comparados com os dados experimentais obtidos na construção das linhas de amarração mostraram um desvio na faixa de 0,07 % - 0,31 % para as concentrações elevadas de sal e, 0,01% - 0,22 % para baixas concentrações de sal. Deduziu-se que essa diferença possa ser devida à imprecisão do método de medida da curva binodal.

Prosseguiu-se com a análise da partição do BiPRO (0,6 % p / p da concentração da fase salina) no sistema aquoso bifásico (SAB) utilizando para tanto células de equilíbrio. Demonstrou-se que para o sistema 14 % p / p PEG e 18 % p / p Sal, as proteínas do BiPRO se particionaram favoravelmente, obtendo-se valores de coeficientes de distribuição (K) de 7,9 e 0,025 para as proteínas (α -Lactoalbumina e β -Lactoglobulina) respectivamente

presentes no BiPRO. O teor de pureza da α -Lactoalbumina (α -La) foi de 93,42 %, o rendimento de 81,09 % e a seletividade de 318. Foi determinado que, a proteína α -La transferiu-se para a fase superior rica em polímero e a β -Lactoglobulina (β -Lg) permaneceu principalmente na fase inferior, rica em sal.

O estudo da hidrodinâmica do extrator de discos rotativos tradicional (RDC) e de discos rotativos perfurados (PRDC), foi conduzido mediante medidas da fração volumétrica da fase dispersa retida (*hold-up*). Para isto, utilizou-se o sistema PEG / Sal pH 7,0, isento de proteínas. Foi observada a dependência do *hold-up* com a velocidade de rotação e a relação de vazões. No PRDC se obteve maiores valores de *hold-up* comparado com o RDC, indicando que no PRDC forma-se uma maior área de transferência de massa. Com os valores experimentais de *hold-up* foram obtidas as velocidades características, utilizando para tanto a equação de GAYLER e PRATT (1951). Foi observada a relação inversa da velocidade característica com a velocidade de rotação para as duas colunas testadas. Esta relação inversa ocorreu a baixas velocidades de rotação, o que indica um resultado diferente do normalmente encontrado na literatura, já que tal relação inversa só ocorreria, segundo a literatura, acima de 400 rpm. Em função da baixa tensão interfacial dos sistemas aquosos bifásicos obteve-se esta relação inversa, assim como elevados valores de *hold-up*, mesmo a valores de velocidades de rotação baixos.

Os experimentos de transferência de massa foram feitos utilizando o sistema aquoso bifásico (14 % p / p PEG - 18 % p / p Sal (4,06 % p / p BiPRO)) a várias condições de trabalho (vazões de entrada e velocidades de rotação). A partir dos dados experimentais, foram calculados os coeficientes volumétricos de transferência de massa, observando-se que estes coeficientes aumentaram com a elevação da velocidade de rotação. Mesmo a baixas velocidades de rotação o PRDC permitiu obter maiores valores de *hold-up* e de área de transferência de massa, o que favorece seu uso em purificação de biomoléculas.

A separação das proteínas α -La (na fase superior rica em polímero) e a β -Lg (na fase inferior rica em sal), foi satisfatoriamente obtida como é demonstrado nos resultados

deste trabalho. A velocidade de rotação de 50 rpm e baixas relações de vazões foram as condições operacionais mais favoráveis para a separação das proteínas.

Complementando o presente trabalho estudou-se a viscosidade cinemática do polímero polietileno glicol (PEG), de diferentes massas molares (200 - 3350). Foram obtidos dados experimentais medidos a diferentes temperaturas (293,15 K – 363,15 K). Esses valores geraram uma correlação generalizada baseada nos números de átomos de carbonos com desvio médio absoluto de 1,6 % obtidos entre os valores experimentais e os calculados.

ABSTRACT

This work had as a goal the α -Lactalbumin (α -La) and β -Lactoglobulin (β -Lg) proteins purification from Whey Protein Isolate using a aqueous two-phase system (PEG 1500 / Salt pH 7,0) in a Perforated Rotating Disc Column (PRDC) under room temperature (25 °C).

The chemical composition of the raw material (BiPRO) was studied initially. This analysis presented a high protein values (99,6% dry base), low ash values (1,94%), humidity (5,1%) and almost fat exempt.

In a further step, protein quantification from BiPRO was done using the Liquid Chromatography (HPLC) method and based on calibration curves for pure proteins. A regression (R^2) of 0,996 was obtained.

Tie Lines were built with experimental data obtained from components quantification of aqueous two-phase system (PEG 1500 – Potassium Phosphate Mono and Dibasic pH 7,0 – Water – Proteins 0,6% w/w).

Using the cloud method was possible to obtain experimental data which were utilized in the binodal curve plot. This, in conjunction with the tie lines shown a standard deviation from 0,07 % to 0,31 % for high concentrations of salt and from 0,01 % to 0,22 % for lower ones. Such a difference can be due to the binodal curve measurement method inaccuracy.

The next step was the partition analysis of BiPRO (0,6 % w/w of saline phase concentration) in the aqueous two-phase system, using for this purpose equilibrium cells. It was possible to shown that 14 % w/w PEG and 18 % w/w Salt the BiPRO proteins were partitioned successfully. It was obtained for the distribution coefficient (K) values of 7,9 and 0,025 for both of the proteins present in BiPRO, α -La and β -Lg respectively, and

additionally high purity ((93,42 %), yield (81,09 %) and selectivity (318) of α -La. Then, it was determined that the α -La was transferred to the upper phase rich in polymer and the β -Lg remained mainly in the bottom phase, which is rich in salt.

Subsequently, a study of the traditional RDC and PRDC hydrodynamic was done through the volumetric fraction of the disperse phase measurement (hold-up). A PEG/Salt, pH 7,0 protein exempt was used. It has been observed the hold-up dependency on rotation velocity and flow ratios. For the PRDC higher values of hold-up were obtained compared against RDC, noting that in the PRDC a greater mass transference is formed. With these experimental hold-up values, characteristic velocities were obtained using the GAYLER and PRATT (1951) equation. It was observed that there is an inverse relation between the characteristic and the rotation velocities working with both kind of columns. That inverse relation occurred for low rotation velocities, which is contrary to the results found in the literature. According to the literature that situation can happen only for values above 400 rpm. This results can be explained with the low interfacial tension values obtained for the aqueous two-phase system.

As a last step, experiments of mass transfer using a two-phase aqueous system (14 % w / w PEG - 18 % w /w Salt (4,06 % w / w BiPRO)) were done for different operating conditions (input flow and rotation velocity). Volumetric coefficients were calculated with the experimental data and observing that the coefficient values were increased with the rotation velocity increase. Even for low rotation velocities, the PRDC allowed to obtain higher hold-up and mass transfer area values, allowing its use in biomolecules purification.

Finally, the separation of α -La (top phase rich in polymer) and β -Lg (bottom phase rich in salt) was obtained as shown in the results. The rotation velocity of 50 rpm and low flow ratios operating conditions shows to be the most favorable for protein separation.

As complement to this research work, the cinematic viscosity of poly(ethylene glycol) (PEG) was studied, analyzing different molecular weights (200 to 3350). Experimental data were obtained for different temperatures (293,15 K – 363,15 K). From

those given values a generalized correlation based on carbon atoms number was obtained, which showed a average deviation of 1,6 % from the experimental and calculated data.

INTRODUÇÃO

A estratégia de purificação é responsável por 50 % a 90 % do custo de produção de produtos tipicamente biológicos. Surge assim a necessidade da eficiência, efetividade e economia nas técnicas de biosseparação em grande escala, que também assegurem uma elevada pureza e elevado rendimento, sem que a atividade biológica da molécula seja afetada (DIAMOND e HSU, 1992). Uma das técnicas de purificação que compreende os critérios mencionados, é a partição de biomoléculas entre duas ou mais fases imiscíveis, utilizando um sistema aquoso bifásico.

O sistema aquoso bifásico (SAB) surgiu como meio factível para a separação de biomoléculas e envolve uma técnica que permite isolar a proteína desejada de uma mistura complexa oferecendo vantagens como o meio adequado, tempo de processamento favorável, fácil ampliação de escala, efeitos estabilizadores dos polímeros e elevado teor de água, que contribui para a recuperação das moléculas de proteína. O sistema aquoso bifásico pode ser usado comercialmente em grande escala.

A técnica de purificação com sistema aquoso bifásico foi bem sucedida na separação e purificação de proteínas (COIMBRA, 1995). Estudos econômicos mostram a vantagem do elevado rendimento de espaço-tempo e baixo custo de investimento comparado com outros processos (CHEN, 1992).

Em relação aos métodos clássicos de precipitação, a extração líquido-líquido apresenta vantagens como a baixa perda de atividade do componente e o baixo custo de material. Entre os equipamentos, a coluna de discos rotativos perfurados (PRDC) adequa-se ao manuseio deste sistema de fases.

As principais proteínas do isolado protéico de soro de queijo são a α -lactoalbumina e a β -lactoglobulina, constituindo cerca de 20 % do total de proteína do leite.

Estas proteínas são de elevado valor funcional e nutricional. São bons agentes espumantes e emulsificantes, considerados como ingredientes alimentícios potenciais e como complemento protéico em produtos a base de carnes, em panificação e na fortificação de cereais.

Os formulados infantis são considerados substitutos do leite materno, daí o crescente interesse da obtenção destes formulados com níveis reduzidos da proteína β -Lactoglobulina, considerada alergênica (OUTINEN et alii, 1996).

A indústria queijeira apresentou tendência de crescimento da ordem de 20 % nos anos de 1992 até 1996 (ABIQ), o que indica a importância do aproveitamento do soro de queijo considerado como fonte de valiosas proteínas como a α -Lactalbumina e a β -Lactoglobulina.

O soro, que pode ser do tipo doce ou ácido de acordo com a metodologia de obtenção utilizada, é um subproduto do processamento do queijo, que quando descartado é considerado um dos resíduos mais poluentes da indústria de alimentos, devido à sua alta demanda bioquímica (DBO) e química (DBQ) de oxigênio (COIMBRA, 1995).

Do soro pode ser obtido tanto o concentrado protéico (WPC) quanto o isolado protéico (WPI). Mediante o processo de ultrafiltração e diafiltração do retentado de soro, resulta um WPC com elevado teor de proteínas (≥ 50 %) e mediante o processo de adsorção por troca iônica obtêm-se um WPI que é um produto altamente protéico (≥ 70 %). Na atualidade, a obtenção destes concentrados no Brasil ainda se encontra em etapa de pesquisa.

Nos Estados Unidos têm-se desenvolvido processos em escala comercial para a manufatura do WPI, a partir de soro ácido ou doce, com elevadas propriedades funcionais. O WPI tem sido acrescentado nos ingredientes alimentares assim como em formulados infantis, dietas alimentares, bebidas, em alimentos congelados e em aplicações de produtos gelatinosos e na ração animal. Neste trabalho estuda-se a separação das principais proteínas do soro de queijo, α -Lactalbumina e β -Lactoglobulina, por extração líquido-líquido empregando-se sistemas aquosos bifásicos.

Objetivo e Apresentação da Tese

A presente tese tem como objetivo geral estudar a separação das proteínas α -Lactoalbumina e β -Lactoglobulina a partir do isolado protéico de soro de queijo, empregando extração líquido-líquido. Como objetivos específicos foram fixados os seguintes pontos :

1. Estudar o equilíbrio e a partição destas proteínas do isolado protéico de soro no sistema aquoso bifásico composto por PEG 1500 e Fosfato de Potássio a pH 7,0.
2. Estudar a hidrodinâmica de colunas de discos rotativos empregando sistemas aquosos bifásicos.
3. Estudar a separação daquelas proteínas em coluna de discos rotativos operada continuamente.
4. Por fim, como atividade necessária para a avaliação do desempenho do processo em equipamento contínuo, foram determinadas as propriedades físicas (densidade, viscosidade e tensão interfacial) dos sistemas aquosos bifásicos. Esta parte do trabalho contou com o auxílio de um aluno de iniciação científica. Além das propriedades físicas dos sistemas aquosos bifásicos utilizados na partição das proteínas mencionadas anteriormente, mediu-se também a viscosidade de PEGs com massas moleculares variando de 200 a 3350 Daltons e desenvolveu-se um modelo preditivo desta propriedade, o qual poderá auxiliar o futuro desenvolvimento de uma equação para a estimativa da viscosidade da fase polimérica de sistemas aquosos bifásicos. Tendo sido desenvolvida como uma atividade específica e diferenciada dos outros tópicos da tese, esta parte do trabalho foi incluída como um capítulo à parte e na forma publicada em revista científica.

CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 IMPORTÂNCIA DA PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS NO SORO DE QUEIJO

O soro de queijo tem elevado valor nutricional principalmente em função da qualidade de suas proteínas. A qualidade nutricional de uma proteína depende do padrão e concentração de aminoácidos. Dietas deficientes em um ou vários dos aminoácidos essenciais impedem um crescimento normal em crianças e poderiam levar a enfermidades ou mortalidade.

As proteínas de origem animal são relativamente caras e seu suprimento para a população é um dos maiores problemas mundiais. As proteínas do leite, caseína e proteínas do soro, contém em quantidades variadas todos os aminoácidos necessários aos seres humanos e possuem um excedente de aminoácidos essenciais que as tornam valiosas na suplementação de proteínas vegetais (VIOTTO, 1993).

A, alergia ao leite de vaca, CMA (*cow milk allergy*) é comum na infância e da qual sofrem aproximadamente de 2 a 3 % dos infantes menores de 2 anos e 1 % dos adultos. Diferentes proteínas no leite de vaca (da caseína ou do soro) atuam como compostos alergênicos. A proteína beta-lactoglobulina (β -Lg) é provavelmente a maior responsável por esta alergenidade (MÄKINEN-KILJUNEN e SORVA, 1993; SÉLO et alii, 1998).

BISHOP et alii (1990) estudaram a tolerância ao leite de vaca e outros alimentos em pacientes das idades entre 2 e 6 anos, ingerindo diferentes volumes de leite. Concluíram que a CMA não é uma anomalia transitória e é comum que pacientes com CMA adquiram alergias hereditárias.

A alimentação de crianças muito cedo com o leite de vaca pode incrementar o risco da CMA, como foi relatado por SAARINEN et alii (1999), que fez a comparação

entre crianças alimentadas com formulados infantis e as alimentadas com leite de vaca. Estes formulados são substitutos do leite de vaca. Assim têm-se os formulados de soja e caseína ou de soro de leite, baseados principalmente em fórmulas hidrolisadas e que se assemelham ao leite materno ou seja com baixo teor de β -Lg. A extração deste último é o objetivo principal deste trabalho.

Por outro lado, aditivos protéicos e proteínas de soro de queijo tem demanda crescente por representarem ingredientes de elevada funcionalidade que produzem efeitos físico-químicos desejados nos alimentos, auxiliando na determinação da aparência física e influenciando a estrutura, textura, viscosidade e retenção de aromas dos produtos alimentares (DYBING e SMITH, 1991; MOOR e HA, 1993).

Existem diversos métodos através dos quais a purificação de proteínas de soro pode ser feita. Estes podem ser agrupados em : precipitação seletiva, cromatografia, diferença de solubilidade e sistema aquoso bifásico. A precipitação seletiva é um método pioneiro de separação (1959), utiliza sulfato de amônio. As técnicas cromatográficas podem ser de diferentes tipos : filtração em gel, “*chromatofocusing*”, eletroforese (YOSHIDA, 1990; PEARCE, 1983; MAILLIART e RIBADEAU-DUMAS, 1988; CIFUENTES et alii, 1993), troca iônica (CHIANCONE e GATTONI, 1991), etc. Finalmente a purificação pelo uso de um sistema aquoso bifásico estudados por CHEN (1992) e COIMBRA (1995) entre outros.

1.2 SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS OU SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO (SAB)

O sistema de duas fases aquosas (SAB) foi observado inicialmente em 1896, quando o microbiologista Beijerinck, ao misturar gelatina, agar-agar e água em certas concentrações, obteve um sistema de duas fases aquosas com a fase rica em gelatina na parte superior e a fase rica em agar-agar na parte inferior. Em 1947, Dobry e Boyer-Kawenoki fizeram um estudo sistemático sobre a miscibilidade de pares de polímeros em presença de água e solventes orgânicos, conseguindo a separação de fases, em diversos

casos. Na década dos anos 40, Craig e Craig foram os pioneiros na aplicação de sistemas de duas fases aquosas composto por água e solventes orgânicos para a purificação de proteínas em processos com distribuição contracorrente. Em 1955, Albertsson, pesquisou a influência de polímeros solúveis e solventes orgânicos na obtenção de duas fases aquosas. Desde então estes sistemas vem sendo amplamente investigados e utilizados na purificação de biomoléculas. Uma das principais características destes sistemas é fornecer um ambiente favorável para a separação de materiais biológicos (DIAMOND e HSU, 1992).

Devido à elevada concentração de água em SABs, entre (80 a 90) % em peso, e a baixa tensão interfacial, resolveu-se problemas para a separação de proteínas existentes em sistemas com solventes orgânicos e água. Tais problemas são, por exemplo, desnaturação, precipitação de proteínas e elevada partição das proteínas para uma única fase (WALTER et alii, 1985).

Um SAB obtêm-se a partir da adição de soluções aquosas de dois polímeros hidrófilos, por exemplo PEG (polietileno glicol) e dextrana, ou de um polímero e um sal, por exemplo PEG e fosfato de potássio (KPi). Acima da concentração crítica destes componentes ocorre a separação de fases, com o enriquecimento de um ou outro componente em cada uma das fases resultantes. Os SABs provocam o fracionamento de macromoléculas e partículas celulares devido à diferença de suas propriedades físicas. Uma listagem destes sistemas foi apresentada por ALBERTSSON em 1986 e atualizada em DIAMOND e HSU (1992), vide Tabela 1.1

Tabela 1.1 Sistemas de duas fases aquosas e seus componentes

A. Sistemas polímero-polímero-água

| Polímero | Polímero |
|-------------------------|--------------------------|
| Polipropileno glicol | Metoxipolietileno glicol |
| | Polietileno glicol |
| | Álcool polivinílico |
| | Polivinilpirrolidona |
| | Hidroxiopropil dextrana |
| | Dextrana |
| Polietileno glicol | Hidroxiopropil amido |
| | Maltodextrina |
| | Álcool polivinílico |
| | Polivinilpirrolidona |
| Álcool polivinílico | Dextrana |
| | Ficoll |
| | Pululana |
| Polivinilpirrolidona | Metilcelulose |
| | Hidroxiopropil dextrana |
| Metilcelulose | Dextrana |
| | Metilcelulose |
| Etilhidroxietilcelulose | Dextrana |
| | Hidroxiopropil amido |
| Hidroxiopropil Dextrana | Dextrana |
| Ficoll | Dextrana |

B. Sistemas polímero-soluto de baixa massa molar-água

| Polímero | Soluto de baixa massa molar |
|--------------------------|-----------------------------|
| Polipropileno glicol | Fosfato de potássio |
| | Glicose |
| | Glicerol |
| Polietileno glicol | Fosfato de potássio |
| | Aminoácido |
| | Mono/Dissacarídeo |
| | Peptídeo/Proteína |
| Metoxipolietileno glicol | Cloreto de sódio |
| | Fosfato de potássio |
| Álcool polivinílico | Butilcelosolve |
| Polivinilpirrolidona | Butilcelosolve |
| Dextrana | Álcool propílico |

Os sistemas comumente utilizados são PEG/dextrana/água e PEG/fosfato de potássio/água, no entanto, a limitação econômica faz com que o último seja

preferencialmente utilizado (WALTER et alii, 1985). As propriedades dos SABs dependem de muitos fatores, tais como, tipo do polímero, massa molar e temperatura.

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

A ultrafiltração é a técnica de recuperação do PEG e a extração com solvente orgânico seguida de evaporação (COIMBRA, 1995).

GREVE e KULA (1991) propuseram o uso de extração líquido-líquido com álcool alifático de baixa massa molar, para a recuperação do sal.

1.2.1. Polietileno Glicol

O polietileno glicol, $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, é um poliéter sintético neutro, linear ou de cadeia ramificada e existe em variadas massas molares. Solubiliza-se em água e diferentes solventes orgânicos. O polietileno glicol tem baixa toxicidade pelo que é utilizado na indústria farmacêutica, de cosméticos e de alimentos.

O polietileno glicol, conhecido pelos nomes comerciais de poliglicol R®, carbowax® e pluracol E®, é fornecido como líquido ou pasta (massa molar < 1000) e em pó ou em flocos brancos (massa molar > 1000). Pode ser estocado à temperatura ambiente, embora a 4 °C a ocorrência de oxidação em soluções seja retardada. É biodegradável, muito utilizado em biotecnologia e biomedicina por excluir, em ambiente aquoso, outros polímeros de sua vizinhança, não se solubilizando com eles. Interage com as membranas celulares propiciando a fusão de células, processo chave na biotecnologia (HARRIS, 1992; CRUZ et alii, 2000; POWELL, 1980).

1.2.2. Fosfato de Potássio

Os fosfatos de potássio são compostos preparados a partir do ácido fosfórico cujo ácido foi parcial ou completamente neutralizado com ions metal-álcali,

predominantemente com sódio, potássio ou cálcio. São compostos muito utilizados em ingredientes alimentares para emulsificação, dispersão, etc.

Os fosfatos de potássio monobásico (KH_2PO_4) e dibásico (K_2HPO_4) estão incluídos dentro da classificação dos ortofosfatos. São utilizados na umectação de carnes, considerados bons controladores de pH e tem capacidade de formar solução tampão. São agentes tamponantes, acidificadores ou alcalinizadores quando usados em licores, em queijos e em panificação. Os fosfatos são uns dos ingredientes mais importantes na indústria láctea, utilizados principalmente como controladores da coagulação das proteínas e na dispersão delas. Também inibem o crescimento de microrganismos (DZIEZAK, 1990).

Segundo o *Codex Alimentarius* da FAO/WHO (1984) tanto o fosfato de potássio monobásico quanto o fosfato de potássio dibásico são utilizados em alimentos para crianças e infantes, em formulados com proteína hidrolisada, em formulados lácteos ou em formulados substitutos do leite.

1.3. COEFICIENTE DE PARTIÇÃO

Após um SAB atingir o equilíbrio, uma proteína que esteja presente neste sistema será distribuída em ambas as fases. A partição pode ser descrita com o coeficiente de partição, K , definida pela equação :

$$K = \frac{C_t}{C_b} \quad [1.1]$$

Onde C_t e C_b são as concentrações de proteína na fase superior e na fase inferior respectivamente. Duas proteínas podem ser separadas de uma mistura inicial mediante a sua partição em ambas as fases com valores diferentes de K , JOHANSSON (1989). Quanto maior ou menor que 1 for o coeficiente de partição, mais o componente tenderá a se concentrar na fase superior ou na fase inferior, respectivamente.

1.4. DIAGRAMA DE FASES

Quando um par de polímeros solúveis em água ou um polímero solúvel em água e um soluto de baixa massa molar são misturados com água acima de suas concentrações críticas, produz-se um sistema de duas fases aquosas que pode ser caracterizado mediante um único diagrama de fase. O diagrama de fases contém a informação das composições das fases em equilíbrio e é a base de dados para qualquer tipo de processo de extração líquido-líquido (DIAMOND e HSU, 1992).

No diagrama de fases (vide Figura 1.1), a concentração do sal é marcada na ordenada e a concentração do polímero na abscissa, ambas expressas em porcentagem massa / massa.

A curva binodal DPC é uma curva que contém as composições das fases em equilíbrio. Esta curva contém os pontos D, P, e C, onde D e C são os nós extremos da curva e P o ponto crítico (*plait point*) onde as composições das fases são iguais, teoricamente.

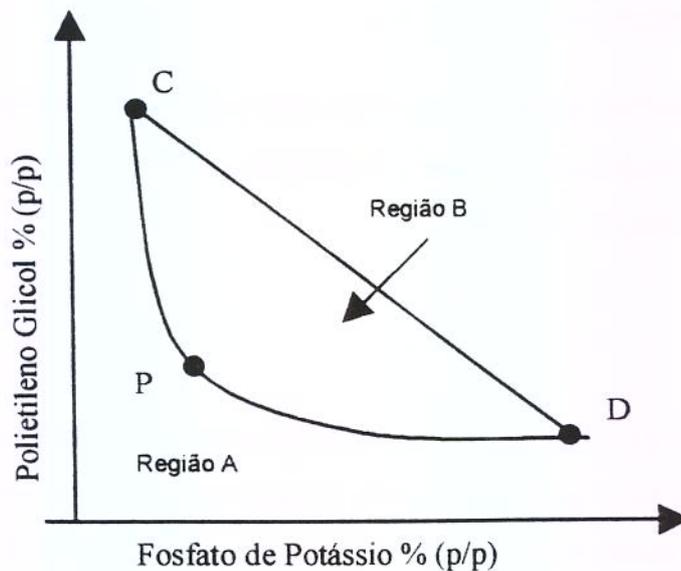


Figura 1.1 Diagrama de Duas Fases Aquosas (PEG % p/p - Sal % p/p)

Acima da curva binodal (região B) as misturas formam duas fases e abaixo desta as misturas resultam numa solução homogênea (região A). A linha que une os nós D e C é chamada de linha de amarração ou *Tie Line* (LA).

O comprimento da LA (CLA) pode ser calculado como (CHEN, 1992) :

$$CLA = \sqrt{(C_{p,t} - C_{p,b})^2 + (C_{s,b} - C_{s,t})^2} \quad [1.2]$$

Onde $C_{p,t}$ e $C_{p,b}$ são as concentrações de PEG (% p / p) na fase superior e inferior respectivamente e $C_{s,b}$ e $C_{s,t}$ são as concentrações de sal (% p / p) na fase superior e inferior respectivamente.

As linhas de amarração contêm as concentrações dos componentes das fases superior e inferior das SABs no equilíbrio e quando a taxa de separação das fases aumenta, tem um aumento da linha de amarração (WALTER et alii, 1985).

1.5. MATERIA PRIMA

1.5.1. Isolado Proteico de Soro de Queijo

O soro de queijo pode ser definido como a parte aquosa do leite (mais de 85 % do volume inicial) que permanece depois da separação do coágulo proveniente da coagulação do leite por ácido ou enzimas proteolíticas. Para a produção de 1 kg de queijo são produzidos 8,5 kg de soro em média.

O soro pode ser de dois tipos : soro doce ou soro ácido. O soro doce, de maior produção nacional, provem da fabricação de queijos ou caseína por coagulação enzimática (Minas Frescal e Meia-Cura, Prato, Mussarella e outros) de pH 5,6 - 6,5, enquanto o soro ácido provêm da produção de queijos por coagulação ácida ou da fabricação da caseína (Ricota e Requeijão) de pH 4,5 - 5,5.

O soro é de natureza perecível o que dificulta encontrar um destino adequado aos volumes consideráveis produzidos diariamente. Alternativas como descarte em rios, esgotos e solo, alimentação animal, evaporação e secagem, desmineralização, extração e refino de lactose, e ultrafiltração tem sido usadas pela indústria láctea (VIOTTO, 1993).

Tabela 1.2 Características dos Dejetos de Processamento de Alimentos (VIOTTO, 1993)

| | DBQO (mg/L) |
|---|----------------|
| Resíduos do Processamento de Laticínios | |
| Processamento de Leite Fluido | |
| Processamento de sorvetes | 2500 |
| Processamento de queijo "Cottage" | 6000 |
| Processamento de soro em pó | 40 |
| Outros Resíduos de Processamento de Alimentos | |
| Confeitaria | 2500 |
| Enlatamento de carnes | 1500 |
| Planta de produtos açucarados | 4000 |
| Abatedouro de aves | 5000 |
| Resíduos Brutos | |
| Soro doce | 35000 |
| Soro ácido | 45000 |
| Água de processamento de peixe | 50000 |
| Esgoto doméstico | 300 |

O soro de queijo é um dos resíduos mais poluentes da indústria de alimentos e o mais potente dos dejetos lácteos (vide Tabela 1.2). 100 kg de soro líquido contendo aproximadamente 3,5 kg de demanda biológica de oxigênio (DBO) e 6,8 kg de demanda química de oxigênio (DQO), tem uma força poluidora equivalente ao esgoto produzido por 45 pessoas (VIOTTO, 1993).

A produção nacional de soro vem aumentando anualmente como resultado do crescimento da indústria queijeira (vide Tabela 1.3).

Tabela 1.3 Produção Brasileira de Queijos - 1993/97 (em mil toneladas)

| Tipo | 1993 | 1994 | 1995 | 1996 | 1997 |
|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Mussarela | 61.0 | 73.2 | 84.2 | 92.6 | 101.8 |
| Prato e variedades | 45.0 | 54.0 | 59.4 | 68.3 | 75.1 |
| Minas Padrão | 3.0 | 3.5 | 3.8 | 4.1 | 4.5 |
| Minas Frescal | 16.2 | 18.6 | 20.4 | 21.9 | 24.1 |
| Petit-Suisse | 10.0 | 12.0 | 14.4 | 17.3 | 19.0 |
| Parmesão | 12.3 | 14.1 | 16.5 | 16.6 | 18.3 |
| Provolone | 3.3 | 3.8 | 4.1 | 5.0 | 5.5 |
| Requeijão Cremoso | 14.5 | 17.1 | 19.0 | 20.3 | 22.4 |
| Requeijão Outros | 8.2 | 9.4 | 10.3 | 12.4 | 14.2 |
| Processados | 2.7 | 3.6 | 5.7 | 6.2 | 6.8 |
| Ricota | 4.1 | 4.7 | 5.2 | 5.6 | 6.1 |
| Outros | 4.2 | 4.9 | 5.4 | 5.7 | 6.6 |
| Queijos especiais | 6.2 | 7.3 | 8.3 | 9.1 | 10.3 |
| TOTAL | 190.7 | 226.2 | 256.7 | 285.1 | 314.7 |

Fonte: Associação Brasileira das Indústrias de Queijo (ABIQ, 1997)

Da ultrafiltração de soro de queijo se obtêm concentrados protéicos, o retentado, solução rica em proteínas; e, o permeado, solução rica em lactose. De elevado valor nutritivo, com propriedades funcionais de considerável interesse na indústria láctea e de alimentos, o retentado torna-se em um substituto potencial de ingredientes como o leite em pó, albumina de ovo e soja. A ultrafiltração diminui em 10 % a DBO. Atualmente está sendo explorado principalmente nos países desenvolvidos (VIOTTO, 1993).

O concentrado protéico de soro (*whey protein concentrate* : WPC), é obtido principalmente por diafiltração, após a ultrafiltração do soro de queijo. O WPC possui concentração 50 % a 75 % de proteínas com a respectiva diminuição de lactose, minerais e outros componentes de baixa massa molar. Já o isolado protéico do soro (*whey protein isolate*: WPI) é obtido por troca iônica em reator de leite agitado. O pH do soro é ajustado

para fornecer a carga apropriada à molécula de proteína que passa através do reator para adsorver as moléculas de proteínas e o soro sem proteínas é extraído do reator. O pH é reajustado para extrair as proteínas da resina e serem então ultrafiltradas. O concentrado é atomizado em *spray drier* e o resultante é um concentrado que contém mais que 90 % de proteínas em base seca. Ambos concentrados são considerados como substâncias GRAS (*Generally Recognized As Safe*) pela FDA, que podem ser usados como ingredientes em formulados alimentares (MORR e FOEGEDING, 1990).

Nos últimos 30 anos os Estados Unidos tem desenvolvido processos em escala comercial para a obtenção de WPC e WPI, a partir de soro ácido ou doce, de elevadas propriedades funcionais, sendo consumidos em ingredientes alimentícios e na ração animal. Por conveniência o WPC que contém de (35 a 55) % de proteínas é utilizado na fabricação da ração animal e o WPI com mais de 70 % de proteínas é utilizado em ingredientes funcionais e nutricionais, isto é em produtos farmacêuticos e em produtos alimentares assim como formulados infantis, bebidas, alimentos congelados e em aplicações de produtos gelatinosos (MORR e HA, 1993).

A composição química em porcentagem (%) de WPC e WPI comercial apresentada por MOOR e HA (1993) é fornecida na Tabela 1.4 a seguir:

Tabela 1.4 Composição química em porcentagem (%) de WPC e WPI

| | WPC | WPI |
|-------------------------|-----------|-----------|
| Umidade | 4,14-6,01 | 2,4-5,57 |
| Proteínas | 72,0-76,6 | 88,6-92,7 |
| Compostos não protéicos | 0,93-4,56 | 0,29-0,34 |
| Lactose | 2,13-5,75 | 0,42-0,46 |
| Lípidos totais | 3,30-7,38 | 0,39-0,67 |
| Fosfolípidos | 0,80-1,54 | 0,11-0,31 |
| Cinzas | 2,52-6,04 | 1,37-2,15 |
| Sódio | 0,15-1,71 | 0,36-0,42 |
| Potássio | 0,07-0,46 | 0,10-0,16 |
| Cálcio | 0,23-1,05 | 0,20-0,24 |
| Magnésio | 0,02-0,40 | 0,02-0,03 |
| Fósforo | 0,20-1,30 | 0,05 |

Indústrias como “Land O’Lakes Inc.”, “Daviisco Food International” e “New Zealand Milk Products” dos Estados Unidos e México produzem isolado protéico de soro. A primeira o comercializa em pó com 92 % de proteínas e ≤ 1 % de Lactose (POWERPRO™), enquanto a segunda o comercializa em pó com ≥ 95 % de proteínas e ≤ 1 % de Lactose (BiPRO). A última o obtêm para fins de pesquisa.

1.5.2 Principais Proteínas do Isolado Protéico de Soro de Queijo

As proteínas de soro são definidas como o remanescente do soro de leite após a coagulação da caseína a pH 4,6 e 20 °C (EIGEL et alii, 1984).

As proteínas de soro constituem cerca de 20 % da proteína total de leite e compreendem um grupo variado, em que predominam a α -Lactoalbumina e a β -Lactoglobulina. A maioria são proteínas globulares e sofrem desnaturação térmica (DYBING e SMITH, 1991).

A composição de proteínas no WPI comercial foram apresentados pelos autores MOOR e HA, (1993) e são fornecidas na Tabela 1.5 abaixo.

Tabela 1.5 Composição das Proteínas do WPI Comercial (%)

| | % | Média \pm Desvio Padrão |
|-------------------------|-------------|---------------------------|
| Imunoglobulina | 5,9 – 7,5 | 6,9 \pm 0,7 |
| Albumina Soro Bovina | 7,2 – 10,9 | 8,6 \pm 1,6 |
| β -Lactoglobulina | 67,6 – 74,8 | 70,2 \pm 3,3 |
| α -Lactalbumina | 8,3 – 17,5 | 14,3 \pm 4,3 |

A massa molar das proteínas de soro são apresentadas na Tabela 1.6 (MORR e HA, 1993; VIOTTO, 1993; DYBING e SMITH, 1991).

Tabela 1.6 Massa molar das proteínas de soro

| Proteína | (% p / p) | (g / L) | Massa molar (Dalton) |
|-------------------------|-----------|---------|----------------------|
| β -Lactoglobulina | 56-60 | 2-4 | 18.277 |
| α -Lactoalbumina | 18-24 | 0,6-1,7 | 14.175 |
| Imunoglobulinas | 6-12 | 0,4-1,0 | 80.000-900.000 |
| Albumina de soro bovino | 6-12 | 0,4 | 66.300 |
| Caseína solúvel | 1-2 | | 15.000 |
| Proteínas menores | < 0,5 | | 30.000-100.000 |

As proteínas de soro são pequenas proteínas sintetizadas na glândula mamaria e influenciam na estrutura, aparência, textura, viscosidade, sabor ou retenção de aromas de produtos alimentícios. As propriedades funcionais foram classificadas em dois grupos principais e apresentadas no artigo publicado por MOOR e HA (1993). Essas são propriedades relativas à hidratação e propriedades relativas à superfície. A primeira influi na dispersão, solubilidade, viscosidade, aparência e gelatinação de produtos alimentícios. A segunda influencia na capacidade de emulsão, de formação de espuma e adsorção em interfaces ar-água e óleo-água. Outras propriedades funcionais são : difusão, desnaturação, força de enlace entre proteína-proteína e ion-proteína.

1.5.2.1. α -Lactalbumina (α -La)

A α -Lactalbumina é uma proteína de soro de queijo presente em concentração de (1 a 1,5) g / L. Representa cerca de 20 - 25 % do total de proteínas de soro. Esta proteína consiste de 123 resíduos de aminoácidos (DYBING e SMITH, 1991; MOOR e HA, 1993; EIGEL et alii, 1984) como apresentado abaixo:

Asp(9), Asn(12), Thr(7), Ser(7), Glu(8), Gln(5), Pro(2), Gly(6), Ala(3), Cys(8), Val(6), Met(1), Ile(8), Leu(13), Tyr(4), Phe(4), Lys(12), His(3), Trp(4), Arg(1)

Esta proteína é muito susceptível à desnaturação por calor (65,2 °C, pH 6,7) sendo (80 – 90) % reversível sob resfriamento (MOOR e HA, 1993).

A α -La estruturalmente assemelha-se à lisozima do ovo. Apresenta ligações fortes de cálcio e é afetada por ions cálcio. Biologicamente, a α -La participa na síntese de lactose (DYBING e SMITH, 1991).

No *PROTEIN DATA BANK* (*State University of New Jersey, USA*) a α -Lactoalbumina tem o código 1F6S, cristal de α -La bovina, medido pelo método de difração com raio X. A estrutura em forma de fitas está apresentada na Figura 1.2.

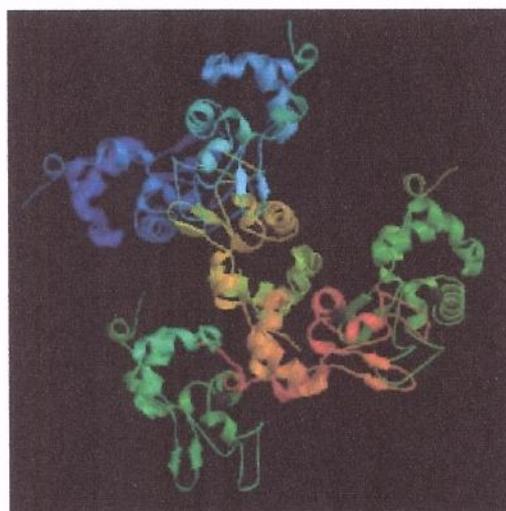


Figura 1.2: Cristal de α -La bovina

1.5.2.2 β -Lactoglobulina (β -Lg)

A β -Lactoglobulina é uma proteína de soro de queijo presente em concentração de 2 a 4 g / L. É proteína presente em maior quantidade no soro, cerca de 50 % do total de proteínas. É constituída por 162 resíduos de aminoácidos que seguem a composição apresentada a seguir (DYBING e SMITH, 1991; MOOR e HA, 1993; EIGEL et alii, 1984) :

| |
|---|
| Asp(10), Asn(5), Thr(8), Ser(7), Glu(16), Gln(9), Pro(8), Gly(4), Ala(15), Cys(5), Val(9), Met(4), Ile(10), Leu(22), Tyr(4), Phe(4), Lys(15), His(2), Trp(2), Arg(3) |
|---|

É uma proteína termolábil, e a presença de calor pode alterar sua digestibilidade. Apresenta mudanças conformacionais reversíveis à temperatura menor de 70 °C e a

temperaturas elevadas pode desnaturar-se e polimerizar-se irreversivelmente. Biologicamente a β -Lg participa nas ligações de retinol e pode estar envolvida no transporte da vitamina A.

É considerada como o maior componente alergênico dos alimentos infantis. No leite materno está presente em quantidades mínimas enquanto que no leite bovino esta proteína é um dos constituintes em maior proporção, vide Tabela 1.7 (COIMBRA, 1995).

Tabela 1.7 Composições do leite humano e bovino

| Proteína | 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 |

No *PROTEIN DATA BANK* a β -Lg tem o código 1DV9. Esta proteína é encontrada no soro de leite de ruminantes e outras espécies. A estrutura em forma de fitas é apresentada na Figura 1.3.

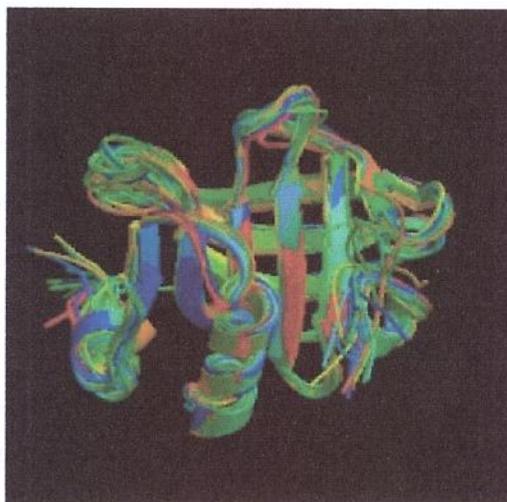


Figura 1.3: Estrutura na forma de fitas da β -Lg

1.5.3. Quantificação de proteínas

Existem vários métodos de quantificação de proteínas α -La e β -Lg que foram relatados na literatura. OUTINEN et alii (1996) utilizaram o método de filtração em gel em um cromatógrafo FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) em coluna Superdex 75 (Pharmacia Biotech). Os autores KIM et alii (1987) determinaram a concentração das proteínas α -La e β -Lg e Albumina de Soro Bovino mediante cromatografia líquida. COIMBRA (1995) estudou vários métodos para a quantificação de proteínas em sistemas aquosos bifásicos. Primeiro utilizou o método de Bradford com o qual conseguiu determinar proteínas totais; logo, estudou o método de eletroforese em gel de poliacrilamida, no qual obteve resultados não muito claros; e, por último estudou o método de cromatografia líquida com troca iônica com o qual obteve resultados satisfatórios para análise de ambas as fases (polimérica e salina).

1.6 EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

A extração líquido-líquido é uma operação de transferência de massa, chamada também extração por solvente, que consiste na separação dos constituintes (solutos) de uma solução líquida de entrada mediante o contato com um segundo líquido imiscível ou parcialmente imiscível (solvente). As correntes resultantes deste contato são : o extrato, que é o solvente rico no produto e o refinado ou solução residual contendo pequenas quantidades de soluto. Para que a operação de separação seja bem sucedida é preciso escolher o solvente e o extrator adequado.

A extração líquido-líquido é afetada pelas condições de processo. Propriedades como densidade, viscosidade e tensão interfacial afetam diretamente estas condições, com valores requeridos tanto para o extrato quanto para o refinado. A diferença de densidades entre as fases deve ser menor que 0,25 g / mL e em certos casos menor que 0,1 g / mL. Valores muito pequenos desta diferença aumentam o risco de formação de uma dispersão estável. Nos processos de extração na indústria de alimentos trabalha-se principalmente com solventes de baixa viscosidade e para propósitos de projeto, a fase mais viscosa é

considerada a fase dispersa. Devido ao fato do número escasso de dados de tensão interfacial, prefere-se trabalhar com valores baixos de tensão interfacial (HAMM, 1983).

Os critérios de escolha dos solventes para a extração líquido-líquido dependem de vários fatores como a seletividade, custo de recuperação, toxicidade e ponto de ebulição do solvente (não elevado). Para a separação de proteínas usam-se solventes que não modifiquem a sua estrutura molecular. Estudos mostram que para o fracionamento de proteínas, os sistemas aquosos bifásicos polímero-polímero como dextrana e PEG adequam-se à sua separação (JOHANSSON, 1989).

TREYBAL (1981) e CUSACK e FREMEAUX (1991) mostraram os critérios de escolha de solventes adequados à extração líquido-líquido :

Grau de seletividade, definido como $S_{a/b} = K_a/K_b$, onde K_a é o coeficiente de distribuição do componente 'a', referente ao solvente de entrada, e K_b é o coeficiente de distribuição do componente 'b'. O componente 'a' é o soluto a ser extraído da alimentação e o componente 'b' é o soluto que permanece no refinado. Para que a separação seja possível a seletividade deve ser maior que 1.

Coefficiente de distribuição ou de partição, é um parâmetro fundamental de equilíbrio.

Recuperabilidade do solvente, para sua fácil regeneração e reutilização.

Tensão interfacial, baixas tensões interfaciais exigem menor energia para criar a dispersão da gota. Os autores mencionaram que para valores menores que 1 dyna/cm (1 mN/m) as emulsões dispersadas são quase impossíveis de serem sedimentadas. Para valores elevados, 50 dynas/cm (50 mN/m), provoca-se a coalescência de gotas e a dispersão é dificultada.

Reatividade química, o solvente deve ser quimicamente estável e inerte em relação aos componentes do sistema e também ao equipamento.

Viscosidade, deve ser baixa para fácil manuseio e armazenagem. A viscosidade é importante no processo de separação de fases pois limita a velocidade de sedimentação das gotas e seu escoamento (WALTER et alii, 1985).

O solvente deve ser atóxico, ter baixa inflamabilidade, baixo custo e estar facilmente disponível.

As características supra-mencionadas, que afetam em geral qualquer processo de extração líquido-líquido, assumem no caso dos sistemas aquosos bifásicos algumas particularidades. A seletividade relevante deve ser, por exemplo, avaliada em relação às biomoléculas que se deseja separar. No caso deste trabalho a seletividade das proteínas α -La e a β -Lg é que deve ser considerada na avaliação da viabilidade do processo. Quanto à tensão interfacial, o seu valor é baixo para sistemas aquosos bifásicos, facilitando a dispersão e exigindo baixos níveis de agitação. E no caso específico de SABs tipo PEG-Kpi, os valores de tensão interfacial não são suficientemente baixos a ponto de dificultar a decantação de fases em equipamentos de extração contínuos. Por fim, a viscosidade relativamente elevada da fase polimérica sugere que esta deve ser usada como fase dispersa, de forma a facilitar a coalescência das gotas e a decantação das fases na zona de separação do equipamento.

1.6.1. Tipos de Extratores

Em geral, os extratores são projetados para conseguir máxima capacidade, elevada taxa de transferência de massa e baixa mistura axial.

Os parâmetros físico-químicos, como a diferença de densidade entre as fases, a viscosidade e a tensão interfacial determinam a escolha e desempenho dos equipamentos.

A sedimentação, operação unitária que separa fases imiscíveis, é uma técnica comum em química, de operação simples e de baixo custo, mas está restringida a sistemas com velocidade de sedimentação elevada. Existem estudos sobre esta operação unitária em

batelada e em contínuo para o sistema PEG-KPi. O segundo oferece vantagens atrativas tais como o baixo tempo de separação das fases, a simplicidade e o gasto mínimo de energia.

A separação de fases utilizando extratores implica um processo em contínuo. Na separação de enzimas WALTER et alii, (1985) destacaram vantagens tais como o elevado rendimento espaço-tempo em relação ao tamanho do equipamento e baixo custo de operação.

A extração contínua de correntes-cruzadas oferece uma alternativa vantajosa nos processos de separação de enzimas pela elevada capacidade de extração e utiliza equipamentos de pequena escala para os processos de extração. A extração em contracorrente de múltiplo estágios é um método poderoso para a separação em escala de produção, é empregada principalmente na extração de substâncias biológicas de baixa massa molar como os antibióticos. Este método tem elevado potencial para a purificação de enzimas em sistemas aquosos, tem vantagem de processamento em contínuo comparado com o método de cromatografia. Na indústria química diferentes tipos de colunas de extração são utilizadas, em particular as colunas tipo Scheibel ou Kühni parecem ser vantajosas devido ao fácil controle de mistura e separação. Outros tipos de unidades de extração comuns para a operação com SABs são os sedimentadores-misturadores e os extratores centrífugos simples ou de estágios múltiplos. Os primeiros são de fácil *scale-up*, mas poucos dados tem-se achado na literatura empregando estes equipamentos. Outro extrator utilizado com sistemas PEG-sal para a extração de proteínas é o extrator *Graesser* (COIMBRA, 1995).

A RDC (*rotating disc column*) coluna de discos rotatórios, apresenta-se também como uma alternativa viável na extração de proteínas com sistema aquoso bifásico pelo fato de produzir elevada taxa de transferência fornecida pela energia introduzida na coluna devido à agitação mecânica. Esta agitação é produzida por rotor no qual o eixo suporta uma série de dispositivos rotativos, no interior da coluna (discos rígidos ou discos perfurados). O grau de dispersão e o grau de transferência de massa são fatores de importância em

extração líquido-líquido. Este tipo de coluna é de fácil ampliação de escala (CUSACK e KARR, 1991).

1.6.2. Coluna de Discos Perfurados (PRDC)

A coluna de discos perfurados PRDC é uma modificação da coluna de discos RDC. A RDC foi desenvolvida pela *Royal Dutch/Shell Group at Amsterdam Laboratory* nos anos de 1948 - 1952. Esta coluna no formato de tubo é de simples construção e consiste em séries de rotores montados sobre um eixo central e cuja parede interior contém uma série de anéis estatores ou chicanas que limitam a mistura axial e definem os estágios de mistura no equipamento (CUSACK e FREMEAUX, 1991). Segundo PINA (2001), o extrator PRDC apresenta maior eficiência e maior capacidade de operação em comparação aos extratores diferenciais.

A geometria da coluna RDC, segundo KAWASE (1990), pode ser determinada a partir das seguintes especificações de projeto:

$$1,5 \leq \frac{D}{D_R} \leq 3$$

$$2 \leq \frac{D}{H_C} \leq 8$$

$$D_R < D_S$$

Já KOSTERS (1983) apresenta as seguintes relações:

$$\frac{D_S}{D} = 0,7$$

$$\frac{D_R}{D} = 0,6$$

Onde:

D : diâmetro da coluna

D_R : diâmetro do disco do rotor

D_S : diâmetro do *stator*

H_C : altura do compartimento

Segundo WALTER et alii (1985), o principal parâmetro a considerar no estudo de desempenho de uma RDC é a velocidade de rotação. Já KORCHINSKY e ISMAIL (1988) observaram que em colunas pequenas a velocidade de rotação tem influência significativa, enquanto que em colunas maiores a dependência é devida à taxa de fluxo e ao tipo de distribuidor usado para o controle do diâmetro da gotícula.

A agitação em colunas RDC produz uma circulação complexa : há escoamento de líquido devido ao fluxo radial causado pela força centrífuga próxima da haste; há uma força centrípeta dos líquidos na vizinhança da parede da coluna; e por fim, há vórtices horizontais originados entre os estatores adjacentes. Esta combinação de movimentos resulta na geração de vórtices toroidais ao longo da coluna. No extrator líquido-líquido são importantes os estudos de hidrodinâmica e de transferência de massa do sistema para o projeto de colunas de extração.

1.7. HIDRODINÂMICA EM EXTRATORES

1.7.1. Fração Volumétrica Retida da Fase Dispersa *Hold-up* (x_d) e Velocidade Característica (V_K)

O *hold-up* é a fração de volume retida da fase dispersa na região de extração do extrator. É considerado como um fator fundamental para o estudo de hidrodinâmica em extratores líquido-líquido (MISEK, 1994). É um parâmetro que permite prever o tamanho da gota e o ponto de inundação do equipamento. A inundação limita as condições de operação do equipamento. Mediante o *hold-up* se pode calcular a área transversal por unidade de volume e as velocidades absolutas das fases. Essas velocidades são chamadas de velocidade de deslizamento (V_{slip}) e são necessárias para o cálculo do coeficiente global

de transferência de massa. O *hold-up* é uma variável sensível a leves mudanças nas condições durante o processo.

O conceito da V_{slip} descreve os fluxos das fases escoando em contracorrente em um tipo de coluna determinado. A velocidade é igual ao somatório das velocidades superficiais das fases na dispersão.

A V_{slip} é representada pela equação abaixo, para fluxos em contracorrente, de fases imiscíveis, em coluna de extração líquido-líquido (CUSACK e FREMEAUX, 1991; GODFREY e SLATER, 1991; MISEK, 1994):

$$V_{slip} = \frac{V_d}{X_d} + \frac{V_c}{1 - X_d} \quad [1.3]$$

Onde :

V_{slip} : velocidade de deslizamento [m/s]

x_d : fração de volume (*hold-up*) da fase dispersa [adimensional]

V_d : velocidade superficial da fase dispersa [m/s]

V_c : velocidade superficial da fase contínua [m/s]

$(1 - x_d)$: fração volumétrica da fase contínua

GAYLER e PRATT (1951) propuseram uma correlação que serve para diferentes tipos de colunas de extração. Esta equação que relaciona a velocidade de deslizamento com o *hold-up* da fase contínua $(1 - x_d)$ e é também conhecida como equação linear, dada por:

$$V_{slip} = V_k (1 - X_d) \quad [1.4]$$

Os autores combinaram as equações 1.3 e 1.4 para obter graficamente a velocidade característica (V_K). O gráfico $Vd + Vc(x/(1-x))$ versus $x(1-x)$ ajusta-se a uma linha reta que passa pela origem e cuja inclinação fornece o valor V_K .

O termo $(1-x_d)$ é considerado para a correção da velocidade de deslizamento devido a existência de uma população de gotas infinitas que escoam em contracorrente com a fase contínua. O movimento das gotas depende da tortuosidade do caminho a elas oferecido, o qual é determinado pela velocidade de rotação, espaçamento entre os discos e pela complexa natureza do movimento das fases.

O *hold-up* pode ser medido em determinados pontos da coluna chamado de *hold-up* local, ou ao longo do equipamento chamado de *hold-up* médio (COIMBRA, 1995).

STEINER et alii (1988) e TSOURIS et alii (1990) apresentaram algumas das técnicas usuais para a determinação do *hold-up*. A mais simples é de estancamento rápido, na qual o *hold-up* é calculado por meio da equação:

$$X_d = \frac{V}{V_t} \quad [1.5]$$

Onde:

x_d : *hold up* [adimensional]

V : volume da fase dispersa [m^3]

V_t : volume total [m^3]

No método de estancamento a coluna é repentinamente bloqueada após atingir a constância da interface das fases no extrator. O volume retido da fase dispersa é então lido obtendo-se o *hold-up* médio.

Outras medidas de *hold-up* existentes na literatura são : amostragem rápida, aplicável a sistemas de excelentes condições de mistura e dispersão; queda de pressão,

calculado através da densidade média do sistema; medida hidrostática, para equipamentos com pouca turbulência; radiação gama; condutividade térmica; capacitância; medidas ultra-sônicas, entre outras.

KUMAR e HARTLAND (1995) baseados em dados experimentais para 8 colunas de extração incluindo a RDC, apresentaram uma correlação unificada para a predição do *hold-up* da fase dispersa. Demonstraram que o *hold-up* pode ser expresso em termos de dissipação da potência mecânica, razão de fluxo das fases, propriedades físicas e da geometria de coluna. A correlação que descreve o *hold-up* como uma função de vários grupos adimensionais é :

$$X = \Pi\Phi\Psi\Gamma \quad [1.6]$$

Π inclui a potência de entrada por unidade de massa, Φ o efeito das taxas de fluxos das fases, V_d , V_c ; Ψ as propriedades físicas, e Γ as características geométricas da coluna. Π , definidas a continuação:

$$\Pi = C_{\Pi} + \left[\frac{\varepsilon \left(\frac{\rho_c}{g\gamma} \right)^{1/4}}{g} \right]^{n1} \quad [1.7]$$

ε , é a potência de dissipação por unidade de massa das fases. Em colunas agitadas a potência de dissipação por unidade mássica é relacionada à potência de entrada ao agitador, P , como :

$$\varepsilon = \frac{4P}{D_c^2 \pi H \rho_c} \quad [1.8]$$

Onde, P pode ser obtido das correlações entre o número de potência, N_p , e o número de Reynolds do agitador, Re_R .

Para o N_p tem-se a seguinte equação :

$$N_p = C_1 \text{Re}_R^{C_2} \quad [1.9]$$

Para colunas de discos rotatórios:

$$C_1 = 23,1 \quad C_2 = -0,568 \quad \text{se } \text{Re}_R < 6,74 \times 10^4 \quad [1.10]$$

$$C_1 = 0,261 \quad C_2 = -0,155 \quad \text{se } \text{Re}_R > 6,74 \times 10^4 \quad [1.11]$$

O número da potência decresce rapidamente com o número de Reynolds na região laminar, enquanto que na região de turbulência decresce vagarosamente com o número de Reynolds. Para desprezar essa descontinuidade devido à existência de valores diferentes dos parâmetros nas duas regiões, da equação 1.9 pode ser substituída por :

$$N_p = \frac{C_1}{\text{Re}_R} + C_2 \left(\frac{1000 + 1,2 \text{Re}_R^{C_3}}{1000 + 3,2 \text{Re}_R^{C_3}} \right)^{C_4} \quad [1.12]$$

Os valores dos parâmetros C_1 a C_4 para colunas RDC são :

$$C_1 = 109,36 \quad C_2 = 0,74 \quad C_3 = 0,72 \quad C_4 = 3,30 \quad [1.13]$$

O segundo fator da equação, ϕ , é representado por :

$$\Phi = \left[V_d \left(\frac{\rho_c}{g\gamma} \right)^{1/4} \right]^{n_2} \exp \left[n_3 V_c \left(\frac{\rho_c}{g\gamma} \right)^{1/4} \right] \quad [1.14]$$

Com ψ igual a :

$$\Psi = C_{\Psi} \left(\frac{\Delta\rho}{\rho_c} \right)^{n_4} \left(\frac{\mu_d}{\mu_w} \right) \quad [1.15]$$

Onde μ_w é igual a 1×10^{-3} [Pa.s], que é o valor da viscosidade da água a 20°C usado como fator de correção dos efeitos do μ_d sobre ϕ . E, finalmente Γ :

$$\Gamma = C_{\Gamma} e^{n_6} \left[l \left(\frac{g\rho_c}{\gamma} \right)^{1/2} \right]^{n_7} \quad [1.16]$$

C_{Π} é incluída em Π desde que o *hold-up* seja finito e quando a potência de entrada por unidade de massa, ϵ , for zero. O termo exponencial é usado para descrever os efeitos de V_c , com a restrição de que o *hold-up* também seja finito a uma velocidade zero na fase contínua. Os parâmetros C_{Ψ} e C_{Γ} incluem os efeitos de transferência de massa e as características da geometria da coluna.

A correlação unificada de *hold-up* proposta por KUMAR e HARTLAND (1995) reproduziu o conjunto de dados experimentais com desvio relativo absoluto médio de 18,1%. O erro máximo obtido foi de 22,7 % para RDC e RDC assimétricas, enquanto que o erro mínimo foi de 14,1 % para as colunas tipo *spray*.

GODFREY e SLATER (1991) observaram que todos os tipos de equipamentos de extração mostram um comportamento hidrodinâmico que segue a equação :

$$V_s = V_k (1 - \phi)^m \quad [1.17]$$

Válida para $\phi < 0,3$ (condição normal) e $0 < m < 4$, aproximadamente.

Os valores de m são correlacionados para colunas RDC como :

$$m = k \left(\rho_c d \frac{V_k}{\mu_e} \right)^n \quad [1.18]$$

Os autores consideraram que m depende da uniformidade da distribuição do fluxo e da natureza da dependência do coeficiente de arraste das gotas, C_{DK} , sobre o número de Reynolds :

$$Re_k = \left(\rho_c d \frac{V_k}{\mu_e} \right)^n \quad [1.19]$$

Onde:

d : diâmetro da gotícula [m]

k : relação de viscosidades μ_d/μ_c

V_k : velocidade característica [m/s]

ρ_c : densidade da fase contínua [kg/m^3]

Os autores calcularam estatisticamente os superíndices m para $0 < \phi < 0,25$ e observaram que m diminui aproximadamente do valor 4 até cerca de zero, e permanece em zero quando a agitação aumenta. A equação aproximada que correlaciona m com o número de Reynolds para uma RDC é :

$$m = 0,19 \text{Re}_k^{0,5} \quad [1.20]$$

A velocidade característica, V_k , pode ser determinada mediante o uso de uma correlação empírica para RDCs de 152 mm e 600 mm de diâmetro de coluna com diferentes geometrias e tamanhos de gotas, com erro relativo de 5,2 % a partir de 117 dados (GODFREY e SLATER, 1991) :

$$\frac{V_k}{V_T} = 1,0 - 1,443(N^3 D_R^5)^{0,30} - 0,494 \left(\frac{d}{D_s - D_R} \right)^{0,77} \quad [1.21]$$

Onde:

V_T : velocidade terminal das gotas, [m/s]

1.8 TRANSFERÊNCIA DE MASSA EM EQUIPAMENTOS CONTÍNUOS E DISPERSÃO AXIAL (E_c)

A transferência de massa entre duas fases líquidas é função do comportamento dos líquidos que atravessam o extrator e da taxa local de transferência de massa, que depende da resistência em cada filme líquido interfacial. O tipo de fluxo afeta a distribuição de tempos de residência e o gradiente de concentração.

O fenômeno da dispersão axial ou longitudinal em extratores líquido-líquido resulta da combinação de vários fatores que diminuem o gradiente de concentração e portanto as taxas de transferência de massa (vide Figura 1.4), dependendo do tipo de extrator e das condições de fluxo. A mistura axial (*axial mixing*), a mistura radial ou lateral (*radial mixing*) e o fluxo retroativo (*back flow*) originam-se na circulação vertical ou horizontal dos líquidos no sentido oposto àquele que seria o fluxo natural. Na circulação

radial ou lateral dos líquidos, o fluxo é perpendicular ao sentido do escoamento. Na mistura axial considera-se que ocorre o fluxo e o contrafluxo (*forward, backmixing*) (CUSACK e KARR, 1991; TREYBAL, 1980).

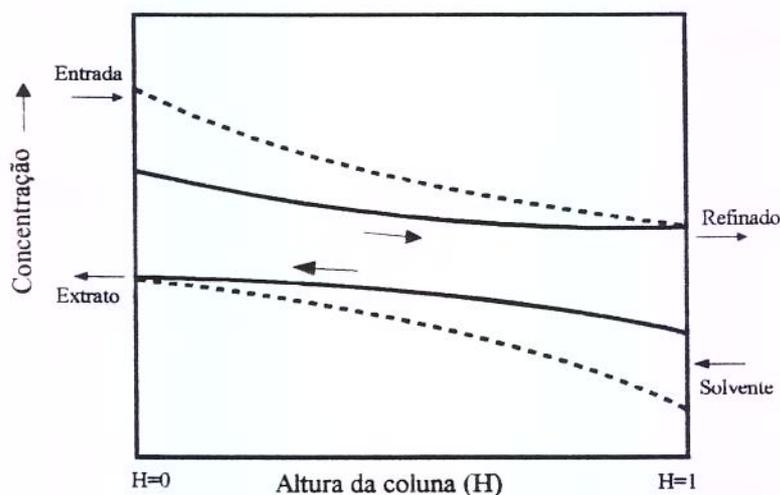


Figura 1.4: Efeito da mistura axial sobre o gradiente de concentração em contato contracorrente: _____ fluxo com dispersão axial;-----fluxo pistão

Em equipamentos de contato contínuo, a altura da coluna (H) necessária para atingir o grau de separação desejado pode ser calculada com base nos conceitos de número de unidades de transferência (NTU) e altura de uma unidade de transferência (HTU), sendo $H=HTU \times NTU$. Para o extrato (E), em escoamento pistão (P), obtém-se:

$$NTU_{EP} = \int_{w_{EP}}^{w_{ET}} \frac{dw_E}{(w_E - w_{Ei})} + \frac{1}{2} \ln \frac{1 - w_{EF}}{1 - w_{ET}} \quad [1.22]$$

$$HTU_{EP} = \frac{E_T}{k_E a (1 - w_E)_{iM}} \quad [1.23]$$

Onde:

a : área interfacial específica de transferência de massa;

w_E : fração mássica no extrato

k_E : coeficiente de transferência de massa do extrato;

E_T : vazão mássica total do extrato;

$(1-w_E)_{iM}$: média logarítmica de $(1-w_E)$ e $(1-w_{Ei})$

Os subscritos T, F e i referem-se ao soluto (que neste trabalho será α -La), alimentação (topo), final (fundo) e na interface, respectivamente. O refinado é tratado da mesma forma.

Entretanto, na prática, a aplicação das equações 1.22 e 1.23 fica dificultada pela impossibilidade de se obter as verdadeiras concentrações na interface. Isto levou à introdução dos coeficientes globais de transferência de massa K_{OE} e K_{OR} , que expressam a taxa de difusão em termos dos gradientes globais de concentração $(w_E - w_E^*)$. Quando não se possui o valor dos k individuais de cada fase, o uso dos coeficientes globais (K_O) exige que o coeficiente de distribuição m seja constante sobre toda faixa de concentração.

Usando então as concentrações de equilíbrio com a outra fase no lugar das composições de interface, coeficientes globais K_{OE} e K_{OR} , e se $(1 - w_E^*)$ e $(1 - w_E)$ diferem de um fator menor que 2, têm-se (TREYBAL, 1980):

$$NTU_{OEP} = \int_{w_{EF}}^{w_{ET}} \frac{dw_E}{w_E - w_E^*} + \frac{1}{2} \ln \frac{1 - w_{EF}}{1 - w_{ET}} \quad [1.24]$$

$$NTU_{ORP} = \int_{w_{RT}}^{w_{RF}} \frac{dw_R}{w_R^* - w_R} + \frac{1}{2} \ln \frac{1 - w_{RT}}{1 - w_{RF}} \quad [1.25]$$

A equação 1.24 é usada nos casos onde a principal resistência à difusão se encontra na fase extrato E (m elevado), e a equação 1.25 nos casos onde a principal resistência à difusão se encontra na fase refinado R (m pequeno).

Para soluções diluídas, $(1 - w_E)$ e $(1 - w_R)$ são próximos da unidade e as vazões de alimentação do extrato e do refinado, respectivamente E_T e R_F , são substancialmente constantes. Além disso, no caso em que a curva de equilíbrio é uma reta passando pela origem, são usadas as equações 1.26 e 1.27 para o número de unidades de transferência globais e a altura de uma unidade de transferência (TREYBAL, 1980) :

$$NTU_{OE} = \frac{(W_{ET} - W_{EF})}{\Delta W_{EM}} \quad [1.26]$$

$$HTU_{OE} = \frac{E_{Ee}}{K_E a^* A} \quad [1.27]$$

Onde : A é a área de seção transversal da coluna [m²]

Estudos realizados no LASEFI indicam que para o extrator PRDC os coeficientes de dispersão foram relativamente menores que os relatados na literatura. Isto provavelmente se deve à presença dos orifícios nos discos do extrator. A área livre de escoamento nos discos perfurados exerce influência sobre o grau de mistura e agitação (TAMBOURGI et alii, 1987) e portanto sobre a transferência de massa.

CAPÍTULO II – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O presente capítulo trata da descrição de todas as metodologias utilizadas, desde a caracterização do produto, a quantificação das proteínas, mediante cromatografia, a preparação e escolha de sistemas de duas fases aquosas, nas quais foram distribuídas as proteínas, os estudos de hidrodinâmica, para observar o desempenho do equipamento (coluna de discos rotativos), e, por último, a transferência de massa no equipamento. Os experimentos foram realizados em, pelo menos triplicata. Utilizaram-se reagentes de grau analítico.

2.1 CARATERIZAÇÃO DA MATÉRIA PRIMA

A matéria prima utilizada é o isolado protéico de soro de queijo, cujo nome comercial é BiPRO, fabricado pela *Davisco Foods International Inc.* – USA. Na literatura pode-se encontrar com o nome de *whey protein isolate* (WPI) (MORR e HA, 1993).

No Laboratório de Separações Físicas (LASEFI) da UNICAMP fizeram-se as análises a seguir (todas as análises foram feitas pelo menos em triplicata, exceto gorduras, que só foram feitas em duplicata):

2.1.1 Proteínas Totais

A. Reagentes

- Hidróxido de sódio em solução min. 32 % (1 L = 1,35 kg) (Merck-KGaA, Darmstadt, Germany).
- Ácido Bórico p.a. (Merck-KgaA, Darmstadt, Germany).
- Indicator misto 5 para titulação de amônia (Merck-KgaA, Darmstadt, Germany).
- Tabletes Kjedahl para o método Weninger (contém selênio, Merck-KgaA, Darmstadt, Germany).

- Acido sulfúrico 98 % para determinação de nitrogênio (Merck-KgaA, Darmstadt, Germany).
- Acido clorídrico 0,1 mol / L. (Merck-KgaA).
- Água oxigenada 30 % v/v (Merck-KgaA).

B. Materiais

- Bloco micro-digestor (Tecnal do Brasil).
- Destilador (Tecnal do Brasil).
- Capela de exaustão.
- Titulador automático.

C. Procedimento

O método utilizado foi o semi-micro Kjeldahl AOAC (1995). O procedimento foi realizado no Laboratório de Laticínios – UNICAMP. Este método é recomendado pela firma *Davisco Foods International Inc.*

Foram pesadas 0,2 g de amostra em cada tubo, acrescidas de 1 tablete de catalisador, 11 mL de água oxigenada 30 % v/v e, com cuidado extremo, 12 mL de H₂SO₄ (98 %). Os tubos foram aquecidos no bloco digestor de 50 °C, aumentando a temperatura a cada 30 minutos, até 420 °C por 35 minutos. Logo, deixou-se esfriar. Observou-se mudança na coloração das amostras até ficar verde azulada transparente. Os tubos já frios foram acrescidos de 10 mL de água destilada e deionizada (Milli-Q) e seus conteúdos destilados com NaOH 32 % p/v. O destilado (100-150) mL foi recolhido em erlenmeyer contendo 10 mL de ácido bórico 4 % v/v com indicador misto e titulado com HCl (0,102669404 N). O fator de correção utilizado foi de 6,38.

$$\% \text{ Nitrogênio} = \frac{\text{mL (HCl)} \times N \text{ (HCl)} \times 0,014008 \times 100}{\text{Peso da amostra}}$$

$$\% \text{ Proteína total} = \% \text{ Nitrogênio} \times \text{Fator Correção}$$

Cálculo de Proteína no Extrato Seco (%):

$$\text{Proteína no Extrato Seco (\%)} = \frac{\text{Proteína Total (\%)} \times 100}{\text{Extrato Seco Total (\%)}}$$

$$\text{Extrato Seco Total (\%)} = 100 \% - \text{Umidade (\%)} - \text{Cinzas (\%)}$$

2.1.2 Umidade

A. Materiais

- Cadinhos de alumínio com tampa
- Estufa à pressão atmosférica (sem circulação)
- Balança de precisão ($\pm 0,1$ mg, Sartorius analytic - Gottingen - Germany, modelo A200S)

B. Procedimento

Método Gravimétrico (AOAC, 1995; Laboratório de Laticínios – UNICAMP).

Os cadinhos foram secos em estufa antes de serem utilizados. Pesaram-se aproximadamente 5 g de amostra. As amostras foram deixadas na estufa por 4 horas, esfriadas no dessecador por 15 min. e pesadas em balança analítica. Retornaram-se as amostras à estufa por mais 30 min., adotando-se o mesmo procedimento no resfriamento e pesagem dos cadinhos. Levou-se as amostras à estufa, à temperatura de 105 °C, até a massa ficar constante após 5 hr.

Cálculo:

$$\% \text{ Umidade a } 105^\circ\text{C} = \frac{100 \times p}{p'}$$

Onde p é a perda da massa em gramas e p' é a massa da amostra em gramas.

2.1.3 Cinzas

A. Materiais

- Cadinhos de porcelana
- Mufla
- Balança de precisão

B. Procedimento

LANARA (1981); Laboratório de Laticínios – UNICAMP.

Os cadinhos foram secos na mufla a 700 °C durante 1 hr, esfriados em dessecador e pesados (tarar) antes de serem utilizados. Pesaram-se em balança analítica aproximadamente 2 g de amostra homogeneizada. As amostras foram deixadas na estufa a 105 °C por uma noite. O conjunto foi levado ao bico de Bunsen até carbonização completa e a seguir, ao forno mufla por 17 horas a 550 °C. Após isto, as amostras foram esfriadas em dessecador e pesadas em balança analítica.

Cálculo:

$$\% \text{ Cinzas} = \frac{100 \times p}{p'}$$

Onde p é a massa das cinzas em gramas e p' é a massa da amostra em gramas.

2.1.4 Determinação da Gordura

A. Materiais

- Tubos de 150 x 15 mm
- Agitador rotativo para tubos
- Centrífuga de baixa rotação

B. Reagentes

- Metanol p.a.
- Clorofórmio p.a.
- Sulfato de Sódio Anidro
- Solução de Na₂SO₄ 1,5 % p/v com água

C. Procedimento

Método de BLIGH e DYER (1959); Laboratório de Laticínios – UNICAMP.

Pesaram-se em balança analítica aproximadamente 2,5 g de amostra homogeneizada. As amostras foram transferidas para os tubos e adicionaram-se exatamente 10 mL de clorofórmio, 20 mL de metanol e 8 mL de água destilada, logo tampou-se hermeticamente. Colocaram-se os tubos no agitador rotativo por 30 min. Em seguida, adicionaram-se exatamente 10 mL de clorofórmio e 10 mL de solução de Na₂SO₄, tampou-

se e agitou-se vigorosamente por 2 min., logo deixaram-se separar as fases. Retirou-se a fase inferior uma alíquota de volume (clorofórmio) entre (13 e 15) mL, a qual era colocada em um tubo. Adicionou-se aproximadamente 1 g de Na₂SO₄ anidro, tampou-se e agitou-se removendo os traços de água arrastados na pipetagem.

Filtrou-se em um funil usando papel de filtro qualitativo até a solução ficar límpida.

Mediram-se 5 mL do filtrado, despejando-se em um béquer previamente pesado. Colocou-se o béquer em uma estufa a 100 °C até o solvente evaporar (15 a 20) min. Resfriou-se em dessecador e pesou-se.

Cálculo:

$$\% \text{ lipídios totais} = \frac{P \times 4 \times 100}{g}$$

Onde *p* é a massa dos lipídios em gramas contidos em 5 mL, *g* é a massa da amostra em gramas e o fator 4 é a proporção de 20 mL de clorofórmio para 5 mL de amostra.

2.2 CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA QUANTIFICAR AS PROTEÍNAS

Para a determinação analítica das concentrações de α-La e β-Lg procedeu-se à construção das curvas de calibração por cromatografia líquida, as quais foram obtidas com a adição de soluções das proteínas puras em diferentes concentrações (COIMBRA, 1995) em solução 0,01 M fosfato de potássio monobásico e dibásico tridratado (K₂HPO₄) pH = 7. Para atingir o pH 7 foram adicionadas uma razão em massa de fosfato de potássio dibásico a monobásico de 1,807 (SILVA, 1994).

A. Reagentes

Foi utilizada água destilada e deionizada (Milli-Q) para a preparação das soluções, a qual foi obtida no equipamento MilliQ Academic com cartuchos de filtro Quantum EX (*Ultrapure Organic Cartridge, Millipore Corporation*).

Solventes (COIMBRA, 1995)

- 0,01 M Kpi fosfato de potássio dibásico tridratado, 99 % (Sigma, 228,2) e fosfato de potássio monobásico anidro, 99 % (Sigma, 136,1) pH = 7 (tampão A).
- 0,01 M Kpi + 1 M NaCl p. a. (Merck, 99,5 %) eluente salino.

Para a limpeza da coluna cromatográfica (todos os reagentes foram p.a. - Pharmacia Biotech, 1996):

- 2 M NaCl
- 1 M NaOH
- Tampão A

Para armazenagem da coluna cromatográfica (Pharmacia Biotech, 1996):

- 20 % etanol a 4 °C

Proteínas puras:

- α -La: *Type III: Calcium depleted*, do leite bovino e concentração aproximada de 85 % (Sigma Chemical Co. – St. Louis, MO – USA).
- β -Lg: do leite bovino, contém β -Lg A e B, cristalizada e liofilizada 3 vezes. (Sigma Chemical Co. – St. Louis, MO – USA).

B. Materiais

- Coluna cromatográfica de troca iônica Mono Q HR 5/5 (5x50 mm) da Pharmacia Biotech, com pressão 1,5-2 Mpa, fluxo 1,0 mL / min, volume de amostra 1 mL. A absorbância foi determinada a 28 nm em temperatura ambiente. A coluna foi empacotada com resina Q *Sepharose® Fast Flow* (Pharmacia Biotech, Sweden), utilizando pipetas Pasteur com borracha. A coluna de troca iônica Mono Q (*Quaternary ammonium*) apresenta o grupo funcional $-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)^3$ utilizado para forte troca iônica, o que significa ionização completa sob uma ampla faixa de pH.
- Filtro membrana em éster de celulose, 0,45 μm , 47 mm de diâmetro (Millex, Millipore).

- O sistema de filtração (Millipore), consistiu na colocação de um filtro de 0,45 μm em um copo de 250 mL. O copo fixou-se com pinça de metal (GAST®) em um erlenmeyer de 1000 mL de capacidade e saída para o vácuo.
- Filtro Sep-Pak® Classic C18 de corpo pequeno da Waters™ (Millipore Corporation-Milford-Mass.USA).
- Balança de precisão (Sartorius analytic - Gottingen - Germany), $\pm 0,1$ mg, modelo A200S.
- Agitador magnético Fisatom (Furlab – Campinas SP – Brazil).

C. Equipamento

Inicialmente os experimentos foram realizados em um cromatógrafo HPLC da Waters, utilizando-se o programa Millennium V2.15.01 incluído no equipamento. Posteriormente, devido à chegada ao laboratório do LASEFI do equipamento de cromatografia líquida, os experimentos foram trasladados para o cromatógrafo HPLC Äkta™ Purifier (Pharmacia Biotech-Sweden). Este equipamento tem embutido o programa Unicorn V3.00, o qual trabalha em faixas de μg até mg, fluxos entre 0,001 mL / min até 10 mL / min, pressões de 0 até 25 MPa, comprimento de onda entre 190 até 700 nm, pH 2 até 12 e temperaturas de 4 °C até 40 °C. Uma bomba tipo pistão (P-900), a qual trabalha em modo isocrático e gradiente. O monitor UV- 900 multicomprimento de onda UV-VIS com tecnologia de fibra ótica.

Foi também utilizado um equipamento de ultra-som (Merse) com timer (Unique® Ind. e Com. de produtos eletrônicos LTDA. S.P. Brazil).

D. Procedimento

Os solventes foram filtrados no sistema de filtração (Millipore) com filtro membrana estéril de 0,45 μm , o eluente salino foi filtrado duas vezes, passado através do filtro Sep-Pak® Classic C18, e por último deareado no ultra-som por 30 minutos antes de serem utilizados no cromatógrafo. Amostras a diferentes concentrações de proteínas puras foram também filtradas (filtro Sep-Pak®) para injeção no cromatógrafo.

2.3 ESCOLHA DA CONCENTRAÇÃO DA MATERIA PRIMA – COEFICIENTE DE PARTIÇÃO

Testes preliminares foram realizados com o objetivo de selecionar a quantidade de matéria-prima (BiPRO) a ser adicionada ao sistema aquoso bifásico. Os critérios desta seleção foram a obtenção do melhor valor de coeficiente de partição e menor sedimentação de matéria prima dentro das células de equilíbrio.

A. Reagentes

- Kpi, pH = 7 solução estoque 30 % p / p.
- PEG 1500 (Polietilenoglicol 1500 Da, p.a., Aldrich Company, Inc.-Milwaukee-USA) densidade 1,091, solução estoque 50 % p / p. Foi feita a análise cromatográfica do PEG 1500, para determinar a sua polidispersabilidade, mediante o método cromatográfico de permeação em gel, coluna Ultrahydrogel (Waters – USA), vazão de 0,7 mL / min, temperatura de coluna de 40 °C, em fase móvel água, temperatura do detector (IR) de 40 °C e volume de injeção de 100 µL. Também foi medida a umidade do PEG 1500, mediante o método de Karl Fisher em triplicata.

B. Materiais

- Células de equilíbrio de aproximadamente 50 mL encamisada.
- Banho Termostático (Paar Physica - Germany), $\pm 0,1$ °C de precisão, com resfriador (Viscotherm VT-2), 18 bar.
- Seringas de 5 mL de plástico.
- Colunas dessalinizadoras PD-10 com resina Sephadex® G 25M (Pharmacia Biotech-Sweden). O procedimento de dessalinização de amostras em colunas PD-10 :
 1. A coluna PD-10 é fixada em um suporte (posição vertical), retira-se a tampa e succiona-se o líquido excedente na parte superior com pipeta Pasteur.
 2. Corta-se a tampa inferior.

3. Coloca-se 25 mL de solução tampão, para equilibrar a resina.
 4. Coloca-se 2,5 mL de amostra.
 5. Descarta-se o volume.
 6. Coloca-se 3,5 mL de tampão para eluição completa de proteínas recolhendo a amostra dessalinizada num béquer.
- Balança de precisão
 - Termômetro (Cole-Parmer Instrument Co.) de -1 até $+ 51$ °C, de $0,1$ °C.
 - Agitador magnético

C. Procedimento

Os SABs compostos de PEG-fosfato de potássio (KPi), foram preparados de acordo a COIMBRA (1995) a partir de soluções estoque de PEG (50 % p/p) e sal (30 % p/p, pH 7). Os sistemas nas concentrações desejadas foram formados pesando as massas dos componentes das soluções estoques previamente preparadas. As fases foram misturadas com agitação magnética em uma célula de equilíbrio encamisada (vide Figura 2.1) que consiste de um reator pequeno (aproximadamente 50 mL de capacidade) e duas saídas para tomada de amostras. O encamisado é conectado a um banho termostático para o controle de temperatura (25 °C). Logo procedeu-se à decantação das fases até atingir o equilíbrio.

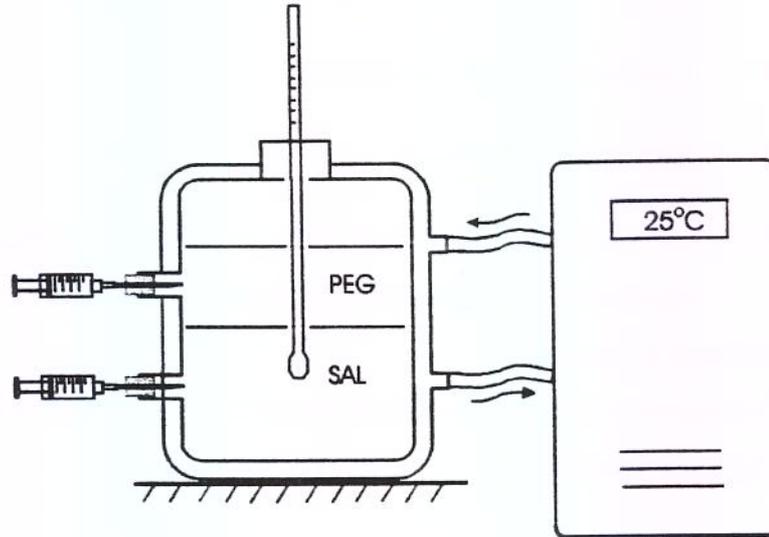


Figura 2.1. Célula de Equilíbrio

Para obter dados de coeficiente de partição adicionaram-se aos sistemas de (0,2 a 1,2) % de isolado protéico de soro (BIPRO) em relação à massa da fase salina e totalmente dissolvido (disperso) nesta fase. Misturou-se com agitação magnética, a baixa rotação, até atingir a dissolução. Colocou-se primeiro na célula de equilíbrio, a fase polimérica, a água e a fase salina com o soro, misturando-se as fases com agitação magnética por uma (1) hora. Deixou-se descansar (*overnight*) para assegurar uma completa distribuição de proteínas embora antes de 2 horas as fases já estivessem quase transparentes ou tinham entrado no equilíbrio. As células de equilíbrio foram mantidas na temperatura de 25 °C sob banho termostático e a temperatura do sistema monitorado. Depois foram extraídas amostras da fase superior e inferior com uma seringa, procurando-se não perturbar a interface. Imediatamente as amostras foram dessalinizadas em colunas PD-10, agitadas em agitador magnético, filtradas (filtro Sep-Pak®) e injetadas no cromatógrafo para a quantificação das suas proteínas.

Os cálculos de rendimento e pureza foram extraídos do trabalho publicado por CHEN (1992):

$$Y_{a,t} = \frac{100}{\left(1 + \left(\frac{Vb \times Ka}{Vt}\right)\right)} \quad [2.1]$$

$$Y_{b,b} = \frac{100}{\left(1 + \left(\frac{Vt}{Vb \times Kb}\right)\right)} \quad [2.2]$$

Onde $Y_{a,t}$ e $Y_{b,b}$ são rendimentos de α -La na fase superior e β -Lg na fase inferior. K_a e K_b são os coeficientes de partição da α -La e da β -Lg, respectivamente. A pureza teórica P(%) de cada proteína em cada fase pode ser calculada pelas equações:

$$P_{a,t} = 100 \times Y_{a,t} \times \frac{0,7}{(Y_{a,t} \times 0,7) + (100 - Y_{b,b}) \times 3} \quad [2.3]$$

$$P_{b,b} = 100 \times Y_{b,b} \times \frac{3}{(100 - Y_{a,t}) \times 0,7 + (Y_{b,b} \times 3)} \quad [2.4]$$

Onde $P_{a,t}$ e $P_{b,b}$ são as porcentagens de pureza de α -La na fase superior e de β -Lg na fase inferior, respectivamente.

Foram feitos os cálculos de propagação dos erros (Δ) das medidas obtidas no cromatógrafo segundo MICKLEY et alii (1957):

$$K = f(Ci, superior, Ci, inferior) \quad [2.5]$$

$$K = \frac{Ci, superior}{Ci, inferior} \quad [2.6]$$

$$\Delta K = \frac{\delta K \Delta C_{i, superior}}{\delta C_{i, superior}} + \frac{\delta K \Delta C_{i, inferior}}{\delta C_{i, inferior}} \quad [2.7]$$

$$\frac{\delta K}{\delta C_{i, superior}} = \frac{1}{C_{i, inferior}} \quad [2.8]$$

$$\frac{\delta K}{\delta C_{i, inferior}} = - \frac{C_{i, superior}}{C_{i, inferior}^2} \quad [2.9]$$

Onde $C_{i,superior}$ e $C_{i,inferior}$ são as concentrações na fase superior e inferior de α -La ou de β -Lg respectivamente e ΔC_i é o desvio padrão das concentrações na fase superior e inferior de α -La ou de β -Lg respectivamente.

2.4 PROPRIEDADES FÍSICAS DAS FASES

2.4.1 Medida de Densidade

A. Reagentes (para lavagem de tubo capilar em “U” dentro do densímetro)

- Álcool
- Água
- Ar comprimido

B. Materiais

- Seringas de plástico de 1 mL

C. Equipamento

- Densímetro DMA-58 (Anton Paar – Austria) de 0,02 mg / cm³ de precisão e erro menor que 0,05 mg / cm³.
- Banho termostático.

D. Procedimento

Após calibração do densímetro, lavou-se cuidadosamente o seu capilar com água e álcool, logo secou-se com ar. Em seguida deixou-se em repouso por aproximadamente uma (1) hora para atingir a temperatura de 25 °C e continuar com a injeção da amostra até preencher o capilar, isto é, aproximadamente até uma gota de amostra transbordar. Teve-se o cuidado de não deixar nenhuma bolha dentro do capilar que pudesse alterar os resultados. Deixou-se de novo atingir a temperatura desejada. O densímetro digital mostrou o valor da densidade em g / cm³.

Os resultados de densidade das fases com proteínas (BiPRO) em células de equilíbrio são apresentados no Capítulo III.

2.4.2 Medida da Viscosidade

A. Reagentes (para lavagem do tubo capilar em “U”)

- Acetona
- Água
- Ar comprimido

B. Materiais

- Viscosímetro Capilar (Cannon Fenske N° 50), para a fase salina + BiPRO e (Cannon Fenske N° 150) para a fase polimérica.
- Pera
- Termômetro de precisão
- Cronômetro

C. Equipamento

- Banho termostático.
- Recipiente cilíndrico

D. Procedimento

Calibrou-se o banho termostático para a temperatura de 25 °C. Lavou-se cuidadosamente o tubo Cannon Fenske com água e acetona, logo secou-se com ar. Foi introduzida a amostra com ajuda de uma pera até preencher completamente o tubo. Em seguida deixou-se dentro do recipiente cilíndrico um suporte para pendurar o tubo dentro do banho o qual foi controlado com termômetro para se atingir a temperatura de 25 °C. Logo deixou-se escoar a amostra de maneira que quando passasse o primeiro menisco, o cronômetro fosse disparado (tempo inicial) e quando a amostra passasse o segundo menisco o cronômetro fosse interrompido (tempo final). Estes valores foram utilizados para o cálculo da viscosidade, de acordo ao número de tubo. Os valores calculados resultaram em Cst (Centistokes).

2.4.3 Medida da Tensão Interfacial

A. Reagentes (Para lavagem do recipiente onde colocou-se a amostra)

- Álcool
- Água

B. Equipamento

- Banho termostático.
- Tensiômetro KVS Sigma70 (KVS Instrument LTD – Finland) programa Sigma 701 \pm 0,01 mN / m de precisão, do laboratório do Prof. Dr. Watson Loh (Instituto da Química- UNICAMP).

C. Procedimento

Calibrou-se o banho termostático para a temperatura de 25 °C e logo conectou-se ao tensiômetro. Lavou-se o recipiente de vidro com água e álcool. O anel foi flambado em bico de bunsen. Colocaram-se as amostras até aproximadamente a metade do recipiente de vidro.

As tensões interfaciais foram medidas mediante o método do anel (Du – Noüy). Para o método utilizou-se um anel de platina o qual é pendurado em um suporte do

equipamento. As amostras são colocadas no recipiente, fase polimérica primeiro e logo a fase salina com o soro dissolvido, espera-se atingir o equilíbrio à temperatura de 25 °C. Quando o equipamento é ativado, o anel começa a ser submerso até atingir a interface, a qual é registrada como um pequeno pulso. Devido a que nosso sistema teve baixos valores de tensão interfacial o equipamento foi zerado na fase inferior e o anel foi puxado para a fase superior registrando a tensão interfacial como um pulso no momento em que atravessou a interface.

2.5 CURVA BINODAL

A. Reagentes

- PEG 1500 (50 % p / p)
- KPi (pH = 7; 30 % p / p)
- Agua
- BiPRO

B. Materiais

- Agitador magnético
- Termômetro
- Titulador automático

C. Procedimento

A construção da curva binodal foi baseada no procedimento apresentado em BAMBERGER et alii (1985).

O primeiro sistema foi PEG 1500 (50 % p / p) - KPi (pH = 7; 30 % p / p) – água. Colocaram-se 4,7701 g de PEG 1500 na célula de equilíbrio à temperatura de 25 °C e titulou-se com KPi em titulador automático sob forte agitação magnética. Anotou-se o volume de KPi que provocou a turbidez (região de duas fases ou *cloud point*). Com o valor de densidade do Kpi, a 25 °C (1,26405 g / cc) obteve-se a massa. Logo adicionou-se gota a gota água destilada e deionizada (Milli-Q) até ficar de novo transparente. Pesou-se a

quantidade de água com a qual se obteve a transparência (região de 1 fase) e se continuou como descrito anteriormente.

2.6 CONSTRUÇÃO DAS LINHAS DE AMARRAÇÃO (*TIE LINE*)

A. Reagentes

- Fase polimérica
- Fase salina com BiPRO

B. Materiais

- Mufla
- Liofilizador FTS Systems (Stone Ridge, New York, USA)

C. Procedimento

A determinação das concentrações (fase superior polimérica e fase inferior salina) da linha de amarração foi realizada pelo método gravimétrico de SNYDER et alli (1992).

O método quantifica ambas fases do sistema aquoso bifásico. Consiste em evaporar a água em um liofilizador e oxidar o PEG em mufla. O remanescente é o sal. As quantidades mínimas das proteínas foram desprezíveis e assumiu-se que foram oxidadas junto com o PEG.

Pesaram-se em cadinhos, aproximadamente 500 mg (0,5 g) de uma das fases. Depois colocaram-se os volumes de água para estocagem no congelador. No liofilizador a vácuo (Pressão < 13,3 Pa) por 24 horas foi sublimada a água, posteriormente pesaram-se os cadinhos antes de introduzi-los numa mufla a 450 °C por 5 dias. O PEG foi oxidado e volatilizado, enquanto que o produto remanescente era o sal (cinzas brancas). Os resultados estão apresentados no capítulo III.

As concentrações escolhidas para o presente trabalho foi motivada pela concentração estudada em COIMBRA (1995) para purificação de proteínas em extrator *Graesser*. Tomou-se como ponto de partida a concentração de 14 % p / p PEG e 18 % p / p

sal, e com as linhas de amarração mostradas em ALBERTSSON (1986) para PEG 1540 e KPi a 20 °C tracejou-se uma linha reta até cerca do *plait-point*. Foram quatro (4) as concentrações analisadas.

2.7 COLUNA PRDC (COLUNA DE DISCOS ROTATÓRIOS PERFURADOS)

Considerando o custo dos reagentes a serem empregados e, portanto, a necessidade de um equipamento contínuo de pequeno porte, assim como a experiência anterior já disponível no LASEFI com este tipo de equipamento e as informações da literatura sobre projeto de colunas RDC (KAWASE, 1990; KOSTERS, 1983), projetou-se a PRDC a ser utilizada neste trabalho com as características listadas na Tabela 2.1:

Tabela 2.1 Características da coluna PRDC sem chicanas :

| Coluna | cm |
|---------------------------------|-----------|
| Diâmetro Interno de coluna (D) | 5,0 |
| Diâmetro dos Discos | 4,7 |
| Número de discos | 4 |
| Número de furos | 48,0 |
| Diâmetro de furos | 0,3 |
| Área livre de escoamento | 20 %, 0 % |
| Comprimento da Coluna | 70 |
| Comprimento da Zona de extração | 30 |
| Volume zona de extração | 560 ml |
| Compartimento com 4 discos | 6 |

Para os experimentos utilizaram-se discos com furos pela melhor efetividade no rompimento das gotas, o que significa maior área de transferência de massa na coluna a baixa velocidade de rotação (PINA e MEIRELLES, 2000; COIMBRA, 1995).

2.8 HOLD – UP (FRAÇÃO VOLUMÉTRICA RETIDA DA FASE POLIMÉRICA)

A. Materiais

- Bombas peristálticas (2) (Cole Parmer, vazão de até 80 mL/min)

- Agitador mecânico (1) (Optron, 0 -30 RPM)
- Agitador mecânico (1) (Fisatom)
- Agitador magnético (2)
- Tacômetro digital (1) (Ametek, modelo 1726, Mansfield & Green Division, USA)

B. Preparação do Sistema de Fases

Foram pesadas quantidades apropriadas para formar 6 kg do sistema 14 % p/p PEG 1500 – 18 % p/p Kpi (pH 7) juntos em erlenmeyer de 6 L. Agitou-se pelo intervalo de 2 horas em agitador magnético. Separaram-se em partes iguais em erlenmeyer de 4 L e agitou-se novamente em agitador magnético por 1 hora. Deixou-se então as fases decantarem por 12 horas. Em seguida foram separadas as fases em dois erlenmeyers. A fase salina (contínua) foi alimentada à coluna pelo topo e a fase polimérica (dispersa) pela sua base. As condições operacionais à temperatura de 25 °C. As variáveis operacionais foram a velocidade de rotação (10-150 rpm) e a relação de velocidade entre as fases ($1,00 < Vd / Vc < 3,00$).

Concentração do sistema: 14 % p / p PEG 1500 (Aldrich) - 18 % p / p KPi pH = 7,0 (Sigma).

C. Estado Estacionário

O estado estacionário foi atingido quando o nível da interface permanece constante para as diferentes vazões e rotações.

D. Procedimento - Método do Estancamento

O *Hold-Up* da fase dispersa foi medida pelo método do estancamento no qual a coluna foi inicialmente preenchida com a fase salina (contínua) até aproximadamente 5 cm acima da entrada da fase contínua onde foi possível manter uma camada da fase polimérica (dispersa), após coalescência acima da fase contínua (vide Figura 2.2). Quando é atingido o estado estacionário (aprox. 20 min) as entradas e saídas das fases são interrompidas. O volume de fase dispersa que estava retido na zona de extração da coluna ascende e abaixa o

nível da interface. Este volume é medido após 30 min de interrupção das correntes pelo deslocamento da fase dispersa até restabelecer o local da interface introduzindo-se a fase salina pela entrada. O volume é recolhido em uma proveta. O cálculo do *Hold-Up* é feito com a seguinte equação:

$$x = \frac{\text{Volume retido}}{\text{Volume da zona de extração}} \quad [2.5]$$

A hidrodinâmica em colunas de extração líquido-líquido tipo RDC baseia-se geralmente nas correlações da velocidade de deslizeamento (V_{slip}) e o *hold-up* da fase dispersa (x).

2.9 TRANSFERÊNCIA DE MASSA DE PROTEÍNAS NA COLUNA PRDC

A. Preparação do sistema aquoso bifásico

O sistema aquoso bifásico PEG-fosfato de potássio (Kpi), foi preparado pesando os componentes na proporção de 14 % p / p PEG, 18 % p / p de fosfato de potássio dibásico e fosfato de potássio monobásico, completando o sistema com água destilada e deionizada (Milli-Q). O sal permaneceu na proporção fosfato de potássio dibásico a monobásico de 1,807 para atingir o pH 7 (SILVA, 1994). Os componentes foram agitados até a sua dissolução completa. Após interrompida a agitação formaram-se imediatamente as fases (superior rica em polímero e inferior rica em sal), deixou-se por aproximadamente 3 dias até que as fases atingissem o equilíbrio. Isto foi verificado observando a transparência de cada uma das fases. Com uma bomba foram extraídas as fases por separado, cuidando-se de não perturbar a interface.

Separadas as fases, colocou-se o isolado protéico de soro (BiPRO), aos poucos com agitação magnética, na fase rica em sal. A quantidade foi calculada utilizando como referência os valores apresentados em COIMBRA (1995) que trabalhou com o soro em pó com 26 % de proteínas totais. A autora citada utilizou uma quantidade de soro de 15 % p / p do total de fase salina, isto é, a concentração de soro em pó na fase salina foi de 3,9 %. Para

se obter a mesma concentração com o isolado protéico de soro (BiPRO) (99,0 % de proteínas totais), precisou-se uma quantidade de BiPRO correspondente a 4,06 % p / p do total de fase salina.

B. Condições de trabalho

Os experimentos de transferência de massa foram realizados em processo contínuo em coluna de discos rotativos perfurados para as melhores condições estudadas nos experimentos de *hold-up*. As variáveis operacionais foram : velocidade de rotação (10-125 rpm), relação de vazões das fases (V_d / V_c , 0,5 - 2) e teor de proteínas de BiPRO dissolvido na fase salina (4,06 %). A vazão da fase salina foi sempre de 33 mL / min.

C. Operação da coluna PRDC

Iniciou-se a operação da coluna com a calibração das bombas para ambas fases, para as vazões pré estabelecidas nas condições de trabalho. Mediram-se os volumes por minuto, isto é as vazões das fases, separadamente, coletando-se em proveta através de uma das derivações de fluxo instaladas nas linhas de alimentação da coluna. Simultaneamente foi realizada a calibração dos rotâmetros para cada fase.

Preencheu-se a coluna com a fase rica em sal (fase contínua) introduzida pela parte superior da mesma até o nível de interface (vide Figura 2.2). Esta última foi localizada a aproximadamente 5 cm acima da entrada de fase contínua. Regulava-se então a velocidade de rotação requerida, controlada com tacômetro. Uma das saídas inferiores tinha uma pequena válvula que permitia o controle do nível de interface constante. Essa válvula foi aberta simultaneamente com a introdução da fase rica em PEG (fase dispersa) pela parte inferior da coluna. Com o início da saída da fase extrato, coletaram-se amostras das duas correntes de saída (refinado e extrato), considerando-se este como o tempo inicial (zero). Logo, coletaram-se amostras a cada 10 min durante 30 min aproximadamente, tempo em que se atinge o regime permanente (COIMBRA, 1991). As amostras foram estocadas em freezer até a quantificação no cromatógrafo líquido. Para quantificação das proteínas, amostras do extrato foram diluídas 1:4 em tampão KPi, pH 7,0, filtradas e injetadas no

cromatógrafo, e as amostras do refinado foram diluídas 1:5 em tampão KPi, pH 7,0, dessalinizadas e filtradas para injetá-las no cromatógrafo.

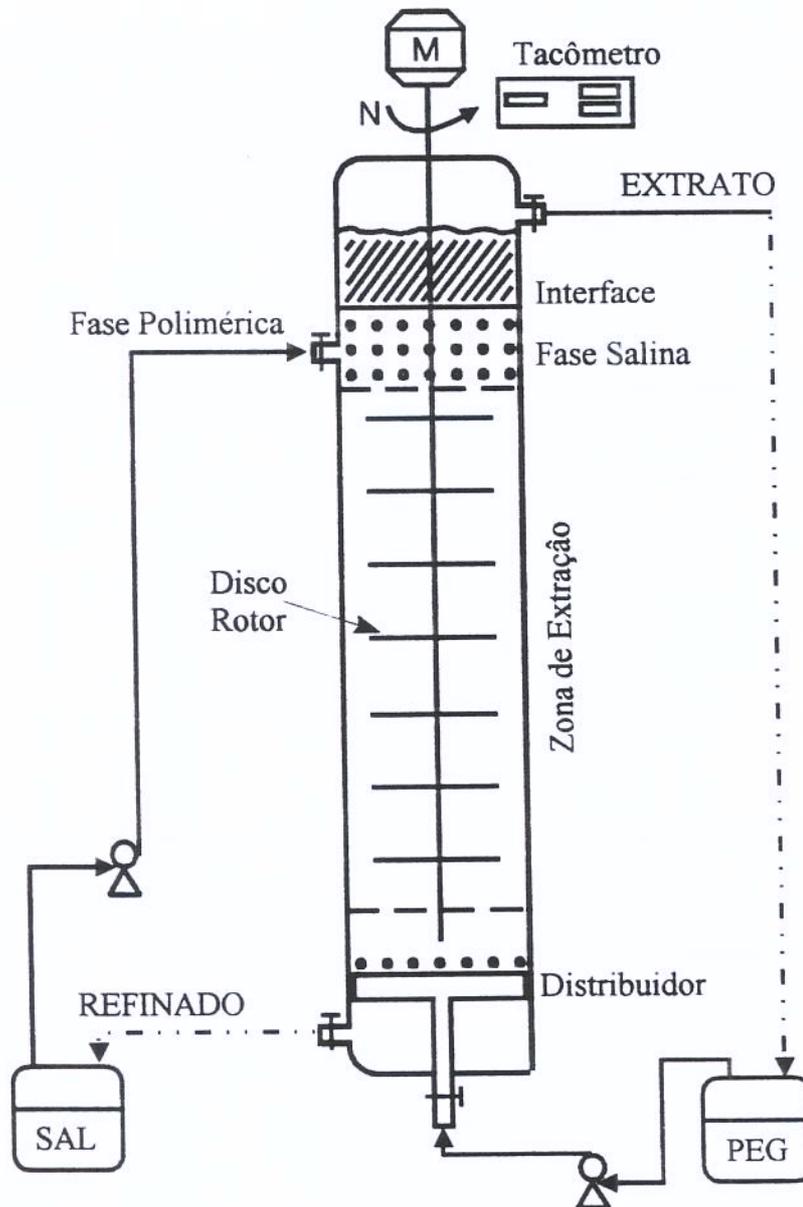


Figura 2.2. Diagrama de operação da PRDC para medidas de Hold-up (inclui circuito de linha pontilhada) e Transferência de Massa (exclui linha pontilhada).

CAPÍTULO III – RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 CARATERIZAÇÃO DA MATÉRIA PRIMA

O BiPRO, isolado protéico de soro de queijo tem elevado teor de proteínas e baixo teor de gorduras, razão pela qual foi utilizado no desenvolvimento do presente trabalho. O BiPRO foi cedido pela firma *Davisco Foods International, Inc.* e sua composição química usual, fornecida pela indústria, é apresentada na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 Composição Química de BiPRO, produto comercial, segundo *Davisco Foods International, Inc.*

| Caraterística | |
|-----------------------|------|
| Proteínas % Base Seca | 99,4 |
| Gorduras % | 0,4 |
| Cinzas % | 1,7 |
| Umidade % | 5,1 |
| pH (10% a 20°C) | 7,3 |

No LASEFI (Laboratório de Separações Físicas) em conjunto com o Laboratório de Lacticínios - UNICAMP foi verificada a composição química do lote de BiPRO utilizado neste trabalho. Os resultados são dados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 Composição Química do BiPRO segundo análises realizadas no Laboratório de Separações Físicas (LASEFI) e no Laboratório de Laticínios - UNICAMP

| Caraterística | | Desvio Padrão (%) | Coefficiente de Variação (%) |
|-----------------------|-------|-------------------|------------------------------|
| Proteína Total % | 92,03 | 0,07 | 0,07 |
| Extrato Seco % | 92,96 | - | - |
| Proteínas % Base Seca | 99,00 | - | - |
| Gorduras % | 0,59 | 0,08 | 14,17 |
| Cinzas % | 1,94 | 0,008 | 0,39 |
| Umidade % | 5,1 | 0,1 | 2,77 |
| PH (10% a 20°C) | 7,45 | 0,06 | 0,77 |

A determinação de proteínas totais do BiPRO apresentou grande dificuldade de medida devido a seu elevado teor (> 90 %). Isto foi observado durante a digestão (primeira análise da medida) a qual se completa com a viragem da cor para transparente. Tal viragem não aconteceu, mesmo seguindo a Metodologia apresentada pela AOAC (1995). Após consultas com a firma Davisco, orientaram para o uso de uma modificação do Método da AOAC. A firma sugeriu adicionar 11 mL de Peróxido de Hidrogênio (30 %) à mistura catalisadora com o ácido sulfúrico utilizado durante a digestão, chamando também a atenção para a elevada periculosidade da reação. Tomados todos os cuidados pertinentes, foi obtido o valor com desvio padrão da medida de 0,07 %, apresentado na Tabela 3.2.

O desvio padrão das análises realizadas, foi calculado segundo a fórmula :

$$\text{Desvio Padrão} = \sqrt{\frac{n \sum s^2 - (\sum s)^2}{n(n-1)}}$$

Onde : n é o número das análises realizadas e s é o valor de cada análise.

A firma Davisco utiliza o método chamado de Combustão para a análise de nitrogênio. O equipamento que utiliza este princípio é produzido pela firma LECO (USA).

Segundo informação da Davisco este é o processo mais rápido e preciso para a quantificação de proteínas pela análise de nitrogênio.

Os resultados deste trabalho apresentaram diferença com os resultados da Davisco na ordem de 0,3 % para as proteínas. As diferenças observadas no que se refere às demais análises são pequenas, dentro da margem de variação da composição química de diferentes lotes de um produto comercial.

MOOR e HÁ (1993) listaram a composição química do isolado protéico de soro de queijo, baseados nas análises de três produtos (WPI) comerciais. Para proteínas totais em base seca apresentam o valor de 98,17 %, com desvio padrão de 1,73 %. Comparado com o valor das proteínas totais obtido no LASEFI a diferença é de 1,15%. Os autores afirmam que a variação na composição se deve às diferenças na composição do leite, o tipo de processo utilizado na fabricação do queijo, a pasteurização do leite, tipo e concentração de caseína, pH, temperatura, entre outros. Já nos demais valores apresentados pelos autores como cinzas, umidade e gorduras a diferenciação é mínima, em torno de (0,075 a 0,87) %, validando os resultados obtidos no presente trabalho.

DYBING e SMITH (1991) apresentaram valores da composição química do isolado protéico de soro (WPI) obtidos a partir de vários procedimentos de fabricação. Os valores apresentados são : proteínas totais em base seca > 95 %, gorduras < 1 %, umidade < 5 %, cinzas < 3 % e lactose >1 %. Os valores obtidos no LASEFI encontram-se dentro da faixa de valores especificados pelos autores. É provável que a diferença observada entre o lote de BiPRO utilizado neste trabalho e a análise média apresentada pela Davisco seja provocada por um maior teor de lactose no presente caso. Por outro lado, é interessante observar que os dados fornecidos pela Davisco e apresentados na Tabela 3.1 indicam uma soma do teor de proteína em base seca mais gordura e cinza superior a 100 %. É possível que o teor de proteínas em base seca fornecido pela empresa esteja também em base livre de cinzas. Se o teor de proteínas em base seca determinado neste trabalho também for calculado em base livre de cinzas, o resultado será 99,05 %, mais próximo do valor indicado pela firma.

3.2 CURVA DE CALIBRAÇÃO DE PROTEÍNAS

O desenvolvimento da metodologia analítica por cromatografia líquida foi muito trabalhoso, exigindo diversos meses de trabalho, ao longo dos quais realizaram-se as seguintes atividades : treinamento no manuseio do cromatógrafo, mudanças dos tempos de eluição das proteínas da coluna cromatográfica (5 - 15 min), estudo de várias concentrações do eluente salino, mudanças de coluna cromatográfica (Ultrahydrogel - WATERS; Mono-Q HR 5/5 - PHARMACIA), variações da vazão de alimentação da solução de proteínas padrão (0,7 - 1 mL / min), adaptação de coluna cromatográfica Mono-Q HR 5/5 da PHARMACIA ao cromatográfico da WATERS, dupla filtração dos eluentes através do sistema de filtração da Millipore e inclusão da filtração em filtro Sep-Pak® para se evitar que qualquer impureza pudesse contaminar a coluna e obstruí-la. Finalmente, construiu-se o programa para a obtenção da curva de calibração.

O trabalho em cromatografia líquida apresentou grande complexidade e dificuldade de realização, fizeram-se muitos testes preliminares para se obter o programa que permitiu construir as curvas de calibração com proteínas puras padrão e a partir das quais foram quantificadas as proteínas do isolado protéico em todas as etapas do presente trabalho. O programa é mostrado na Tabela 3.3:

Tabela 3.3 Programa gradiente-plató para a construção da curva de calibração

| | Tempo (min) | Eluente Salino B (%) |
|-----------|-------------|----------------------|
| Gradiente | 0 - 10 | 15 |
| Plató | 10 - 25 | 15 |
| Gradiente | 25 | 30 |
| Plató | 25 - 32 | 30 |
| Gradiente | 32 | 100 |
| Plató | 32 - 40 | 100 |

As curvas de calibração para a quantificação das proteínas α -La e β -Lg são apresentadas na Figuras 3.1 e 3.2.

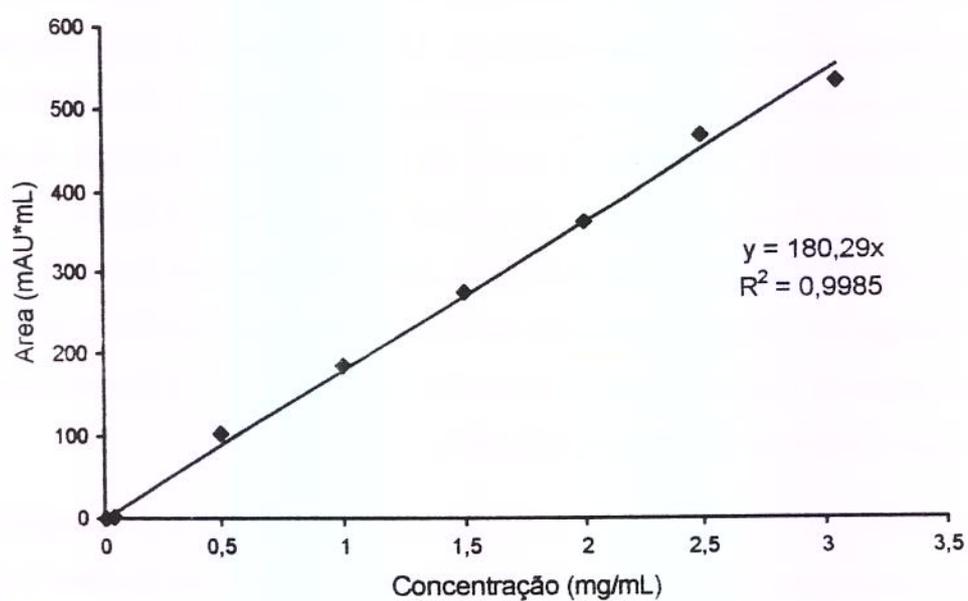
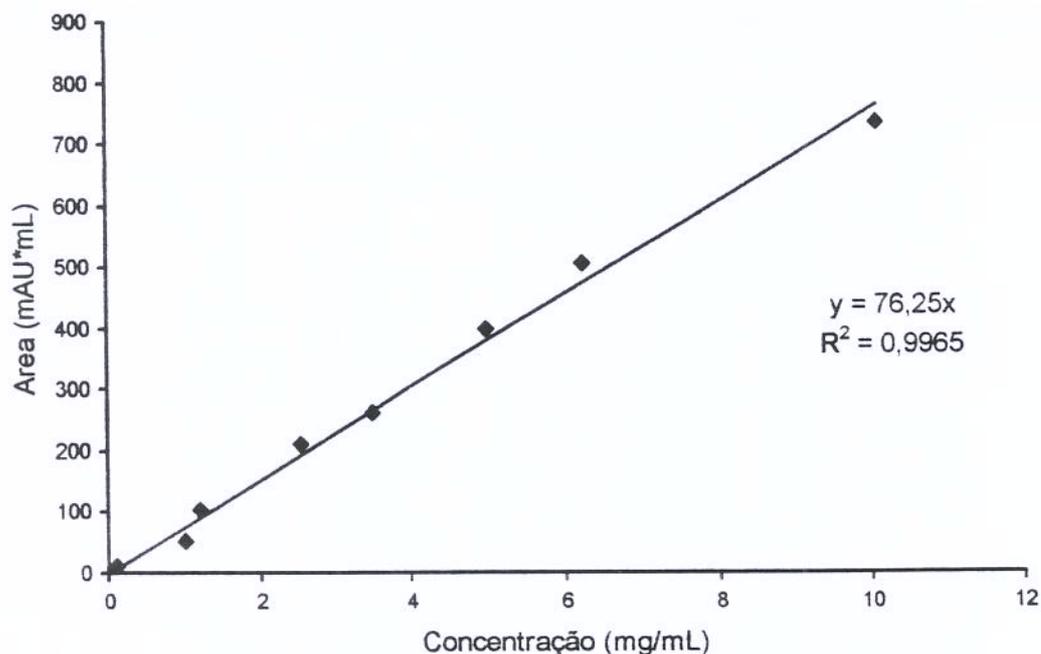


Figura 3.1 Curva de calibração para a α -La

Figura 3.2 Curva de calibração para a β -Lg.

Como se observa as curvas de calibração apresentaram um comportamento adequado para uma análise com boa precisão das proteínas. Em ambos os casos obteve-se uma relação linear na faixa de concentrações selecionada, com coeficientes de correlação maiores que 0,99.

A seguir são apresentados alguns dos cromatogramas obtidos durante a otimização do programa para obter as curvas de calibração das proteínas. Foram escolhidos os mais representativos, dentre muitos cromatogramas determinados, para demonstrar como se foi aperfeiçoando a detecção das proteínas do BiPRO (α -La e β -Lg). As Figuras 3.3 e 3.4 são os cromatogramas iniciais de quantificação de proteínas α -La e β -Lg do BiPRO (soluções aquosas de ambas proteínas) obtidas no HPLC da WATERS, (laboratório do Departamento de Processos Químicos - Faculdade de Engenharia Química – UNICAMP). Percebe-se que no início foi difícil detectar a β -Lg, pois ela ficava aglomerada e não se obtinha um pico definido como da proteína α -La. Após a otimização da programação, com a mudança de

vários procedimentos mencionados anteriormente, conseguiu-se detectá-la separadamente. Esta melhora na detecção foi observada no equipamento da WATERS com o programa apresentado na Tabela 3.3. Este resultado pode ser observado na Figura 3.4.

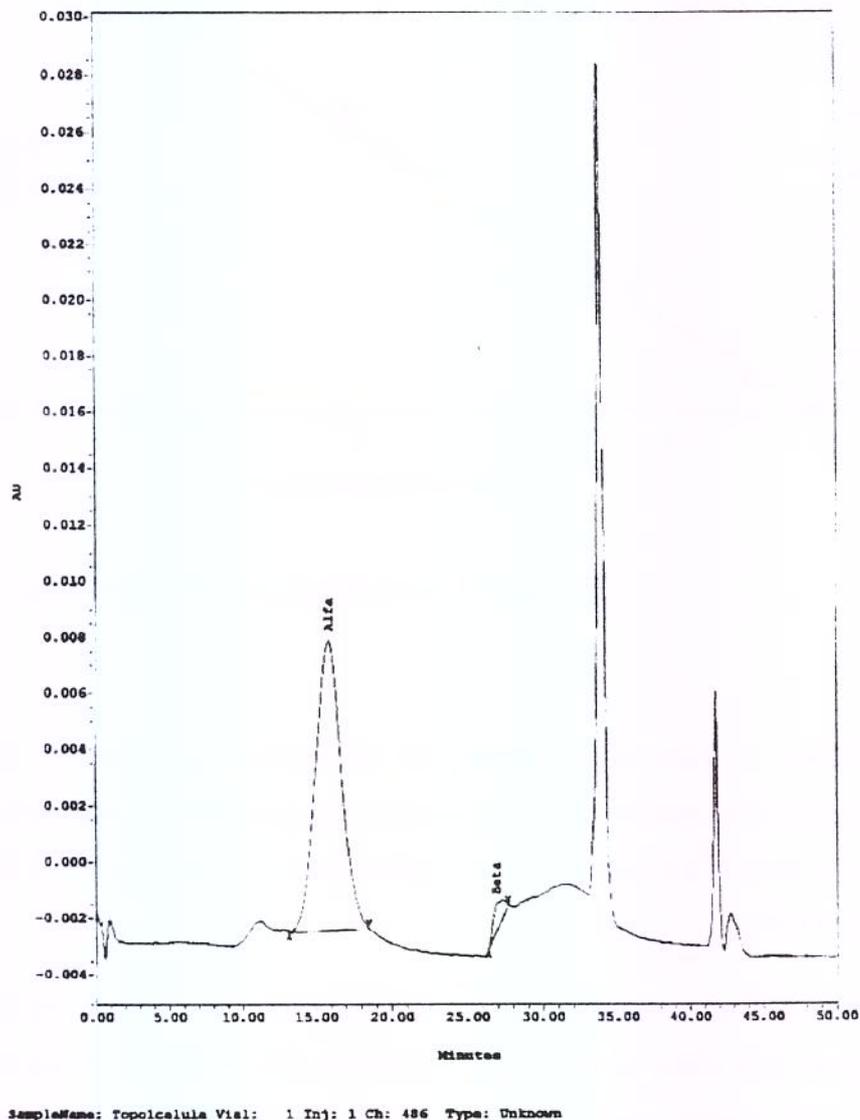


Figura 3.3 Proteínas do BiPRO, α -La e β -Lg, identificadas em HPLC-WATERS

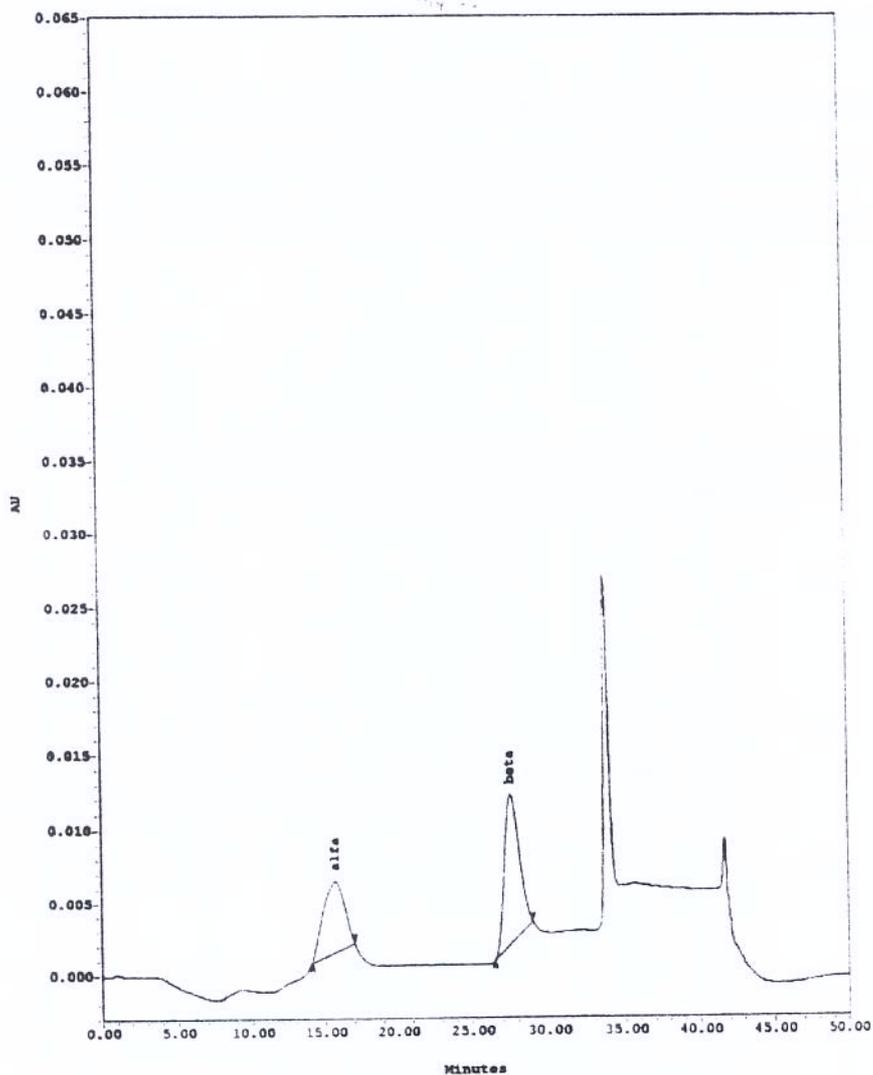


Figura 3.4 Proteínas do BiPRO, α -La e β -Lg, identificadas em HPLC-WATERS

Posteriormente o Laboratório de Separações Físicas (LASEFI) adquiriu o cromatografo ÄKTA-PURIFIER, no qual passou-se a realizar as análises cromatográficas para a quantificação das proteínas do BiPRO. Exemplo de nossos resultados da quantificação das proteínas α -La e β -Lg do BiPRO são mostrados na Figura 3.5 e Figura

3.6, a fase rica em PEG (extrato) e a fase rica em sal (refinado) respectivamente, obtidos nos estudos de transferência de massa utilizando o extrator PRDC.

Desta forma, a metodologia foi desenvolvida com êxito em HPLC da WATERS equipado com coluna Mono-Q HR 5/5 (PHARMACIA), e posteriormente transferida para o cromatografo ÄKTA-PURIFIER (PHARMACIA BIOTECH), equipado com a mesma coluna.

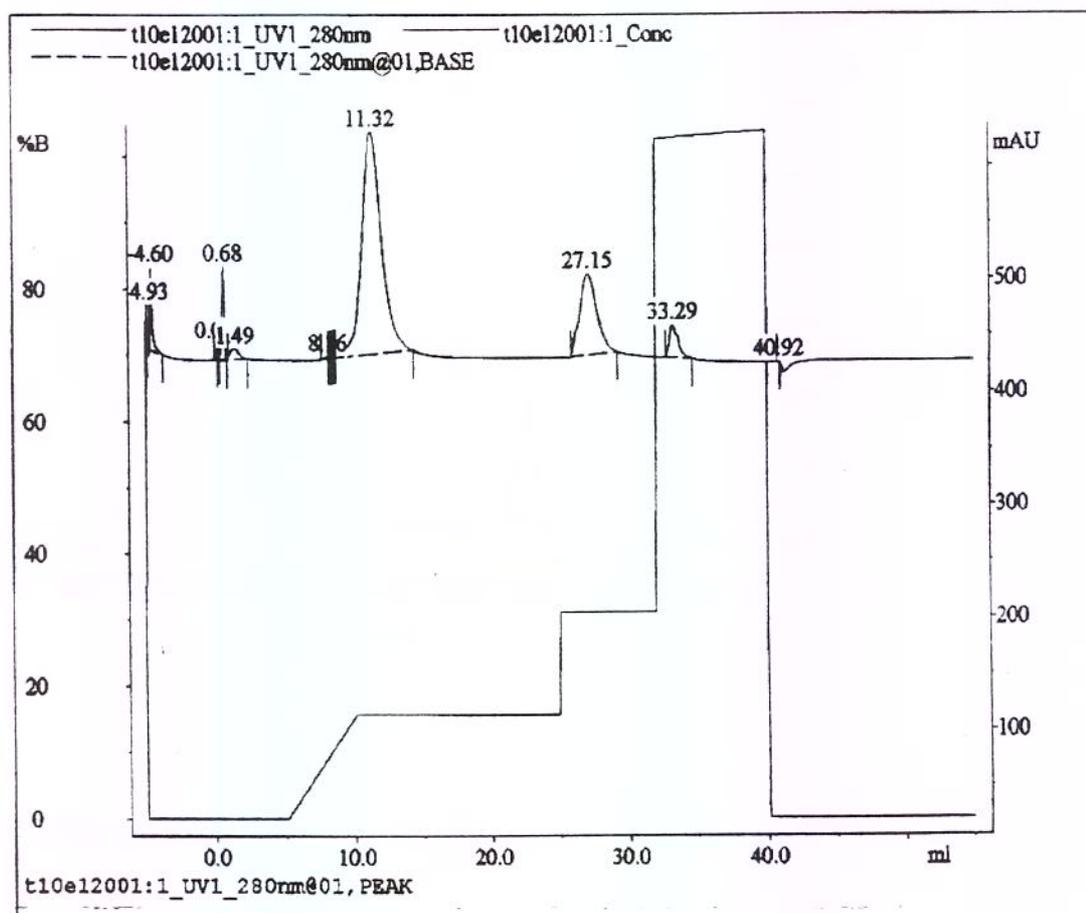


Figura 3.5 Proteínas do BiPRO, α -La (11:32 min) e β -Lg (27:15 min), da corrente extrato da coluna PRDC, obtidas em HPLC-ÄKTA PURIFIER

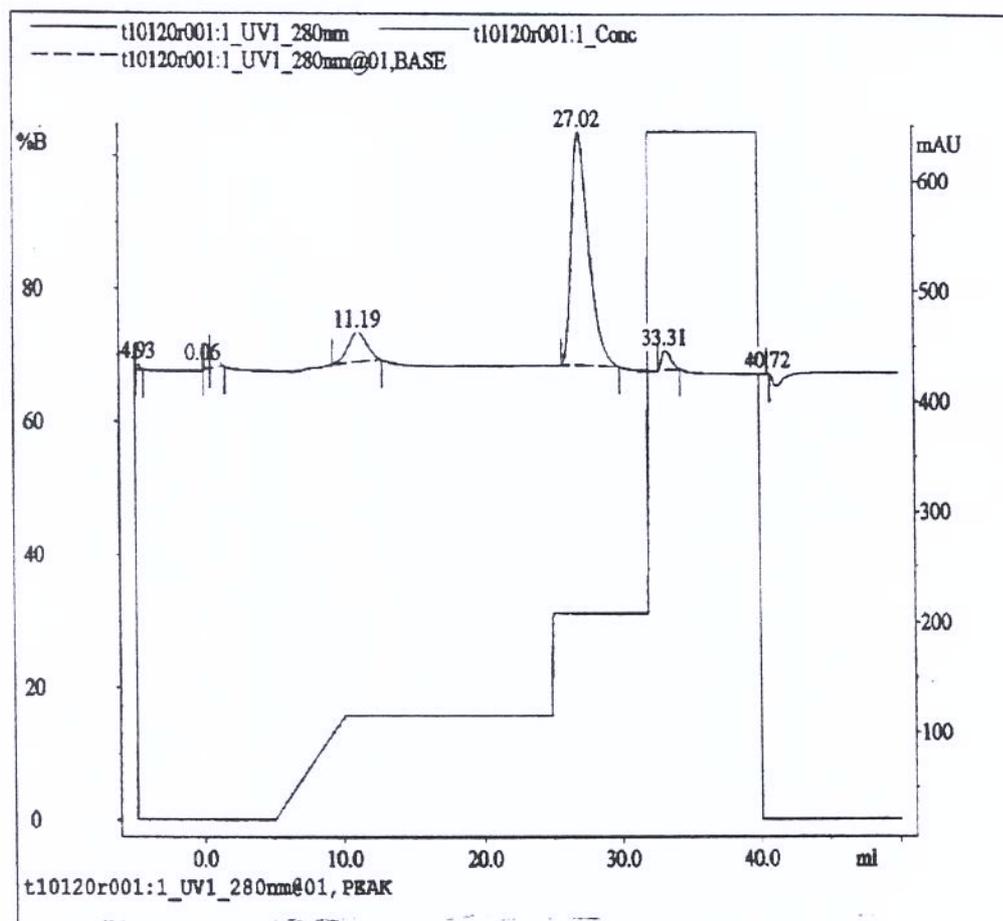


Figura 3.6 Proteínas do BiPRO, α -La (11:19 min) e β -Lg (27:02 min), da corrente de refinado da coluna PRDC, obtidas em HPLC-ÅKTA PURIFIER

3.3 LINHAS DE AMARRAÇÃO

Os resultados das medidas do SAB em equilíbrio são apresentados na Tabela 3.4, na qual se mostra os valores de composição global e os dados obtidos de composições da fase superior e da fase inferior do SAB com proteínas (0,6 % da fase salina). As medidas foram realizadas em células de equilíbrio. Esses dados permitiram a construção das linhas de amarração. As linhas de amarração obtidas são apresentadas na Figura 3.7.

Tabela 3.4 Linhas de amarração a 25 °C, pH 7, para o sistema PEG 1500 e Fosfato de Potássio contendo 0,6 % de BiPRO

| | Sistema Total ¹ | | | SAB-Fase Inferior ² | | | SAB-Fase Superior ² | | |
|---|----------------------------|-------------|--------------------------|--------------------------------|-------------|--------------------------|--------------------------------|-------------|--------------------------|
| | Kpi % p / p | PEG % p / p | H ₂ O % p / p | Kpi % p / p | PEG % p / p | H ₂ O % p / p | Kpi % p / p | PEG % p / p | H ₂ O % p / p |
| 1 | 17,976 | 14,008 | 67,412 | 23,996 | 3,154 | 72,285 | 2,341 | 40,495 | 57,155 |
| 2 | 15,924 | 12,615 | 70,857 | 20,465 | 3,305 | 75,675 | 3,031 | 35,567 | 61,393 |
| 3 | 14,370 | 11,768 | 73,257 | 18,717 | 3,537 | 77,169 | 4,258 | 30,175 | 65,554 |
| 4 | 13,635 | 10,728 | 75,034 | 16,323 | 4,562 | 78,514 | 4,760 | 27,314 | 67,319 |

¹ A cada ponto de mistura do sistema total foi adicionado 0,604 % de BiPRO.

² A concentração de PEG inclui o pequeno teor total de BiPRO presente nesta fase.

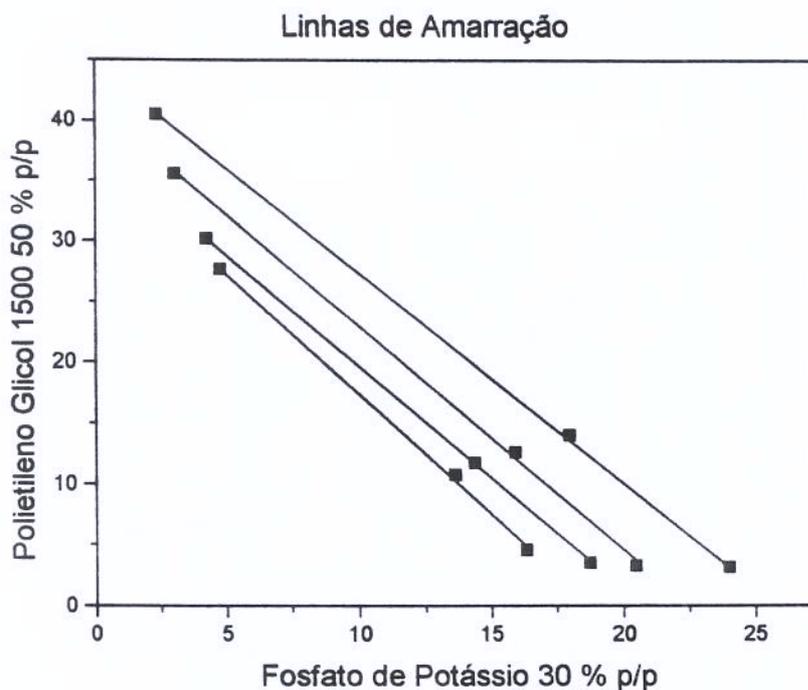


Figura 3.7 Linhas de Amarração para o Sistema PEG 1500-Fosfato de Potássio a pH 7,0 e 25 °C, contendo 0,6 % de BiPRO

A Figura 3.7 indica o bom alinhamento da composição global e das composições das duas fases para cada uma das linhas de amarração, demonstrando a boa precisão dos dados experimentais obtidos.

3.4 CURVA BINODAL

A curva binodal, que separa a região de uma fase (abaixo da curva) e a região de duas fases (acima da curva), foi obtida a partir de medidas experimentais de aproximadamente 200 pontos, segundo o método do ponto de névoa. Os resultados experimentais estão apresentados na Figura 3.8.

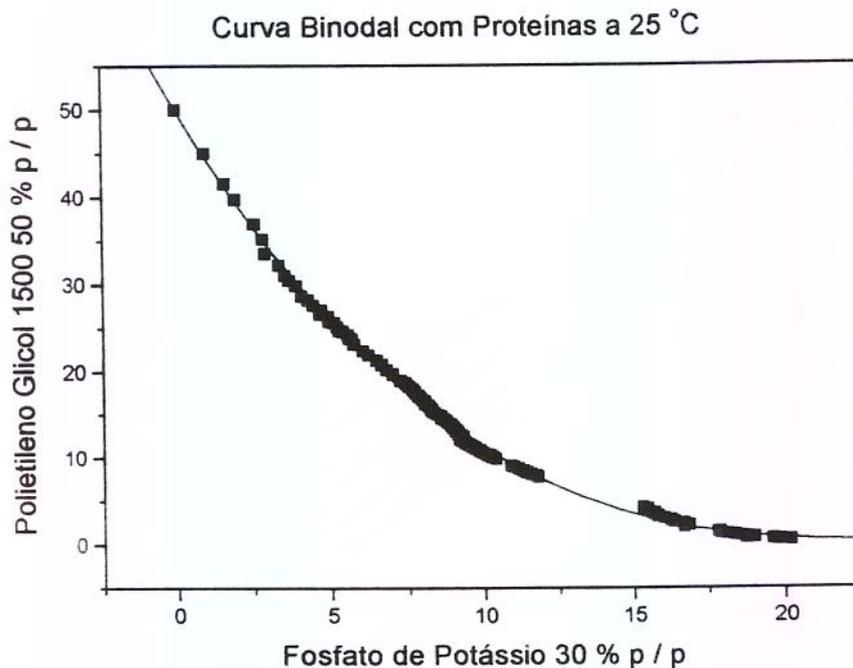


Figura 3.8 Curva Binodal a 25 °C

Na Figura 3.9 a curva binodal e as linhas de amarração são apresentadas no mesmo gráfico. Observou-se que a concentrações elevadas de sal, a binodal afastou-se dos valores obtidos nas linhas de amarração com um desvio de 0,07 % a 0,31 %, enquanto que a baixas concentrações de sal a binodal se diferencia muito pouco dos valores das linhas de amarração entre 0,01 % e 0,22 %. Essa diferença pode ser resultado da imprecisão do método de medida da curva binodal. De fato, a medida das linhas de amarração implica na montagem de um sistema diferente para cada composição global selecionada, a intensa mistura de todos os componentes e um longo tempo de descanso para que o sistema entre em equilíbrio. Por outro lado, o alinhamento das concentrações do ponto de mistura e das duas fases é uma indicação direta da boa qualidade dos dados. No caso da determinação direta da linha binodal, as seguintes adições de solução salina e de água para determinar a linha que separa as regiões monofásica e bifásica pode induzir uma maior propagação de

erros, além das dificuldades normais de detecção visual da transição entre uma e outra região.

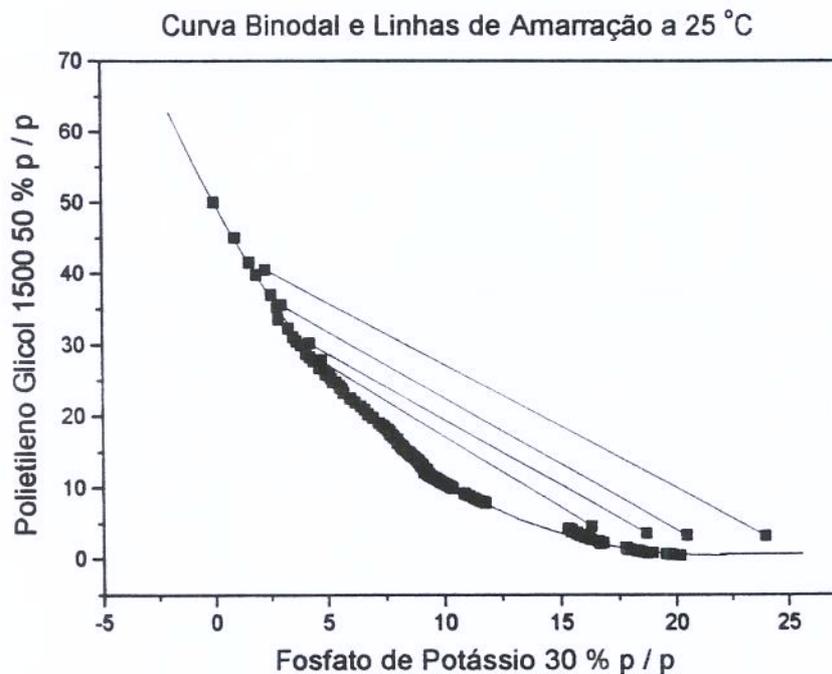


Figura 3.9 Resultados obtidos para as linhas de amarração e a curva binodal a 25 °C e pH 7.

3.5 COEFICIENTE DE PARTIÇÃO

Para o estudo do coeficiente de partição, fixou-se a concentração de BiPRO (0,6 % da fase salina), mudando-se as concentrações de PEG–Fosfato de Potássio–Água a 25 °C e pH 7,0 (vide Tabela 3.5). O primeiro sistema foi o utilizado em COIMBRA (1995) e os demais foram extraídos do diagrama mostrado por ALBERTSSON (1986) para PEG 1540 e Fosfato de Potássio a 20 °C.

Tabela 3.5 Concentrações utilizadas para obter o coeficiente de partição a 25 °C e pH 7,0

| Sistema | PEG % p/p | Fosfato % p/p | BiPRO % p/p* |
|---------|-----------|---------------|--------------|
| 1 | 14,00 | 18,00 | 0,6 |
| 2 | 12,60 | 16,00 | 0,6 |
| 3 | 11,80 | 14,40 | 0,6 |
| 4 | 10,74 | 13,66 | 0,6 |

*: % peso da fase salina

Os resultados de concentração para cada proteína ($K_{\alpha-La}$ e $K_{\beta-Lg}$) mostraram que o sistema 1, o estudado em COIMBRA (1995), forneceu melhores coeficientes de partição e maior valor de seletividade. Determinou-se que a proteína $\alpha-La$ foi para a fase superior e a proteína $\beta-Lg$ ficou na fase inferior do SAB em equilíbrio. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 3.6.

Tabela 3.6 Coeficiente de partição (K) com sua respectiva propagação de erros ($\pm \Delta K$) e a seletividade correspondente a 25 °C

| Sistema | $K_{\alpha-La} \pm \Delta K$ | $K_{\beta-Lg} \pm \Delta K$ | Seletividade |
|---------|------------------------------|-----------------------------|--------------|
| 1 | $7,97 \pm 1,007$ | $0,03 \pm 0,0001$ | 317,96 |
| 2 | $0,66 \pm 0,001$ | $0,06 \pm 0,001$ | 11,70 |
| 3 | $0,42 \pm 0,004$ | $0,04 \pm 0,002$ | 11,95 |
| 4 | $0,29 \pm 0,021$ | $0,005 \pm 0,001$ | 54,42 |

Foram também calculados os valores de rendimento e pureza (segundo as equações apresentadas no item 2.3 do Capítulo II) para cada proteína em ambas as fases, a superior ou polimérica e a inferior ou salina (vide Tabela 3.7). Observa-se que o sistema 1, correspondente à concentração de 14 % p / p PEG e 18 % p / p Kpi, forneceu o melhor resultado de rendimento (81,09 %) e maior porcentagem de pureza para a $\alpha-La$ na fase superior (93,42 %).

Tabela 3.7 Rendimento e Pureza das proteínas do BiPRO em ambas fases do SAB a 25°C

| Sistema | Rendimento (%) | | Pureza (%) | |
|---------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| | α -La Fase Superior | β -Lg Fase Inferior | α -La Fase Superior | β -Lg Fase Inferior |
| 1 | 81,09 | 98,67 | 93,42 | 95,72 |
| 2 | 26,99 | 96,94 | 67,28 | 85,05 |
| 3 | 18,64 | 98,12 | 69,82 | 83,79 |
| 4 | 12,50 | 99,74 | 91,79 | 83,01 |

A partir dos melhores resultados obtidos para o sistema 1, este sistema foi selecionado para dar continuidade às pesquisas objetivando determinar a melhor concentração de BiPRO. Para isto, fixou-se o sistema 14 % p / p PEG e 18 % p / p KPi, variando-se as concentrações de BiPRO (vide Tabela 3.8).

Tabela 3.8 Estudo da solubilidade de BiPRO no sistema 14 % p / p PEG e 18 % p / p KPi

| SISTEMA | PEG 1500 | SAL | BiPRO* |
|---------|----------|---------|--------|
| 5 | 14,00 % | 18,00 % | 0,2 % |
| 6 | 14,00 % | 18,00 % | 1,0 % |
| 7 | 14,00 % | 18,00 % | 1,2 % |

*: % peso da fase salina

Observou-se que nos sistemas 6 e 7 o BiPRO não se dissolveu completamente no SAB, havendo a ocorrência de precipitado na parte inferior da célula de equilíbrio, enquanto que no sistema 5 a aparência do SAB era leitosa e opaca, mas com o BiPRO permanecendo dissolvido no SAB, sem chegar a precipitar. Como esperado, os resultados de concentração para cada proteína, rendimentos e pureza (Tabelas 3.9 e 3.10) não foram satisfatórios.

Tabela 3.9 Estudo de solubilidade de BiPRO no SAB (14 % p / p PEG–1 8 % p / p KPi) a 25 °C

| Sistema | K α -La $\pm \Delta K$ | K β -Lg $\pm \Delta K$ | Seletividade |
|---------|-------------------------------|------------------------------|--------------|
| 5 | 6,67 \pm 2,88 | 0,12 \pm 0,0300 | 55,70 |
| 6 | 2,92 \pm 0,10 | 0,02 \pm 0,0002 | 169,83 |
| 7 | 5,84 \pm 0,67 | 0,02 \pm 0,001 | 337,78 |

Tabela 3.10 Rendimento e Pureza das proteínas do BiPRO em ambas fases do SAB a 25 °C

| Sistema | Rendimento (%) | | Pureza (%) | |
|---------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
| | α -La Fase Superior | β -Lg Fase Inferior | α -La Fase Superior | β -Lg Fase Inferior |
| 5 | 77,51 | 94,15 | 75,55 | 94,72 |
| 6 | 60,69 | 99,10 | 94,01 | 91,53 |
| 7 | 75,99 | 99,07 | 95,02 | 94,65 |

Na análise cromatográfica do sistema 1, o programa de quantificação das proteínas adequou-se muito bem. Tendo sido a concentração mais elevada de BiPRO que não acarretou problemas de precipitação e tendo também bons valores de coeficiente de distribuição e elevada seletividade, optou-se por continuar o estudo empregando-se este nível de concentração de isolado protéico.

Por fim, deve-se mencionar que parte dos resultados de partição do BiPRO em Sistemas Aquosos Bifásicos foram publicados em ALVES et alii (1999).

3.6 PROPRIEDADES FÍSICAS DAS FASES DO SAB COM BIPRO

O PEG 1500 foi caracterizado mediante análise cromatográfica por permeação em gel (vide Figura 3.10), resultando uma polidispersibilidade de 1,025487. Também foi medida a sua umidade, cujo resultado foi de 2,75 % \pm 0,07 %.

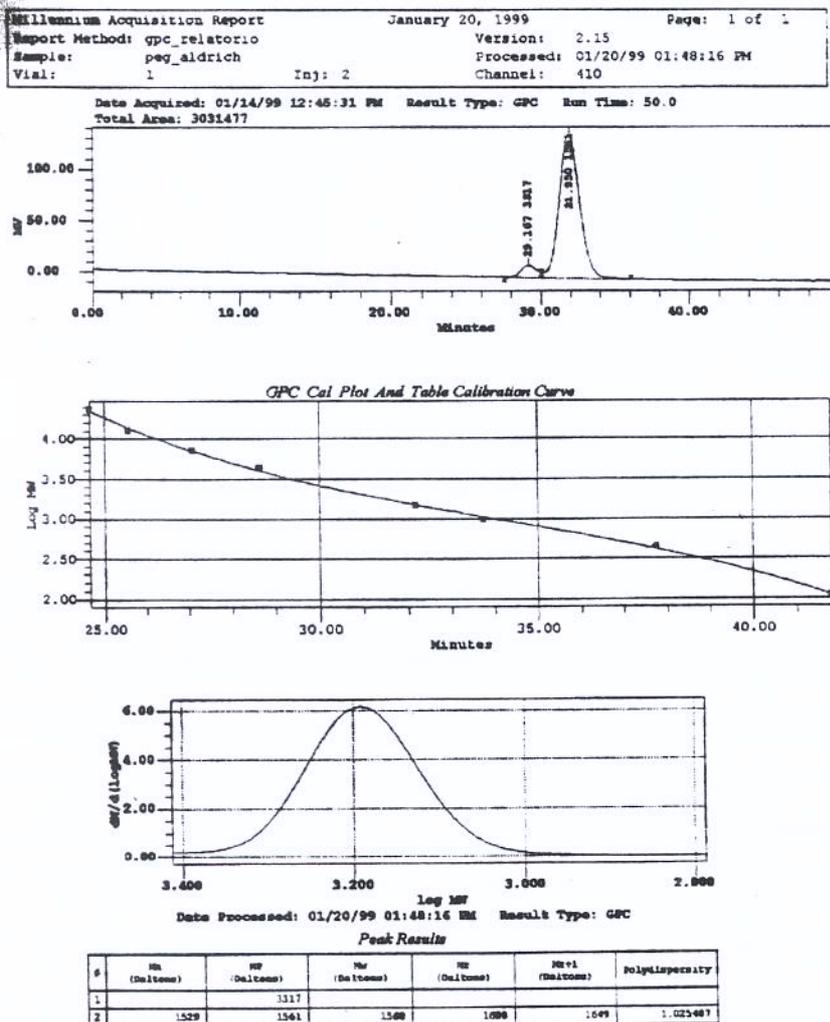


Figura 3.10 Cromatograma de análise da polidispersabilidade do PEG 1500 – Aldrich

As propriedades físicas foram medidas para cada fase superior e inferior dos SABs em equilíbrio. Todas as medidas foram realizadas à temperatura de 25 °C. Para os 7 sistemas analisados anteriormente (Tabela 3.5 e 3.8) foram medidas as densidades. Os resultados são mostrados na Tabela 3.11 :

Tabela 3.11. Densidades das fases do SAB (em equilíbrio) com proteínas (0,6 - 1,0 % BiPRO) a 25 °C

| Sistema | Fase superior (Polimérica) (g / mL) | Fase Inferior (Salina) (g / mL) | Diferença de Densidades (g / mL) |
|---------|--|------------------------------------|-------------------------------------|
| 1 | 1,0891 | 1,2327 | 0,1436 |
| 2 | 1,0862 | 1,1975 | 0,1113 |
| 3 | 1,0867 | 1,1746 | 0,0879 |
| 4 | 1,0869 | 1,1589 | 0,0720 |
| 5 | 1,0884 | 1,2315 | 0,1431 |
| 6 | 1,0867 | 1,2352 | 0,1485 |
| 7 | 1,0897 | 1,2359 | 0,1462 |

Observa-se que a diferença de densidade entre as fases é relativamente pequena, mas suficiente para uma decantação somente pela ação da gravidade em equipamento contínuo. Isso foi também observado na rápida formação das fases no SAB (superior polimérica e inferior salina), tanto em células de equilíbrio quanto na preparação dos sistemas para os estudos de hidrodinâmica (sem proteínas) e de transferência de massa. Estas densidades foram utilizadas para o cálculo do rendimento das proteínas no SAB para os sistemas em estudo. Os sistemas 1, 5, 6 e 7 apresentaram o mesmo teor de PEG 1500 e Fosfato de Potássio pH 7,0, de forma que as densidades de cada uma das duas fases eram muito próximas para estes diferentes sistemas. As pequenas diferenças são decorrentes de mudanças na concentração de BiPRO nestes sistemas. Já nos sistemas 2, 3 e 4 os teores de PEG e Fosfatos de Potássio são menores, justificando os também menores valores de densidade observados.

Também foram medidas as densidades do SAB em equilíbrio a 25 °C utilizados nos experimentos de *hold-up* (sem BiPRO) e transferência de massa (4,06 % BiPRO da fase salina). Os valores obtidos são apresentados na Tabela 3.12 .

Tabela 3.12. Densidades das fases do SAB (em equilíbrio) a 25 °C, pH 7,0

| Fase | Densidade (g / mL) |
|------------------------------|-----------------------|
| Polimérica | 1,088237 |
| Salina pH 7 | 1,214040 |
| Salina pH 7 + BiPRO (4,06 %) | 1,234352 |

As viscosidades foram medidas para os sistemas preparados para os estudos de *hold-up* e de transferência de massa. Observou-se a elevada diferença de viscosidade entre as fases, com o que se verificou que foi adequado operar o equipamento de extração com a fase polimérica de maior viscosidade como a fase dispersa. Os valores são apresentados na Tabela 3.13.

Tabela 3.13. Viscosidades das fases do SAB (em equilíbrio) a 25 °C

| Fase | Viscosidade x 10 ³ (Pa s) |
|------------------------------|---|
| Polimérica | 16,215 |
| Salina pH 7 | 1,942 |
| Salina pH 7 + BiPRO (4,06 %) | 2,345 |

A tensão interfacial entre ambas fases é baixa e a presença das proteínas faz com que seu valor diminua ainda mais, como pode-se observar no sistema com BiPRO (vide Tabela 3.14). Os baixos valores de tensão interfacial indicam que as fases tem pouca dificuldade de dispersão no extrator e precisam de pouca energia de agitação.

Tabela 3.14. Tensão interfacial entre as fases do SAB (em equilíbrio) a 25 °C

| Interface | Tensão Interfacial (mN / m) |
|---|--------------------------------|
| Polimérica e Salina pH 7 (sem BiPRO) | 1,253 |
| Polimérica e Salina pH 7 (com BiPRO 4,06 %) | 0,520 |

3.7 HIDRODINÂMICA NO EXTRATOR PRDC

3.7.1 Fração volumétrica retida (*Hold-Up*) da fase dispersa

O *hold-up* para nosso sistema representa o percentual de volume da fase polimérica presente no equipamento capaz de extrair a α -La da mistura das proteínas dissolvidas na fase salina.

O *hold-up* é afetado por fatores como a velocidade de rotação, diâmetro de disco, altura de compartimento, relação volumétrica das fases e o diâmetro interno da coluna. Para o presente estudo foi analisada a influência das relações das vazões das fases (V_d / V_c) a diferentes velocidades de rotação, à temperatura ambiente (25 °C), utilizando o Método de Estancamento. O estado estacionário foi atingido em menos de 30 minutos de operação fechada e contínua, o que foi observado através da constância no nível da interface na parte superior da coluna.

Para obter valores de *hold-up* ou fração volumétrica retida da fase polimérica, foram realizados ensaios mantendo constante o valor da vazão da fase contínua ($4,45 \times 10^{-4}$ kg/s). A vazão da fase dispersa foi aumentada para diferentes velocidades de rotação até a formação de uma segunda interface na parte inferior da coluna. Observou-se também que as fases se apresentaram como um líquido opaco, com a presença de gotas muito pequenas. Esse comportamento característico é denominado de inundação.

Em sistemas de extração tradicional, usando solventes orgânicos, o *hold-up* aumenta com o aumento da velocidade de rotação dos discos. Esse aumento da rotação provoca a quebra das gotas da fase dispersa na superfície limite do disco do extrator. Com isto há um

incremento do número de gotas ao longo da coluna, gotas de menor diâmetro, o que significa um aumento do tempo de residência da fase dispersa na coluna com um número maior de gotas de menor diâmetro, a área de contato entre as fases aumenta e o tempo de residência da fase dispersa no equipamento também aumenta, o que é benéfico para o processo de transferência de massa. Por outro lado, com elevadas velocidades de rotação, a mistura axial aumenta e por consequência a transferência de massa é diminuída. A velocidade de rotação controla o tamanho das gotas, o *hold-up* e portanto o projeto de colunas.

Na Figura 3.11 é apresentado um conjunto de resultados experimentais para duas versões da RDC. A Figura mostra que com o tipo PRDC é possível obter maior fração volumétrica retida da fase dispersa e portanto maior transferência de massa devido à utilização de discos com orifícios. Observou-se que no RDC original obteve-se pequeno aumento do *hold-up* com a variação da velocidade de rotação e que a inundação foi atingida rapidamente em baixas velocidades de rotação (< 100 rpm). No caso do PRDC, os resultados de *hold-up* até 100 rpm não se diferenciam significativamente dos dados obtidos com o RDC. Mas a 125 e 150 rpm os dados de *hold-up* foram muito elevados com o PRDC e não houve problemas de inundação do equipamento nas vazões selecionadas. Já no RDC as velocidades de rotação de 125 e 150 rpm não puderam ser utilizadas porque o equipamento tendia rapidamente à inundação.

As medidas de *hold-up* na PRDC e RDC são apresentadas na Figura 3.11 :

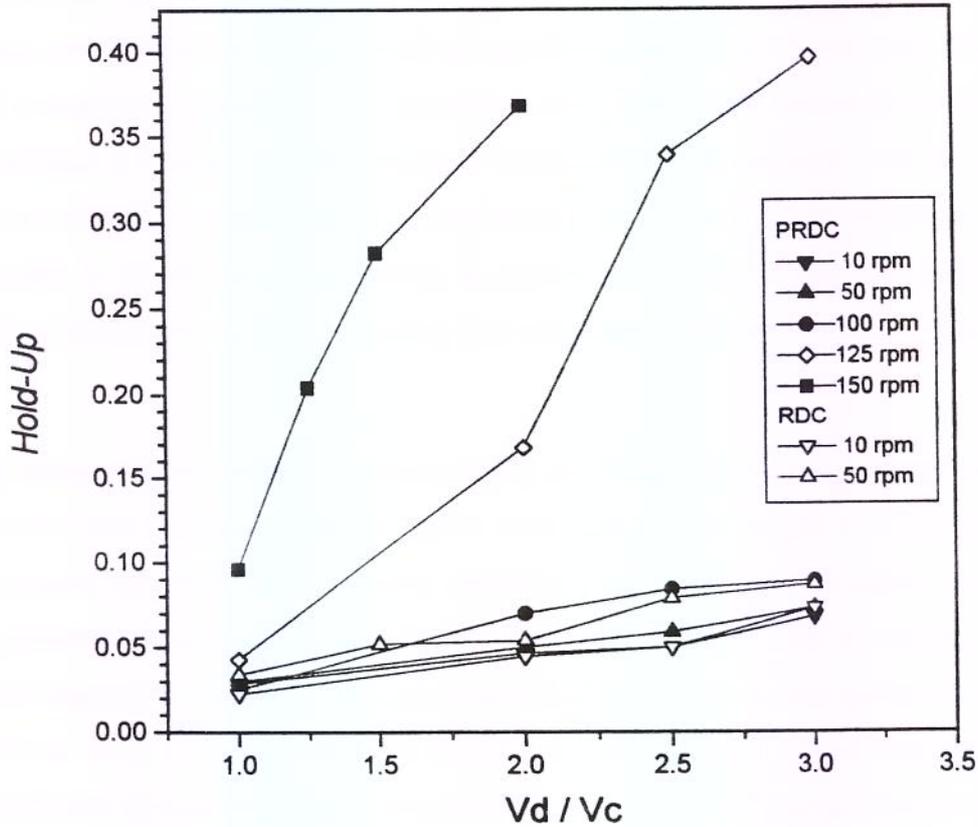


Figura 3.11 Fração Volumétrica Retida *Hold-Up* em PRDC e RDC

Deve-se observar que tais velocidades de rotação (10 – 150 rpm) são muito menores que as usualmente empregadas em colunas RDC. Isto é possível pelo baixo valor de tensão interfacial que permite a obtenção de gotas muito pequenas a uma baixa rotação. Gotas pequenas elevam o *hold-up* e aproximam o equipamento do limite de inundação. Os discos perfurados, utilizados na PRDC, reduzem os obstáculos ao escoamento, distanciando o momento de inundação do equipamento, mas, por outro lado, aumentam a ruptura de gotas e, por consequência, elevam o *hold-up*.

KORCHINSKY e AL-HUSSEINI (1986) obtiveram uma série de valores de *hold-up* na faixa de 0,0210 – 0,1218 para um extrator RDC de 21,9 cm de diâmetro, com discos de 11,0 cm de diâmetro em um sistema tolueno-acetona-água, com a acetona se transferindo da fase contínua para a dispersa (tolueno). Os autores estudaram a influência de vários tipos de distribuidores e de várias velocidades de rotação sobre o tamanho das gotas e o *hold-up* da fase dispersa. Mostraram que o *hold-up*, para este sistema em particular, aumentou com o aumento de número de orifícios no distribuidor e com a velocidade de rotação, enquanto que o tamanho das gotas diminuiu com o aumento do número de orifícios no distribuidor e com a velocidade de rotação. Concluíram que o coeficiente de transferência de massa foi dependente do tamanho das gotas formadas pelos diferentes tipos de distribuidores. Para o presente trabalho utilizou-se um único tipo de distribuidor e observou-se que a fase dispersa ao atravessar o distribuidor, em conjunto com a velocidade de rotação, resultava em gotas de pequeno tamanho. Os valores de *hold-up* obtidos no presente trabalho estão na faixa de 0,025 até 0,398. Essa diferença entre nossos valores e os obtidos pelos autores deve-se a vários fatores como : a geometria da coluna, o sistema utilizado e as condições de operação, mas a principal razão deve ser o efeito combinado da tensão superficial bem baixa apresentada pelo sistema sob consideração e o uso de discos com furos, ambos os aspectos concorrendo para a obtenção de gotas muito pequenas que elevam o *hold-up*.

COIMBRA et alii (1998) apresentaram medidas de *hold-up* obtidas em um extrator PRDC para um sistema similar. O valores apresentados variaram de 0,024 até 0,244, os quais tem uma pequena diferença com os resultados obtidos (0,025 até 0,398). Os autores trabalharam com o sistema PEG 6000 + Fosfato de Potássio, que deve apresentar tensão interfacial pouco maior que para o SAB utilizado neste trabalho. Deste modo, a diferença de tensão interfacial deve ser o principal motivo de ter-se obtido maiores valores de *hold-up* do que aqueles relatados por COIMBRA (1998).

A Figura 3.12 apresenta a influência da razão de vazões das fases e da rotação sobre o *hold-up* da fase polimérica. O desempenho do extrator, trabalhando em processo contínuo, depende da quantidade de solvente utilizado para a remoção do soluto presente na

alimentação. Se percebe que a maior relação de vazões das fases que entram no extrator favorece a retenção de uma maior quantidade de fase dispersa no interior da região de extração do equipamento. Da Figura 3.12 observa-se o comportamento característico das curvas de aumentar com o aumento da velocidade de rotação e da razão de vazões. A partir de 100 rpm o *hold-up* aumenta mais rapidamente com a velocidade de rotação e, principalmente para relações de vazões mais altas, o equipamento tende rapidamente a se aproximar da situação de inundação. Comportamento similar foi mostrado em KUMAR e HARTLAND (1995) para o sistema acetato de butila-acetona-água em uma coluna RDC de 76 mm de diâmetro. No extrator *Graesser*, foi verificada a independência do *hold-up* da fase polimérica com a velocidade de rotação e com a relação de vazões (COIMBRA, 1995), portanto a capacidade e desempenho do extrator não foram reduzidos pela operação do equipamento em baixas velocidades de agitação. Ao contrário, o PRDC apresentou o comportamento característico com o *hold-up* aumentando com as rotações e com a relação de vazões.

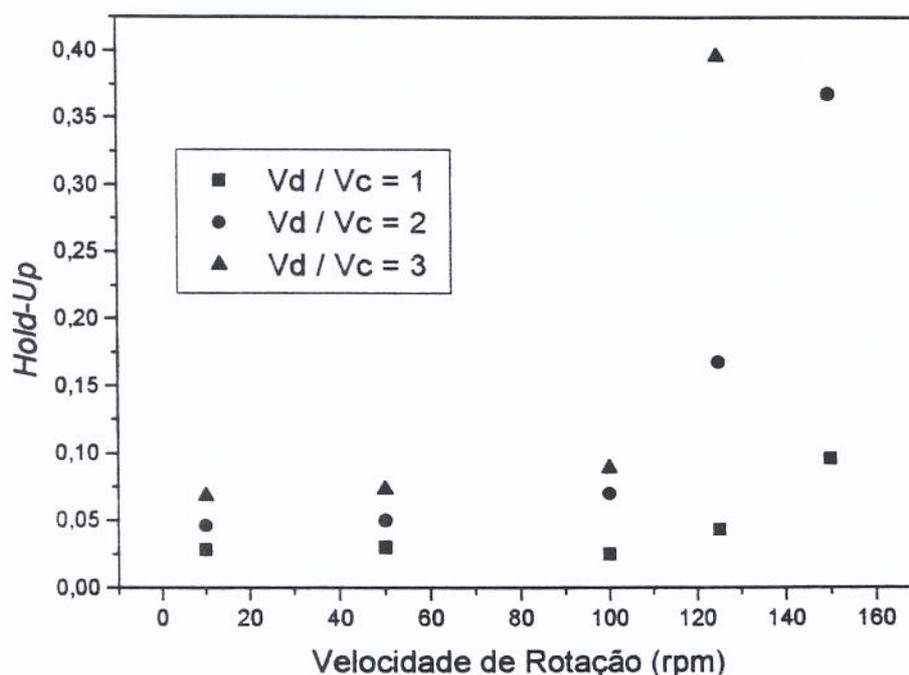


Figura 3.12 Dependência do *Hold-Up* com a velocidade de rotação em coluna PRDC; (V_d / V_c = relação entre as vazões das fases polimérica e salina)

A partir deste estudo hidrodinâmico foram selecionadas as condições de trabalho para os estudos de transferência de massa. Procurou-se trabalhar em velocidades de rotação menores que 150 rpm de forma a evitar uma aproximação da situação na qual a coluna tende à inundação, assim como reduzir o risco de uma eventual desnaturação de proteínas como resultado de uma agitação mais vigorosa. Optou-se também por trabalhar na faixa de relação de vazões próximas a 1 ($0,5 \leq V_d / V_c \leq 2$), tanto pela maior facilidade de obtenção das duas fases antes de iniciar o experimento, como pela menor propensão deste sistema provocar inundação em velocidades de rotação mais altas.

Para uma comparação mais geral dos resultados apresentados neste trabalho e outros relatados na literatura, resolveu-se utilizar a correlação apresentada por KUMAR e HARTLAND (1995). Estes autores desenvolveram uma correlação para estimativa de *hold-*

up da fase dispersa em extratores líquido-líquido mecanicamente agitados, incluindo colunas de extração RDC simétricas e assimétricas. A correlação foi obtida a partir de um banco de dados da literatura (1055 dados) em RDC com diferentes geometrias. Os autores obtiveram um desvio médio de 22,7 % em relação aos valores experimentais de RDC simétricos e assimétricos utilizados no desenvolvimento da correlação.

A aplicação da correlação de KUMAR e HARTLAND (1995) às situações estudadas neste trabalho gerou, no entanto, desvios muitos maiores, como pode ser observado na Figura 3.13. Os valores de desvio foram 78 % para o PRDC e 71 % para o RDC. Sendo calculados como o módulo da diferença entre o valor experimental e o calculado dividido pelo valor experimental. Desvios próximo a 100 % indicam erros de estimativa elevadíssimos. Embora um pouco menores no caso do RDC, os desvios são muito elevados nos dois casos. Tal resultado indica que o fator decisivo na obtenção dos elevados valores de *hold-up* obtidos neste trabalho é o baixo valor de tensão interfacial dos sistemas aquosos bifásicos, possibilitando que mesmo a baixas rotações se consiga tamanhos de gota bem pequenos. Os valores de tensão interfacial para sistemas aquosos bifásicos encontram-se usualmente na faixa de (0,009-0,500) mN / m (WU et alii, 1996), bem abaixo dos valores empregados por KUMAR e HARTLAND (1995) no desenvolvimento de sua correlação, (20 – 40) mN / m.

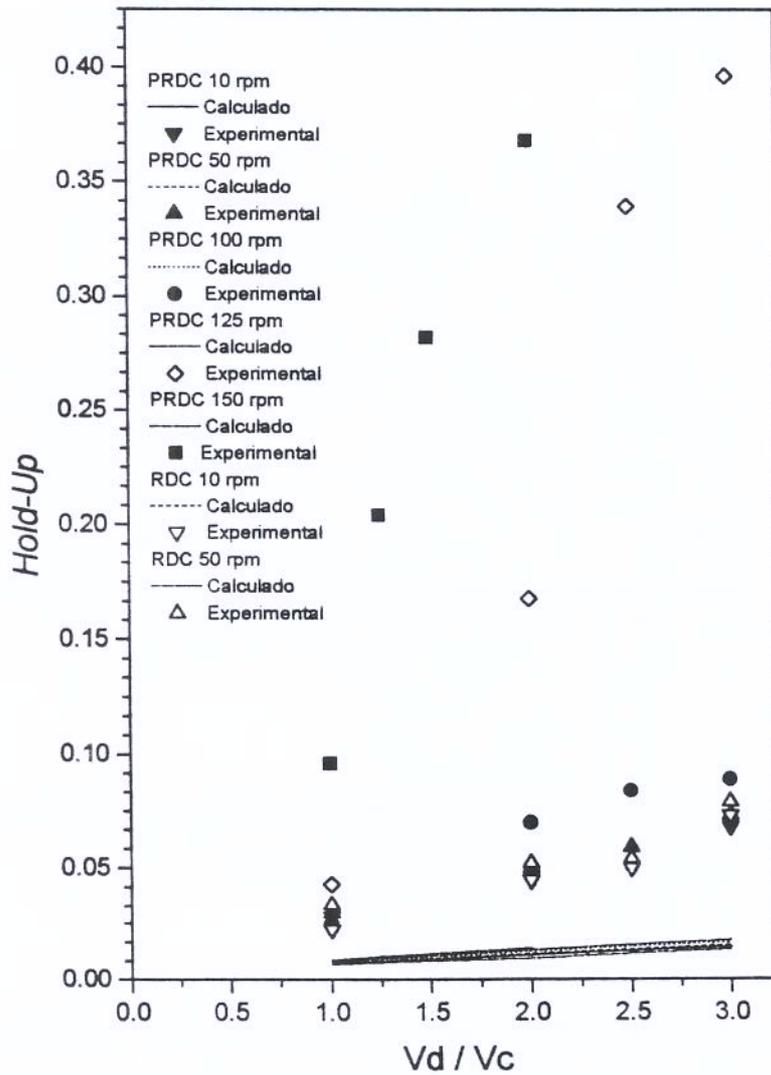


Figura 3.13 Comparação dos valores preditos e experimentais de *hold-up*, usando a correlação de KUMAR e HARTLAND (1995).

As velocidades características foram obtidas a partir das curvas $[V_d + V_c(x/(1-x))]$ versus $x(1-x)$ (equação de GAYLER e PRATT, 1951) empregando-se os dados experimentais. Os resultados são apresentados na Figura 3.14.

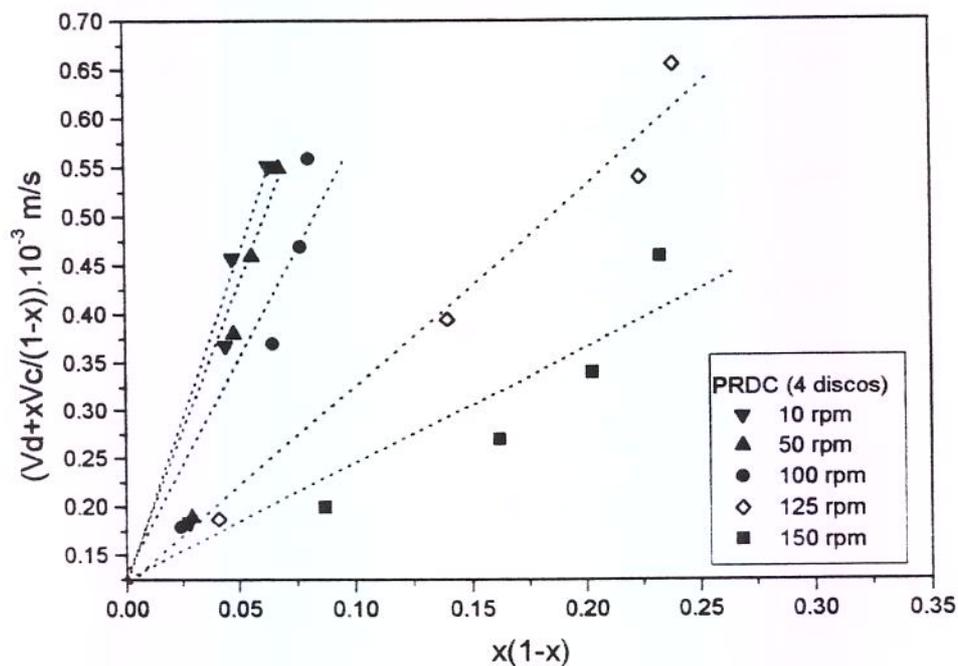


Figura 3.14 : Representação de dados experimentais utilizando o Método de GAYLER e PRATT (1951) em PRDC

A equação de Gayler e Pratt ajustou-se melhor aos nossos dados experimentais obtidos em PRDC. Os coeficientes de correlação obtidos neste caso encontram-se na faixa 0,9398 – 0,9980. No RDC os coeficientes de correlação foram de 0,9757 - 0,9854 (vide Figura 3.15). Os resultados dos valores de velocidade característica (V_K) são apresentados no anexo A (Tabelas A1 e A2).

As Figuras 3.14 e 3.15 indicam que os valores de *hold-up*, expressos na forma sugerida pela equação de GAYLER e PRATT, apresentam em geral o comportamento linear sugerido pela equação. O número de valores de *hold-up* para a coluna RDC foram obtidos em menor quantidade porque este equipamento tendia mais facilmente à inundação.

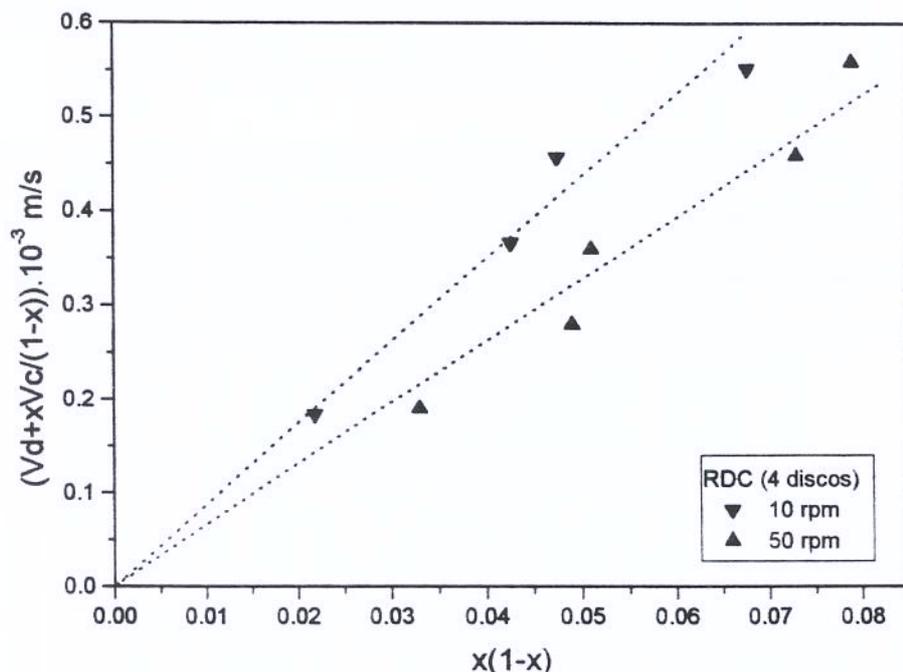


Figura 3.15 : Representação de dados experimentais utilizando o Método de GAYLER e PRATT (1951) em RDC

Na Figura 3.16 representa-se a velocidade característica como função da velocidade de rotação. Na RDC original, KUNG e BECKMAN (1961) constataram a presença de duas regiões com comportamentos distintos : para velocidades de rotação baixas, menores que 400 rpm, a velocidade característica era constante e independente da velocidade de rotação; já para valores maiores que 400 rpm, a velocidade característica torna-se inversamente proporcional à velocidade de rotação, indicando uma forte tendência à ruptura das gotas e produção de gotas de tamanho bem pequeno. Esta última tendência foi observada no caso deste trabalho para toda a faixa de velocidades investigada, cujos valores são muito menores que 400 rpm. A razão básica para este comportamento é a baixa tensão interfacial do sistema aqui empregado, permitindo obter gotas muito pequenas mesmo com baixas velocidades de rotação. Em relação a outro trabalho desenvolvido no grupo de pesquisa, em

equipamento similar, mas para sistema etanol hidratado – óleo (PINA e MEIRELLES, 2000), notou-se comportamento similar no caso da PRDC, só se diferenciando pelo fato das velocidades de rotações situaram-se em faixa um pouco maior (50 – 350 rpm).

Neste mesmo trabalho observou-se para a RDC uma leve tendência de queda da velocidade característica, não a tendência tão acentuada observada neste trabalho. Deve-se mencionar que a tensão interfacial do sistema etanol hidratado – óleo é quase o dobro do valor correspondente para o sistema aquoso bifásico empregado neste trabalho.

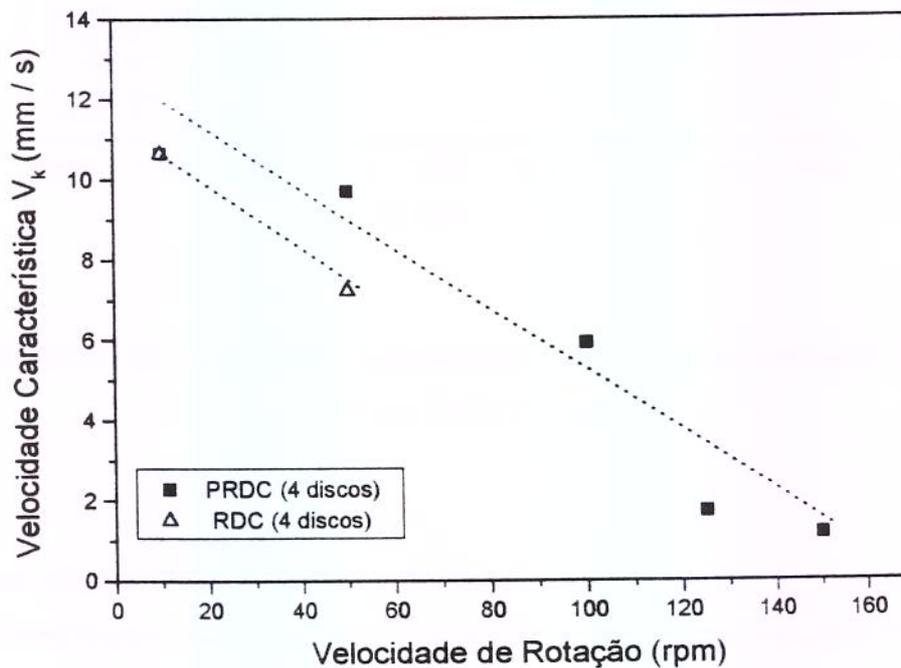


Figura 3.16 Velocidade característica para cada velocidade de rotação em coluna PRDC e RDC

Pode-se concluir que sistemas aquosos bifásicos do tipo PEG / Sal podem ser utilizados sem maiores dificuldades em extratores contínuos do tipo RDC ou PRDC e que em função dos baixos valores de tensão interfacial destes sistemas, baixas velocidades de rotação já garantem valores altos de hold-up e, em decorrência, elevadas áreas de contato entre as duas fases. Em relação ao RDC original, a coluna PRDC apresenta as vantagens de

garantir valores de hold-up mais elevados e principalmente de permitir o processamento de maiores vazões sem ocorrer inundação.

3.8 TRANSFERÊNCIA DE MASSA

Um primeiro conjunto de experimentos de transferência de massa foi realizado empregando uma concentração de BiPRO de 0,6 % p / p dissolvidos na fase salina, concentração que os experimentos de equilíbrio indicaram como a mais adequada. No entanto, após muitas tentativas de quantificar as proteínas nas correntes de saída, constatou-se que a reprodutibilidade das análises era pequena e que era muito difícil determinar uma ou outra proteína, a depender da corrente de saída considerada.

Optou-se então por aumentar a concentração de BiPRO a ser adicionada à fase salina. O sistema aquoso bifásico continha 14 % p / p de PEG e 18 % p / p de Fosfato de Potássio pH 7,0. À fase salina deste sistema adicionava-se 4,06 % p / p de BiPRO. Após dissolução esta fase era filtrada e usada como alimentação. Como mesmo após a filtração o seu aspecto ainda era fortemente leitoso, e com o intuito de evitar o uso de uma alimentação de fase salina com BiPRO não homogênea, optou-se por colocar o recipiente contendo esta fase sobre um agitador magnético, de forma a garantir sua homogeneidade.

Os estudos de transferência de massa foram feitos de forma que a transferência ocorresse da fase salina para a fase polimérica, como o estudado por COIMBRA (1995). Nos experimentos alcançou-se o regime estacionário a aproximadamente 40 minutos de operação, observado pela constância do nível da interface na fase superior do PRDC e pela constância das concentrações das correntes de saída. Após 10 minutos de operação começou-se a coletar amostras do extrato (fase rica em polímero) e do refinado (fase rica em sal). As amostras foram devidamente etiquetadas e armazenadas (< 10 °C), logo depois foram diluídas em solução tampão, dessalinizadas em colunas PD-10 (PHARMACIA BIOTECH), filtradas em filtro SEP-PAK (WATERS) para posterior injeção no cromatografo (ÄKTA PURIFIER) e assim quantificar as proteínas. A maioria das medidas foi feita pelo menos em triplicata.

A Figura 3.17 ($V_d / V_c = 0,5 / 1$; 50 rpm) apresenta um resultado experimental típico. Como se nota, a concentração de α -La no refinado caiu lentamente no início do experimento tendendo a se estabilizar após transcorridos 40 min. Um perfil similar pode ser observado para a β -Lg no refinado, só que seu valor se estabilizou em torno de uma concentração bem maior, próximo a 20 mg / mL. As concentrações das duas proteínas na corrente de extrato sofreram mudanças maiores no período entre 30 e 50 minutos e depois se estabilizaram. As concentrações das correntes de saída indicam que o refinado manteve uma alta concentração de β -Lg, mas perdeu grande parte da α -La dissolvida inicialmente na fase salina, enquanto a fase extrato enriqueceu-se significativamente em α -La e em extensão um pouco menor em β -Lg. Considerando que a proporção entre β -Lg / α -La no BiPRO é de 59 % : 21 %, pode-se concluir que a corrente de extrato representa uma solução enriquecida em α -La. Além disso, deve-se observar que em relação às quantidades iniciais de α -La e β -Lg dissolvidas na fase salina, uma proporção maior de α -La se transfere para a fase polimérica do que a β -Lg. A maior parte desta última mantém-se na fase salina.

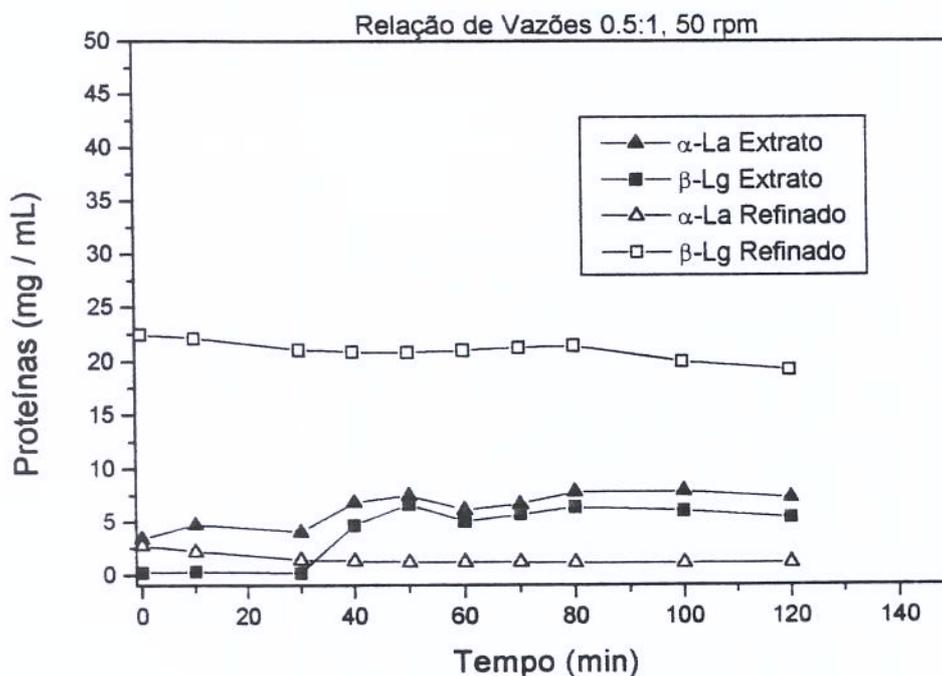


Figura 3.17 Concentração das proteínas α -La e β -Lg do BiPRO no extrato e no refinado ($V_d / V_c = 0,5:1$; 50 rpm)

A Figura 3.18 apresenta as concentrações de α -La na corrente de extrato em função da velocidade de rotação para os diferentes experimentos realizados. Como se nota por este gráfico a elevação da velocidade de rotação aumentou a extração de α -La da fase salina para a fase polimérica, enquanto o aumento da relação de vazões fase dispersa (polimérica) / fase contínua (salina) diminuiu a concentração de α -La na corrente de extrato, já que a proteína extraída dissolveu-se em uma quantidade proporcionalmente maior de fase polimérica. Os resultados de transferência de massa podem ser observados nas Tabelas B1 e B2 do Anexo B.

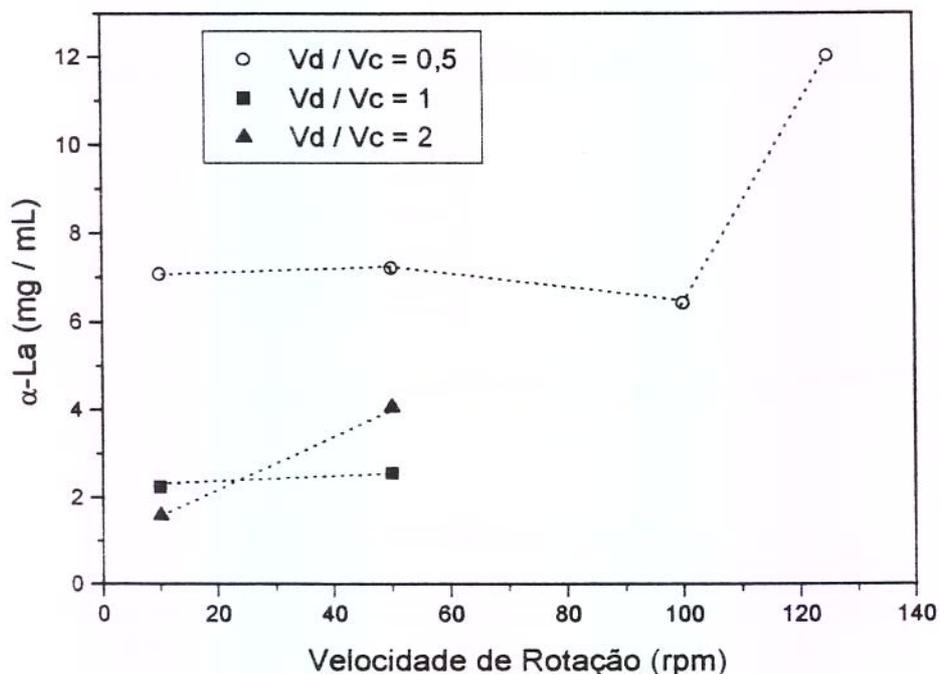


Figura 3.18 Concentração de α-La na Corrente de Extrato para cada Velocidade de Rotação no PRDC e para três Relações de Vazões

3.8.1 Coeficiente Global de Transferência de Massa

Para o estudo do coeficiente global de transferência de massa da α-La, foi inicialmente obtida a curva de equilíbrio para o sistema empregando-se os dados experimentais de partição de BiPRO. A curva foi obtida empregando-se as concentrações expressas em fração mássica em base livre de α-La, já que assim se obteve um melhor coeficiente de correlação (0,9902) e a equação pode ser bem aproximada por uma reta que passa pela origem. As frações mássicas de α-La em base livre desta mesma proteína foram calculadas a partir dos valores experimentais pela equação (3.1) :

$$W'_{\alpha-La} = \frac{W_{\alpha-La}}{1 - W_{\alpha-La}} \quad [3.1]$$

A curva de equilíbrio obtida a partir dos dados de equilíbrio para o sistema PEG – KPi pH 7,0 – Água é a reta dada pela equação :

$$W'_{E, \alpha-La} = 16,38955 W'_{R, \alpha-La} \quad [3.2]$$

Onde $W'_{E, \alpha-La}$ e $W'_{R, \alpha-La}$ são as concentrações da α -La no extrato (fase rica em polímero) e no refinado (fase rica em sal).

Obtida a curva de equilíbrio, procedeu-se ao cálculo do coeficiente de transferência de massa global. A equação utilizada é apresentada a seguir :

$$V'_{Pe} * (W'_{Ps} - W'_{Pe}) = K_E * a * V * (\Delta W'_{m}) \quad [3.3]$$

Onde V'_{Pe} é a vazão polimérica de entrada em base livre de α -La, com unidades de kg de fase polimérica / s; W'_{Ps} é a concentração de α -La na saída da fase polimérica em base livre de α -La, com unidades de kg α -La / kg da fase polimérica; W'_{Pe} é a concentração de α -La na entrada da fase polimérica em base livre de α -La, com unidades de kg α -La / kg da fase polimérica. K_E é o coeficiente de transferência de massa global. O produto $K_E.a$ tem unidades de kg de α -La / (m³. s. (kg de α -La / kg de fase polimérica)), onde 'a' é a área de transferência de massa por unidade de volume da região de extração em m² / m³. V é o volume da região de extração em m³. $\Delta W'_{m}$ é a média logarítmica das diferenças de concentrações em kg de α -La / kg de fase polimérica calculada empregando-se a curva de equilíbrio descrita anteriormente (TREYBAL, 1980). Os resultados obtidos do cálculo do coeficiente volumétrico de transferência de massa são apresentados na Tabela B.3 (anexo B) e na Figura 3.19 a seguir :

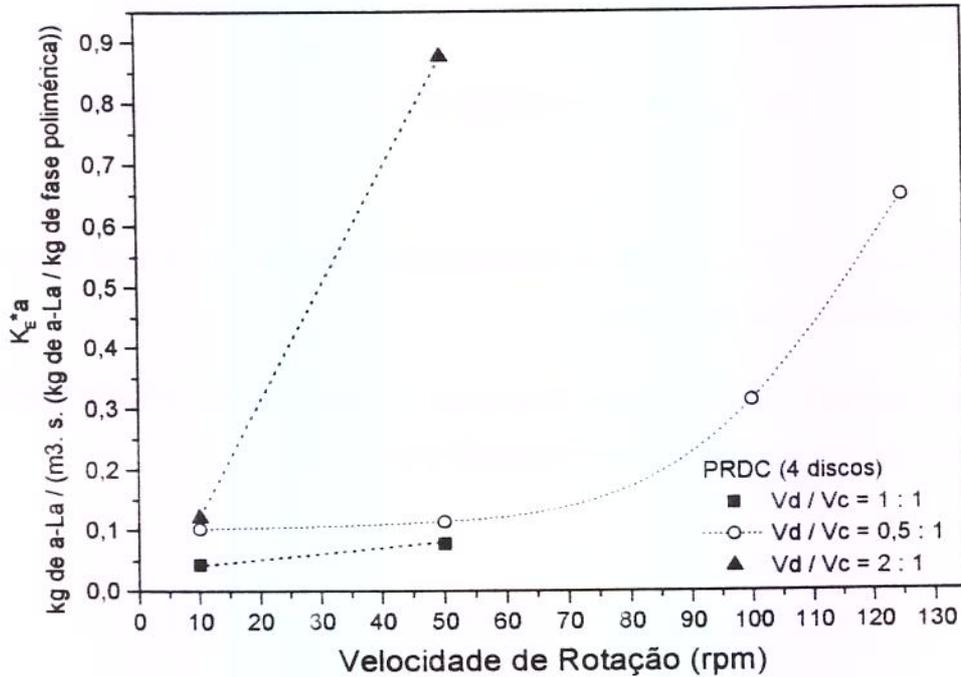


Figura 3.19 : Coeficientes Volumétricos de Transferência de Massa K_E^*a (kg de α -La / (m³. s. (kg de α -La / kg fase polimérica)))

De acordo com a Figura 3.19 nota-se que para velocidade de rotação de 10 rpm, os coeficientes globais volumétricos de transferência de massa encontram-se na faixa de 0,05 a 0,12 [kg de α -La / (m³. s. (kg de α -La / kg fase polimérica))], não ficando clara a influência da relação de vazões fase dispersa / fase contínua sobre os valores de coeficientes obtidos. Já o efeito das rotações é nitidamente positivo, em especial para valores acima de 50 rpm, no caso da relação de vazões 0,5 : 1 e para rotações de 50 rpm no caso da relação 2 : 1. O principal efeito neste caso deve ser o aumento da área de transferência de massa, como consequência da redução dos diâmetros das gotas de fase

dispersa e de seu *hold-up* com o aumento da velocidade de rotação dos discos. O aumento da área tem efeito direto e proporcional sobre o coeficiente volumétrico K_{Fa} .

Em estudos de transferência de massa para ácido oléico, transferido de uma fase oleosa para uma fase alcoólica, e realizados em equipamento similar ao deste trabalho, PINA e MEIRELLES (2000) obtiveram coeficientes de transferência na faixa de 0,25 a 0,50 [(kg de ácido oléico / (m³. s. (kg ácido oléico / kg fase oleosa))], comparáveis aos valores obtidos neste trabalho. Embora α -La seja um composto de cadeia molecular muito maior que a do ácido oléico e, portanto, provavelmente com uma difusividade menor na fase polimérica do que ácido oléico apresenta na fase oleosa do sistema empregado por PINA e MEIRELLES (2000), deve-se notar que a viscosidade da fase polimérica tem valor um pouco acima da metade do valor de viscosidade da fase oleosa, o que contribui para atenuar o efeito do tamanho da cadeia da molécula de soluto.

Por outro lado, a tensão interfacial no SAB contendo BiPRO é da ordem de 1 / 4 da tensão interfacial do sistema álcool – óleo, indicando que o efeito da velocidade de rotação sobre o tamanho da área interfacial de transferência de massa é muito mais pronunciado no primeiro caso do que no segundo. De fato PINA e MEIRELLES (2000) relatam valores de *hold-up* máximo na casa de 15 %, enquanto neste trabalho atingiu-se *hold-up* maiores que 30 %, o que indica uma área de transferência de massa muito maior quando se emprega os sistemas aquosos bifásicos na Coluna de Discos Rotativos Perfurados. Desta forma, os resultados deste trabalho parecem compatíveis com os valores de coeficientes apresentados por PINA e MEIRELLES (2000).

Por fim, vale mencionar que no cálculo dos coeficientes de transferência não se levou em consideração os efeitos da dispersão axial. Tais efeitos causam alterações na forma como a força motriz de transferência se distribui no interior do extrator. Este efeito não foi considerado, pois exigiria experimentos específicos para determinação dos coeficientes de dispersão axial. A opção feita neste trabalho foi a de desprezar este efeito, considerando que a curva de equilíbrio e a linha de operação do equipamento podem ser bem descritas por uma função linear. Neste caso, a força motriz média pode ser calculada pela média logarítmica das diferenças de concentrações nas extremidades do equipamento,

como indicado na equação 3.3. Deve-se enfatizar que de acordo com os resultados apresentados por PINA (2001), os coeficientes de dispersão axial em coluna PRDC similar à empregada neste trabalho são muito menores que os observados em equipamentos RDC testados na literatura, o que sugere um efeito modesto da dispersão axial no presente caso.

CAPITULO IV- PUBLICAÇÕES

1 - PARTITIONING OF WHEY PROTEINS, BOVINE SERUM ALBUMIN AND PORCINE INSULIN IN AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEMS

Artigo publicado no *Journal Chromatography (B)*. 743 : (1 – 2) p. 235-239, 2000

Autores:

ALVES, J.G.L.F.; CHUMPITAZ, L.D.A.; SILVA, L.H.M.; FRANCO, T.T. and MEIRELLES, A.J.A.

2 - KINEMATIC VISCOSITIES OF POLY(ETHYLENE GLYCOLS)

Artigo publicado no *J. Chem. Eng. Data*. 45 : p. 61 - 63, 2000

Autores:

CRUZ, M.S.; CHUMPITAZ, L.D.A.; ALVES, J.G.L.F.; and MEIRELLES, A.J.A.

Kinematic Viscosities of Poly(ethylene glycols)

Marina S. Cruz, Lucy D. A. Chumpitaz, José Guilherme L. F. Alves, and Antonio J. A. Meirelles*

LASEFI, Food Engineering Department—FEA, State University of Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6121, Campinas, SP, 13083-970, Brazil

Kinematic viscosities data have been obtained as a function of temperature for poly(ethylene glycols) with different molecular weights. The viscosity measurements were performed at ambient pressure and several temperatures ranging from 293.15 (or above their melting points) to 363.15 K. A generalized correlation based on the number of carbon atoms was developed, resulting in an average absolute deviation of 1.6% between experimental and calculated results.

Introduction

Poly(ethylene glycols) (PEGs) comprise a series of linear chain polymers of oxyethylene units with a wide variety of applications in the pharmaceutical, chemical, cosmetic, and food industries (Powell, 1980). Their low toxicity and high water solubility enable their use for purification of biological materials (Silva et al., 1997; Coimbra et al., 1994, 1995, 1998; Mei et al., 1995) and as an additive in the production of edible films for food coating (Chinnan and Park, 1995; Ninni et al., 1999). Many other applications in the automotive, petroleum, and textile industries are also mentioned in the literature (Powell, 1980; Lee and Teja, 1990). Prior works have reported the kinematic viscosity of lower glycols (Lee and Teja, 1990) and aqueous solutions containing PEGs with different molecular weights (González-Tello et al., 1994). In the present work, we report the viscosities of PEGs with the molecular weights 200, 400, 600, 1000, 1500, and 3350. Furthermore, the viscosity data for each PEG were correlated as a function of temperature, and a generalized correlation based on the number of carbon atoms was also developed.

Experimental Section

Materials and Analytical Procedures. All PEGs employed in the present work were obtained from Sigma, except for PEG 1500, which was purchased from Fluka. They were analytical grade and used as received. Their polydispersity index was determined by gel permeation chromatography (GPC) using an Ultrahydrogel column Waters device. The following experimental conditions were used for the GPC: water as the mobile phase at a rate of 0.8 $\mu\text{L}/\text{min}$, injection temperature of 313.15 K, sample injection of 100 μL , and a refraction index detector.

The water content of each PEG was determined by Karl Fischer titration using a Methrom device. The characteristics of the polymers used in the present work are given in Table 1.

Apparatus and Measuring Procedures. Kinematic viscosities were measured with calibrated Cannon Fenske glass capillary viscometers (sizes 75, 100, 150, 200, 350, and 400), made by Cannon Instrument Co. The viscometers were placed inside a thermostated liquid bath (Cole Parmer Instrument Co.) for keeping temperature constant during

* To whom correspondence should be addressed. Fax: +55-19-788-4027. E-mail: tomze@ceres.fea.unicamp.br.

Table 1. Polymer Characterization

| PEG | avg MW | polydispersity index | water content (mass %) | NCN ^a | TCN ^b |
|------|--------|----------------------|------------------------|------------------|------------------|
| 200 | 202 | 1.095 | 0.20 ± 0.02 | 8 | 8 |
| 400 | 400 | 1.086 | 0.23 ± 0.02 | 18 | 18 |
| 600 | 616 | 1.069 | 0.27 ± 0.02 | 26 | 28 |
| 1000 | 991 | 1.044 | 1.44 ± 0.02 | 44 | 44 |
| 1500 | 1359 | 1.022 | 1.05 ± 0.05 | 68 | 60 |
| 3350 | 2816 | 1.043 | 0.69 ± 0.07 | 152 | 128 |

^a Nominal carbon number based on the molecular weight (MW) according to the PEG denomination. ^b True carbon number based on the average MW determined by GPC.

each measurement. Thermometers (Cole Parmer Instrument Co.) with subdivisions of 0.1 K were used for monitoring bath temperature. This assembly maintains a temperature uniformity of ± 0.05 K. The kinematic viscosities ν were calculated from the efflux time θ and the instrument constant c by using the following equation:

$$\nu = c\theta \quad (1)$$

Values for c were provided by the viscometer manufacturer, and the correction for temperature effects was considered. An electronic timer (accuracy: 1/100 s) was used for measuring the efflux time. At each temperature the viscosity was measured at least five times to give the average values presented below.

Results and Discussion

The PEG kinematic viscosities are summarized in Table 2. The highest standard deviation observed in the experimental measures was $0.090 \times 10^{-6} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (PEG 1500 at 323.15 K), and the lowest one, $0.0006 \times 10^{-6} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (PEG 400 at 323.15 K), resulting in a mean standard deviation of $0.017 \times 10^{-6} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ for the whole set of experimental data. The highest variation coefficient obtained was 0.084% (PEG 1500 at 323.15 K), suggesting an excellent reproducibility for the measured efflux times.

The viscosity data were correlated by using the following equation:

$$\ln \nu / 10^{-6} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1} = A + B/(TK - C) \quad (2)$$

where T is the absolute temperature. The values of parameters A , B , and C were determined by regression using the Statistical Analysis System (SAS, Cary, NC)

Table 2. Experimental Kinematic Viscosities of PEGs

| T/K | $\nu/10^{-6} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ | | | | | |
|--------|---|---------|---------|----------|----------|----------|
| | PEG 200 | PEG 400 | PEG 600 | PEG 1000 | PEG 1500 | PEG 3350 |
| 293.15 | 57.33 | 101.61 | | | | |
| 298.15 | | 80.55 | 123.51 | | | |
| 303.15 | 34.71 | 62.39 | 94.29 | | | |
| 311.15 | | | | 103.10 | | |
| 313.15 | 22.36 | 39.93 | 59.53 | | | |
| 318.15 | | | | 80.10 | 128.75 | |
| 323.15 | 15.41 | 25.75 | 40.22 | 65.48 | 107.68 | |
| 328.15 | | | | | | 278.86 |
| 333.15 | 11.16 | 18.40 | 28.76 | 46.52 | 71.81 | 236.34 |
| 343.15 | 8.35 | 13.66 | 20.34 | 34.18 | 53.14 | 173.16 |
| 353.15 | 6.48 | 10.96 | 15.60 | 25.46 | 40.63 | 132.26 |
| 363.15 | 5.15 | 8.73 | 12.28 | 20.01 | 31.86 | 103.90 |

Table 3. Parameters of Eq 2

| PEG | A | B | C | AAD/% | SD/ $10^{-6} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ |
|------|---------|-------|-------|-------|---|
| 200 | -2.419 | 770.4 | 174.0 | 1.0 | 0.2 |
| 400 | -1.956 | 771.1 | 176.2 | 2.4 | 1.3 |
| 600 | -1.673 | 771.0 | 179.3 | 1.0 | 0.5 |
| 1000 | -1.214 | 759.1 | 182.5 | 1.4 | 2.7 |
| 1500 | -0.7722 | 771.0 | 181.2 | 1.3 | 1.8 |
| 3350 | 0.4374 | 770.2 | 179.9 | 0.2 | 0.6 |

package. The parameters are given in Table 3, which also shows the values for the average absolute deviation (AAD) and the standard deviation (SD), calculated according to eqs 3 and 4, respectively:

$$\text{AAD} = \left[\left(\sum_{j=1}^n \left| \frac{v_{\text{exp},j} - v_{\text{cal},j}}{v_{\text{exp},j}} \right| \right) \right] \times \frac{100}{n} \quad (3)$$

$$\text{SD} = \left[\frac{\sum_{j=1}^n (v_{\text{exp},j} - v_{\text{cal},j})^2}{(n-p)} \right]^{1/2} \quad (4)$$

where $v_{\text{exp},j}$ and $v_{\text{cal},j}$ are the experimental and calculated values for the kinematic viscosities, respectively, n is the number of experimental points, and p is the number of adjusted parameters. The deviations are <1.5%, except for the equation for PEG 400, which has a mean deviation of 2.4%. The highest SD is $2.7 \times 10^{-6} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

Following the suggestion of Lee and Teja (1990) for lower glycols, a generalized correlation based on the numbers of carbon atoms N was also developed. For the parameter A in eq 2 a quadratic form on N is assumed, and for the parameter C a sigmoidal (Boltzman-type) dependence is assumed. The parameters were generalized as follows:

$$\begin{aligned} A &= a_0 + a_1 N + a_2 N^2 \\ B &= b_0 \\ C &= (c_0 - c_1) / \{1 + \exp[(N - c_2)/c_3]\} + c_1 \end{aligned} \quad (5)$$

Two different values for the number of carbon atoms (N) were considered: the first one was calculated using the molecular weight given by the PEG denomination, such as PEG 400 or PEG 1500, and was named the nominal carbon number (NCN); the second one was calculated according to the average molecular weight (MW) determined by GPC and named the true carbon number (TCN). Both values are given in Table 1, and it should be noted that they were

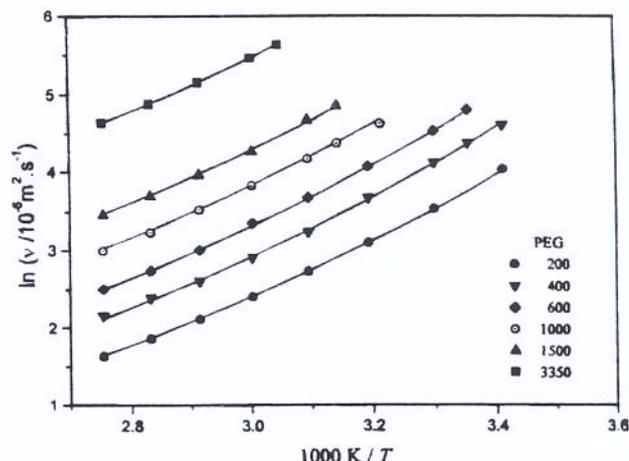


Figure 1. Experimental and correlated viscosities of PEGs. The points are experimental values, and the curves represent the correlated viscosities.

Table 4. Parameters of Eq 5

| | |
|-------------------------------|----------------|
| $a_0 = -2.738$ | $c_0 = -131.3$ |
| $a_1 = 4.114 \times 10^{-2}$ | $c_1 = 179.9$ |
| $a_2 = -1.276 \times 10^{-4}$ | $c_2 = -24.48$ |
| $b_0 = 770.2$ | $c_3 = 8.319$ |

Table 5. Prediction of Kinematic Viscosity Data Available in the Literature (Powell, 1980)

| PEG | avg MW range | NCN range | T/K | $\nu_{\text{exp}}/10^{-6} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ | $\nu_{\text{calc}}/10^{-6} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ | AD ^a |
|------|--------------|-----------|--------|--|---|-----------------|
| 200 | 190–210 | 8 | 298.15 | 40 | 43.6 | 8.9 |
| | | | 372.05 | 4.3 | 4.34 | 0.93 |
| 300 | 285–315 | 12–14 | 298.15 | 69 | 57.2–64.3 | 6.8 |
| | | | 372.05 | 5.8 | 5.30–5.81 | 0.17 |
| 400 | 380–420 | 16–18 | 298.15 | 90 | 71.7–79.3 | 11.9 |
| | | | 372.05 | 7.3 | 6.34–6.90 | 5.6 |
| 600 | 570–630 | 26–28 | 298.15 | 131 | 112.1–121.0 | 7.6 |
| | | | 372.05 | 10.5 | 9.38–10.1 | 4.0 |
| 1000 | 950–1000 | 42–46 | 372.05 | 17–19 ^b | 16.0–18.0 | 5.7 |
| 1500 | 1300–1500 | 58–68 | 372.05 | 25–32 ^b | 25.2–32.4 | 3.1 |
| 2000 | 1900–2200 | 86–100 | 372.05 | 47 | 47.7–60.8 | 17.3 |

^a Absolute deviation calculated by $\text{AD} = (|v_{\text{exp}} - v_{\text{calc}}|/v_{\text{exp}}) \times 100$; v_{calc} estimated using an average value for the NCN. ^b AD is based on the average experimental viscosity.

rounded to the closest even number. The difference between the two carbon numbers is significant for PEG 1500 and PEG 3350.

Using both definitions for the number of carbon atoms, the constants of eq 5 were obtained by regression of all the data determined in the present work. In the case of the NCN, an AAD of 3.8% and a SD of $2.5 \times 10^{-6} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ were obtained, but choosing the TCN as the number of carbon atoms, the AAD and the SD become significantly lower, 1.6% and $1.5 \times 10^{-6} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, respectively. For this last case the values of the constants are given in Table 4. Figure 1 shows the experimental data and the viscosities obtained by the best-generalized correlation. A good agreement between calculated and experimental values is obtained.

Kinematic viscosity data available in the literature (Powell, 1980) were used for checking the prediction capacity of the model with the parameters given in Table 4. The experimental values, the polymer characteristics and the predicted results are shown in Table 5. A range of predicted values was estimated using the NCN range calculated according to the information about molecular weight given by Powell (1980). Using an average value for this NCN range, an AAD of 6.6% was obtained. Although

the deviations are comparatively higher than those obtained for the correlation of our experimental data, it should be noted that for this prediction we had to use an average nominal number of carbon atoms. Unfortunately, more detailed information about the polymer dispersity, about its true average molecular weight, as well as about the product purity is not available in the literature reporting the viscosity data. Furthermore, in most cases the experimental viscosities are within or close to the range of predicted values.

But the use of this generalized equation for extrapolation purposes upon the number of carbon atoms should be avoided. As the parameter A has a quadratic dependence on the number of carbon atoms, the deviations between experimental and calculated viscosities may become higher as the molecular weight increases.

Conclusions

Viscosities of poly(ethylene glycols) with molecular weights ranging from 200 to 3350 were determined experimentally. The measurements were performed at temperatures ranging from 293.15 K (or above product melting point) to 363.15 K. A generalized equation based on the number of carbon atoms was developed, and it correlates well with the experimental data with an average absolute deviation of 1.6%. This equation has been further tested for prediction purposes, using viscosity data taken from the literature for poly(ethylene glycols) in the molecular weight range 200 to 2000. In this molecular weight range the predicted values are relatively close to the experimental ones.

Literature Cited

- Chinnan, M. S.; Park, H. J. Effect of plasticizer level and temperature on water transmission of cellulose-based edible films. *J. Food Process Eng.* **1995**, *18*, 417–429.
- Coimbra, J. R.; Thömmes, J.; Kula, M. R. Continuous separation of whey proteins with aqueous two-phase systems in a Graesser contactor. *J. Chromatogr.* **1994**, *A668*, 85–94.
- Coimbra, J. R.; Thömmes, J.; Meirelles, A. J. A.; Kula, M. R. Performance of a Graesser contactor in the continuous extraction of whey proteins: mixing, mass transfer and efficiency. *Bioseparation* **1995**, *5*, 259–268.
- Coimbra, J. S. R.; Mojola, F.; Meirelles, A. J. A. Dispersed phase hold-up in a perforated rotating disc contactor (PRDC) using aqueous two-phase systems. *J. Chem. Eng. Jpn.* **1998**, *31* (2), 277–280.
- González-Tello, G.; Camacho, F.; Blázquez, G. Density and viscosity of concentrated aqueous solutions of poly(ethylene glycol). *J. Chem. Eng. Data* **1994**, *39*, 611–614.
- Lee, R.-J.; Teja, A. S. Viscosities of poly(ethylene glycols). *J. Chem. Eng. Data* **1990**, *35*, 385–387.
- Mei, L.-H.; Lin, D.-Q.; Zhu, Z.-Q.; Han, Z.-X. Densities and viscosities of poly(ethylene glycol) + salt + water systems at 20 °C. *J. Chem. Eng. Data* **1995**, *40*, 1168–1171.
- Ninni, L.; Camargo, M. S.; Meirelles, A. J. A. Water activity in poly(ethylene glycol) aqueous solutions. *Thermochim. Acta* **1999**, *328*, 169–176.
- Powell, G. M. Polyethylene Glycol. In *Handbook of water soluble gums and resins*; Davidson, R. L., Ed.; McGraw-Hill Book Company: New York, 1980; Chapter 18.
- Silva, L. H. M.; Coimbra, J. S. R.; Meirelles, A. J. A. Equilibrium phase behavior of poly(ethylene glycol) + potassium phosphate + water two-phase systems at various pH and temperatures. *J. Chem. Eng. Data* **1997**, *42*, 398–401.

Received for review June 10, 1999. Accepted October 7, 1999. The authors gratefully acknowledge the financial support of FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo—97/10630-7 + 97/05405-4), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-52101/95-7), and CAPES-PEC/PG.

JE990157A

CAPITULO V-CONCLUSÕES

Foi realizada com sucesso a caracterização das proteínas do isolado protéico de soro de queijo (BiPRO), apresentando elevado teor de proteínas e baixos valores de cinzas e umidade. Os valores concordaram com os relatados pela empresa que produz o BiPRO.

A composição das fases do SAB em equilíbrio foram obtidas mediante medidas experimentais. O coeficiente de partição (K) foi melhor para o SAB 14 % p / p PEG e 18 % p / p Sal com 0,6 % p / p (concentração na fase salina) de BiPRO. Para a α -La (proteína que se transferiu) foi obtido um maior valor de K (7,9), uma maior pureza (93,42 %), um rendimento de 81,09 % e uma seletividade de 318.

A α -Lactoalbumina foi a principal proteína que se transferiu para a fase superior rica em polímero e a β -Lactoglobulina permaneceu principalmente na fase inferior rica em sal, comprovando-se a eficiência do sistema utilizado.

Dos experimentos de *hold-up*, observou-se o incremento no volume retido da fase dispersa (polimérica) com o aumento da relação de vazões e da velocidade de rotação, até atingir as condições de inundação. Na RDC, o *hold-up* aumenta em menor intensidade com aquelas variáveis. Isto se deve a que no escoamento da fase polimérica no equipamento com discos sem orifício as gotas não são quebradas de forma tão intensa, não permitindo produzir maior número de gotas de diâmetros pequenos e por consequência não provocando o aumento esperado da área de transferência de massa e do tempo de residência. Observou-se que, para a RDC há uma leve tendência de queda da velocidade característica com a velocidade de rotação. No caso da PRDC este efeito é bem mais acentuado. Isto se deve à baixa tensão interfacial apresentado pelo sistema, comparado com os demais sistemas estudados na literatura. Concluiu-se que a PRDC é um extrator apropriado para a purificação de proteínas.

A condição de operação que resultou ser mais vantajosa durante o processamento de proteínas, foi de 50 rpm e relação de vazões de $V_d / V_c = 0,5 / 1$. Obtiveram-se boas taxas de extração e também, foi observada a separação da α -La na fase superior rica em polímero e a β -Lg na fase inferior rica em sal da PRDC.

Dos experimentos de transferência de massa foram obtidos os coeficientes volumétricos de transferência de massa. Foi observado, o aumento do coeficiente volumétrico de transferência de massa com a elevação da velocidade de rotação. A PRDC permitiu obter maiores valores de *hold-up* e maior área de transferência de massa.

Por outro lado, fizeram-se medidas experimentais da viscosidade cinemática de polietileno glicóis, de diferentes pesos moleculares (200 – 3350), a diferentes temperaturas (293,15 K – 363,15 K), obtendo-se uma correlação generalizada baseada no número de átomos de carbonos. Com a correlação obtiveram-se bons ajustes dos valores experimentais e preditos, apresentando desvio absoluto médio de 1,6 %.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTSSON, P-A Partition of Cell Particles and Macromolecules 3^{era} edição. John Wiley, New York, 1986.

ALVES, J.G.L.F.; CHUMPITAZ, L.D.A.; SILVA, L.H.M.; FRANCO, T.T. e MEIRELLES, A.J.A . Partitioning of Whey Proteins, Bovine Serum Albumin and Porcine Insulin in Aqueous Two-Phase Systems. *Journal Chromatography (B)*. 743 : (1 – 2) : 235-239, 2000.

AOAC Official Method 930.29. Protein in Dried Milk. Kjeldahl Method. AOAC Official Methods of Analysis. Edited by Patricia Cunniff, 16th Edition, 1995. Chapter 33, p.49.

AOAC Official Method 927.05. Moisture in Dried Milk. AOAC Official Methods of Analysis. Edited by Patricia Cunniff, 16th Edition, 1995. Chapter 33, p.49.

BAMBERGER, S.; BROOKS, D.E.; SHARP, J.M. van alstine; WEBBER, J.J. In WALTER,H.; BROOKS, D.E.; FISHER D. (Editors). Partition in Aqueous Two-Phase Systems. London:Academic Press, 1985, p.85.

BISHOP, J.M.; HILL, D.J.; HOSKING, C.S. Natural History of Cow Milk Allergy: Clinical Outcome. *The Journal of Pediatrics*, 116 : 862- 867, 1990.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Can. J. Biochem. Physi.*, 37 : 911–917, 1959.

CIFUENTES, A.; FRUTOS, M.; DIEZ-MASA, J.C. Analysis of Whey Proteins by Capillary Electrophoresis using Buffer-Containing Polymeric Additives. *Journal of Dairy Science*, 76 (7) : 1870-1875, 1993.

CHUMPITAZ, L.D.A.; COUTINHO, L.F.; MEIRELLES, A.J.A. Surface Tension of Fatty Acids and Triglycerides. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 76 (3) : 379-382, 1999.

COIMBRA, J. S. Análise da Eficiência de Extração em Colunas de Discos Rotativos na Purificação do Ácido Lático. Campinas. 1991. 135p. Tese (Mestre em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

COIMBRA, J. S. Desempenho de um Extrator Tipo Graesser na Separação de Proteínas do Soro de Queijo usando Sistemas Aquosos Bifásicos. Campinas. 1995. 129p. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

COIMBRA, J. S.; THOEMMES, J.; KULA, M.- R.; MEIRELLES, A.J.A. Seleção e Caracterização de um Sistema Aquoso Bifásico para Purificação de Proteínas do Soro de Queijo. Equipamentos e Processos para a Indústria de Alimentos, Anales del I Congreso Ibero-Americano de Ingeniería de Alimentos. Valencia Espanha: F.C. Menegalli, C. Anjos, Dic. 1996. Tomo III

COIMBRA J.S.R.; MOJOLA, F.; MEIRELLES, A. J. A . Dispersed Phase Hold-Up in a Perforated Rotating Disc Contactor (PRDC) Using Aqueous Two-Phase Systems. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 31 (2) : 277-280,1998.

CRUZ, M. S.; CHUMPITAZ, L.D.A.; ALVES, J.G.L.F.; MEIRELLES, A.J.A. Kinematic Viscosities of Poly(ethylene glycols). *Journal of Chemical Engineering Data*, 45 (1) : 61-63, 2000.

CUSACK, R. W.; FREMEAUX, P. Ins and Outs of Liquid-Liquid Extractors. *Chemical Engineering*, New York, 98 (3) : 132-138, 1991

CUSACK, R.; KARR, A. A Fresh Look at Liquid-Liquid Extraction. *Chemical Engineering* : 112-120, 1991.

CHEN, J.-P. Partitioning and Separation of α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin in PEG/Potassium Phosphate Aqueous Two-Phase Systems. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 73 (2) : 140-147, 1992.

CHIANCONE, E.; GATTONI, M. Selective Extraction of Native β -Lactoglobulin from Whey. *Journal of Chromatography*, 539 : 455-463, 1991.

DIAMOND, A.D.; HSU, J.T. Aqueous Two-Phase Systems for Biomolecule Separation. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 47 : 89-135, 1992.

DYBING, S.T.; SMITH, D.E. Relation of Chemistry and Processing Procedures to Whey Protein Functionality: A Review. *Cultured Dairy Products Journal*, p. 4-12, 1991.

DZIEZAK, J.D. Phosphates Improve many Foods. *Food Technology*, 80-92, 1990.

EIGEL, W.N.; BUTLER, J.E.; ERNSTROM, C.A.; FARREL JR., H.M.; HARWALKAR, V.R.; JENNESS, R.; WHITNEY, R.M. Nomenclature of Proteins of Cow's Milk. *Journal of Dairy Science* 67 (8) : 1599-1631, 1984.

GAYLER, R.; PRATT, H.R.C. Hold-Up and Pressure Drop in Packed Columns *Trans. Inst. Chem. Eng.* 29 (1), p. 110-125, 1951. In: GODFREY, J.C.; SLATER, M.J. Slip Velocity Relationships for Liquid-Liquid Extraction Columns *Trans. IChemE*, Bradford, 69 (part. A) : 130-141, 1991.

GODFREY, J.C.; SLATER, M.J. Slip Velocity Relationships for Liquid-Liquid Extraction Columns *Trans. IChemE*, Bradford, 69 (part. A) : 130-141, Mar 1991.

GREVE, A.; KULA, M.-R. Recycling of Salts in Partitioning Protein Extraction Processes. *Journal Chem. Tech. Biotechnol.*, 50 : 27-42, 1991.

HAMM, W. Liquid Extraction in the Food Industry. In: LO T.C., BAIRD M.H.I. & HANSON C. Handbook of Solvent Extration, John Wiley & Sons, 1983 p. 593-603.

HARRIS, J.M. Poly(Ethylene Glycol) Chemistry : Biotechnical and Biomedical Applications, Plenum Press, New York, 1992.

JOHANSSON, G. Affinity Partitioning of Proteins using Aqueous Two-Phase Systems. In: Jan-Christer Janson and Lars Rydén. Protein Purification-Principles, High Resolution Methods, and Applications. Edition, VCH Publishers, Inc., 1989, p. 330-345.

KAWASE, Y. Dispersed-Phase Holdup and Mass Transfer in a Rotating Disc Contactor with Perforated Skirts. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, Nonoichi, 48 : 247-260, 1990.

KIM, Y.A.; CHISM, G.W.; MANGINO, M.E. Determination of Beta-Lactoglobulin, Alpha-Lactalbumin and Bovine Serum Albumin of Whey Protein Concentrates and Their Relationship to Protein Functionality. *Journal of Food Science*, 52 : 124-127, 1987.

KORCHINSKY, W. J.; ISMAIL, A. M. Mass-Transfer Parameters in Rotating-Disc Contactors : Influence of Column Diameter. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 43 : 147-158, 1988.

KORCHINSKY, W. J. Liquid-liquid Extraction Column Modelling: is the Forward Mixing Influence Necessary?. *Trans IchemE*, 70 (A4) : 333-345, 1992.

KOSTERS, W.C.G. Rotating-Disk Contactor In: LO T.C., BAIRD M.H.I. & HANSON C.. Handbook of Solvent Extration, John Wiley & Sons, 1983 p.593-603.

KRONER, K.H.; HUSTEDT, H.; KULA, M.-R. Extractive Enzyme Recovery: Economic Considerations. *Process Biochemistry* : 170-179, 1984.

KUMAR, A.; HARTLAND, S. Unified Correlation for the Prediction of Dispersed-Phase Hold-Up in Liquid-Extraction Columns *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 34 (11) : 3925-3940, 1995.

KUMAR, A.; HARTLAND S. Prediction of Axial Mixing Coefficients in Rotating Disc and Asymmetric Rotating Disc Extraction Columns. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 70 : 77-87, 1992.

KUNG, E.Y.; BECKMANN, R.B. Dispersed-Phase Holdup in a Rotating Disc Extraction Column. *AIChE J.*, 7 (2) : 319-324, 1961.

LANARA, Secretaria de Defesa Agropecuária, M.A. Métodos Analíticos Oficiais de Controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes. Capítulo XVIII-1, metodologia 4, Brasília – DF, 1981.

LOGSDAIL, D.H.; THORNTON, J.D.; PRATT, H.R.C. Liquid-Liquid Extraction Part XI : Flooding Rates and Performance Data for a Rotary Disc Contactor. *Trans. Inst. Chem. Eng.*, 35 : 301-315, 1957.

MAILLIART, P.; RIBADEAU-DUMAS, B. Preparation of β -Lactoglobulin e β -Lactoglobulin-free Proteins from Whey Retentate by NaCl Salting Out at low pH. *Journal of Food Science*, 53 (3) : 753-752, 1988.

MÄKINEN-KILJUNEN, S.; SORVA, R. Bovine β -Lactoglobulin Levels in Hydrolysed Protein Formulas for Infant Feeding *Clinical and Experimental Allergy*, 23 : 287-291, 1993.

MICKLEY, H.S.; SHERWOOD, T.K.; REED, Ch.E Applied Mathematics in Chemical Engineering: Interpretation of Engineering Data. Second Edition. New York: McGraw-Hill, 1957. p.53-413.

MISEK, T. General Hydrodynamic Design Basic for Columns. In:GODFREY, J.C.; SLATER M.J. Liquid-Liquid Extraction Equipment., Bradford U.K. John Wiley & Sons Ltd., 1994. p.97-111.

MOOR, C.V.; FOEGEDING, E.A. Composition and Functionality of Commercial Whey and Milk Protein Concentrates and Isolates: A Status Report. *Food Technology* : 100-112, 1990.

MOOR, C.V.; HA, E.Y.W. Whey Protein Concentrates and Isolates: Processing and Functional Properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33 (6) : 431-476, 1993.

OUTINEN, M.; TOSSAVAINEN, O.; TUPASELA, T.; KOSKELA, P.; KOSKINEN, H.; RANTAMÄKI, P.; SYVÄOJA, E.-L.; ANTILA, P.; KANKARE, V. Fractionation of Proteins from Whey with Different Pilot Scale Processes. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.*, 29 : 411-417, 1996.

PEARCE, R.J. Analysis of Whey Proteins by High Performance Liquid Chromatography. *The Australian Journal of Dairy Technology* : 114-117, 1983.

PINA, C.G.; MEIRELLES, A.J. Deacidification of Corn Oil by Solvent Extraction in a Perforated Rotating Disc Column. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 77 (5) : 553-559, 2000.

PINA, C.G., Desempenho de uma Coluna de Discos Rotativos na Desacidificação do Óleo de Milho. Campinas 2001. 115 p.Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

POWELL, G.M. Polyethylene Glycol. In: Davidson, R.L. Handbook of water soluble gums and resins; McGraw-Hill Book Company: New York, 1980; Chapter 18.

SAARINEN, K.M.; JUNTUNEN-BACKMAN, K.; JARVENPAA, A.-L.; KUITUNEN, P.; LOPE L.; RENLUND, M.; SIIVOLA, M.; SAVILAHTI, E. Supplementary Feeding in Maternity Hospitals and the Risk of Cow's Milk Allergy: A Prospective Study of 6209 Infants. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 104 : 457-461, 1991.

SÉLO, I.; NÉGRONI, L.; CRÉMINON, C.; YVON, M.; PELTRE, G.; WAL, J.-M. Allergy to Bovine β -Lactoglobulin: Specificity of Human IgE Using Cyanogen Bromide-Derived Peptides. *Int Arch Allergy Immunol*, 117 : 20-28, 1998.

SILVA, L.H.M. Equilíbrio de Fases em Sistemas Aquosos Bifásicos PEG/Fosfato de Potássio. Campinas, 1994. 84 p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.

SLATER, M.J. A Review of Current Advanced Design Procedures for Liquid-Liquid Extraction Columns and of Present Problems. I.Chem.E.Symposium Series No 118. In: RICHARDSON, J.F. *Advances in Separation Processes* : 147-160, 1990.

SNYDER, S. M.; COLE, D.K.; SZLAG, D.C. Phase Composition, Viscosities, and Densities for Aqueous Two-Phase Systems Composed of Polyethylene Glycol and Various Salts at 25 °C. *J. Chem. Eng. Data*, 37 : 268-274, 1992.

SONG, G.; HU, M.; NIU, CH.; LI, K.; SU, Y. Effect of Surface Active Substance on Liquid-Liquid Mass Transfer I. on Single Drop Mass Transfer. *Journal of East China University of Science and Technology*, 20 (4) : 535-540, 1994.

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

STEMERDING, S.; LUMB, E.C.; LIPS, J. *Chem. Ing. Tech.*, 35 : 844, 1963. GODFREY, J.C.; SLATER, M. J. Capítulo 9 Rotating disc Contactors In: KORCHINSKY, W. J. Liquid-Liquid Extraction Equipment Ed. John Wiley & Sons, 1994 : 247-275.

TAMBOURGI, E.B.; NELSON DE GÓIS, L.M.; PEREIRA, J.A.F.R.; SILVA, G.A. Mistura e Agitação em Contatores de Discos Rotativos. Anais do I Simpósio Brasileiro de Transferência de Calor e Massa. (1 a 3 de Julho), 310-321, 1987.

TSOURIS, C., FERREIRA, R.; 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 3^ª edição. Mc Graw-Hill Book Company, 1980. p.784.

WALTER, H.; BROOKS, D.E.; FISHER, D. Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems : Theory, Methods, Uses and Applications to Biotechnology. United Kingdom Edition London: ACADEMIC PRESS INC. LTD, 1985. p.704

WU, Y.T.; ZHU, Z.Q.; MEI, L.H. Interfacial Tension of Poly(ethyleneglycol) + Salt + Water Systems. *J. Chem. Eng. Data*, 41 : 1032-1035, 1996.

VIOTTO, W. Ultrafiltração de Soro Doce de Queijo Minas Frescal. Efeito de Pré-Tratamentos do Soro no Desempenho da Membrana e na Composição e Solubilidade do Concentrado Protéico de Soro. Campinas. 1993. 212p. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas

YOSHIDA, S. Isolation of β -Lactoglobulin and α -Lactalbumin by Gel Filtration using Sephacryl S-200 and Purification by Diethylaminoethyl Ion-Exchange Chromatography. *Journal Dairy Science*, 73 (9) : 2292-2298, 1990.

ANEXO A

Tabela A.1 Valores de velocidade característica (V_K) obtidas do ajuste de dados experimentais a partir da equação de Gayler e Pratt (1951) para uma PRDC (4 discos)

| Velocidade de Rotação (rpm) | V_K (mm / s) | Coefficiente de correlação | Desvio Padrão |
|--------------------------------|----------------|----------------------------|---------------|
| 10 | 10,65 | 0,97571 | 0,04275 |
| 50 | 9,71 | 0,99797 | 0,01245 |
| 100 | 5,922 | 0,96824 | 0,04882 |
| 125 | 1,726 | 0,98536 | 0,03338 |
| 150 | 1,169 | 0,93980 | 0,03293 |

Tabela A.2 Valores de velocidade característica (V_K) obtidas do ajuste de dados experimentais a partir da equação de Gayler e Pratt (1951) para uma RDC (4 discos)

| Velocidade de Rotação (rpm) | V_K (mm / s) em PRDC | Coefficiente de correlação | Desvio Padrão |
|--------------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------|
| 10 | 10,656 | 0,97570 | 0,04277 |
| 50 | 7,2458 | 0,98544 | 0,02508 |

ANEXO B

Tabela B.1. Concentração das proteínas α -La e β -Lg do BiPRO presentes no extrato e no refinado de uma PRDC.

| Vd:Vc | Velocidade de Rotação (rpm) | α -La (mg / mL) | | β -Lg (mg / mL) | |
|-------|--------------------------------|------------------------|----------|-----------------------|----------|
| | | Extrato | Refinado | Extrato | Refinado |
| 1:1 | 10 | 2,236 | 3,008 | 0,082 | 19,795 |
| 1:1 | 50 | 2,564 | 1,115 | 0,702 | 20,820 |
| 2:1 | 10 | 1,582 | 0,565 | 0,100 | 20,890 |
| 2:1 | 50 | 4,070 | 0,0001 | 2,148 | 21,725 |
| 0,5:1 | 10 | 7,090 | 1,395 | 4,702 | 20,488 |
| 0,5:1 | 50 | 7,230 | 1,110 | 5,352 | 19,195 |
| 0,5:1 | 100 | 6,436 | 0,305 | 1,070 | 19,890 |
| 0,5:1 | 125 | 12,036 | 0,015 | 7,178 | 19,503 |

Tabela B.2. Erros no Balanço de Massa em Base Livre da Proteína α -La

| Vd:Vc | Velocidade de Rotação (rpm) | Tempo (min) | Erro no Balanço de Massa (%) |
|-------|-----------------------------|-------------|------------------------------|
| 1:1 | 10 | 20 | 12,58 |
| 1:1 | 50 | 30 | 20,53 |
| 2:1 | 10 | 30 | 19,54 |
| 2:1 | 50 | 30 | 16,99 |
| 0,5:1 | 10 | 30 | 6,83 |
| 0,5:1 | 50 | 40 | 2,13 |
| 0,5:1 | 100 | 30 | 43,95 |
| 0,5:1 | 125 | 30 | 30,65 |

Tabela B.3. Coeficientes Volumétricos de Transferência de Massa ($K_E \cdot a$) para a PRDC

| Vd:Vc | Velocidade de Rotação (rpm) | $K_E \cdot a$ kg de α -La / (m ³ . s. (kg de α -La / kg fase polimérica)) |
|-------|-----------------------------|---|
| 1:1 | 10 | 0,0434 |
| 1:1 | 50 | 0,0772 |
| 2:1 | 10 | 0,1217 |
| 2:1 | 50 | 0,8760 |
| 0,5:1 | 10 | 0,1023 |
| 0,5:1 | 50 | 0,1145 |
| 0,5:1 | 100 | 0,3134 |
| 0,5:1 | 125 | 0,6471 |

ERRATA

Onde se lê 28 nm da página 40, leia-se 280 nm
