

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO
Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

UNICAMP
BIBLIOTECA CEN
SEÇÃO CIRCULA

Estudo do Processo de Recuperação e Separação de *Bromelina*
Utilizando Sistema de Duas Fases Aquosas em Micro-Coluna de
Extração

Autor Luiz Carlos Bertevello
Orientador : Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi

Tese de Doutorado apresentada à
Faculdade de Engenharia Química como
parte dos requisitos exigidos para a
obtenção do título Doutor em Engenharia
Química.

Campinas - São Paulo
Março/2001

NIDADE B. e
 CHAMADA:
17 UNICAMP
B461e
 Ex.
 OMBO DC/ 45671
 ROC. 16-392101
 C ☐ D ☒
 REC. R\$ 11,00
 DATA 02/08/01
 I.º CPD...

CM00158263-1

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

B461e Bertevello, Luiz Carlos
 Estudo do processo de recuperação e separação de
 bromelina utilizando sistema de duas fases aquosas em
 micro-coluna de extração / Luiz Carlos Bertevello. --
 Campinas, SP: [s.n.], 2001.

Orientador: Elias Basile Tambourgi.
 Tese (doutorado) - Universidade Estadual de
 Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Bromelina. 2. Separação (Tecnologia). 3.
 Biotecnologia. 4. Extração – Equipamento. I.
 Tambourgi, Elias Basile. II. Universidade Estadual de
 Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Tese de Doutorado , defendida por Luiz Carlos Bertevello , em 30 de março de 2001 e aprovada pela banca julgadora constituída pelos professores doutores



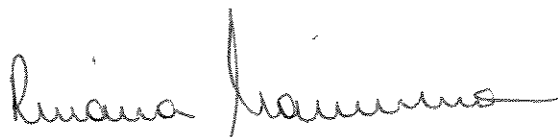
Maria Marta Neto- UNIBAN-SP



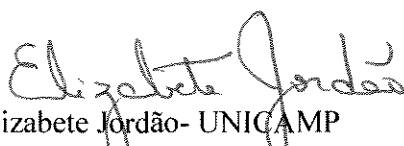
Roger Josef Zemp- UNICAMP



Elias Basile Tambourgi- UNICAMP



Rivana Basso Fabbri Marino – FEI-SP



Elizabete Jordão- UNICAMP

Esta versão corresponde à final da Tese de Doutorado , defendida por Luiz Carlos Bertevello em 30 de março de 2001

A handwritten signature in black ink, consisting of stylized, flowing letters that appear to be 'E. B. Tambourgi'.

Prof Dr Elias Basile Tambourgi
orientador

À IRINEU BERTEVELLO
e LOURDES CAMPOS BERTEVELLO
meus pais

À ANA CLAUDIA W. CESAR
Minha esposa

"A atitude científica - no sentido exato do termo – é algo que, como já sabemos, não poderá esgotar a atenção para com a experiência. Justamente por experiência vivemos situações e fenômenos que não se reduzem ao âmbito biológico e físico-químico."

LUIGI GIUSSANI

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado oportunidade de merecer este caminho.

Ao amigo e Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi pela orientação, compreensão e amizades e por acreditar no meu trabalho.

Aos Professores da FEI, Rivana B. F. Marino, Luís Fernando Novazzi e Douglas Alves Cassiano, pelo apoio e pela amizade.

Aos professores, funcionários e colegas da FEQ-UNICAMP.

Às estagiárias de Iniciação Científica da FEI, Fernanda, Marina, Ciléia, Jordana, Sabrina e Vanessa, pelo incentivo e dedicação e amizade.

Aos professores, funcionários e amigos da FEI que me apoiaram para conclusão deste trabalho em especial a Maria Leda Anacleto Fragnani que sempre acreditou.

À minha esposa e companheira, Profa. Ana Claudia W. Cesar, pelo amor e pela dedicação.

RESUMO

A partição em sistemas de duas fases aquosas é uma alternativa aos processos de separação existentes, que sendo muito estudada nos últimos anos. Em sistemas aquosos bifásicos, ambas as fases são compatíveis com quase todas as proteínas conhecidas. Outro importante fator favorável é a possibilidade de usar-se equipamentos de extração líquido-líquido que operam em contínuo.

Neste trabalho é proposto um processo de recuperação de *bromelina* do abacaxi utilizando sistema bifásico aquoso como etapa principal. Para tanto, é utilizada uma micro-coluna agitada por campânulas pulsantes, visando promover um eficiente contato entre as fases. Foram realizadas análises da influência de parâmetros operacionais na eficiência do processo de separação. Os parâmetros estudados no equipamento são a frequência de pulsação e a razão entre as fases que entram na coluna.

Além do estudo da extração líquido-líquido em contínuo, foi realizado o estudo da extração em descontínuo, a fim de encontrar-se as melhores condições de extração, em relação ao sistema de duas fases aquosas.

Neste estudo, verificou-se que o processo proposto apresenta uma excelente eficiência em relação a recuperação da proteína, com média de 60% de proteína total e principalmente uma boa eficiência em relação a atividade enzimática da *bromelina*, 58% de recuperação em média. É apresentado também um estudo de transferência de massa na coluna, envolvendo o coeficiente de transferência, e número de unidades de transferência, além do estudo de fração de retenção de fase dispersa.

ABSTRACT

Partition in aqueous two-phase systems is an alternative for the separation processes, that has been study extensively late years. In aqueous two-phase systems, both phases are compatible with almost all known proteins. Other favourable factor is the possibility of using liquid-liquid extraction equipment's that operate continuously.

In this work, a new process in bromelina recovery developed in bromelina recovery from pineapple's syrup was developed, through liquid-liquid extraction in two-phase systems. Whit this aim, it was used a micro-column agitated by pulsed caps, for promoting an efficient contact between phases end column and also to avoid enzyme desnaturation and the of main proteins properties. The parameters studied in the equipment were pulse frequency and ratio between phases which enter the columns.

In addition to the continuos liquid-liquid extraction study a batch extraction was carried out in order to find best extraction conditions regarding.

In this study it was observed that the suggested process has an excellent efficiency in protein recovery, whit an average of 60% of total protein and principally, good efficiency in bromeline's enzymatic activity, 58% of recovery in average. It was also, shows a mass transfer study in the column, regarding transfer coefficient and number of transfer units, in addition to the hold-up determination.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA E FUNDAMENTOS	
2.1. Proteínas	
2.1.1. Bromelina	5
2.1.2. Enzimas	5
2.1.3. Desnaturação	8
2.1.4. Processamento da Fruta	9
2.1.5. Produtos e Subprodutos do Processamento	10
2.1.6. Consumo de Bromelina	12
2.2. PROCESSO DE RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	13
2.3. PRECIPITAÇÃO	14
2.4. EXTRAÇÃO EM DUAS FASES AQUOSAS	15
2.4.1. Sistema de Duas Fases Aquosas	15
2.4.2. Tipos de Sistemas de Duas Fases Aquosas	19
2.4.3. Polietileno Glicol	20
2.4.4. Sistema PEG/Sal	21
2.4.5. Diagrama de Fases	23
2.4.6. Fatores que Influenciam no Sistema de Fases	24
2.5. FUNDAMENTOS DA PARTIÇÃO DAS PROTEÍNAS	26
2.5.1. Coeficiente de Partição	27
2.5.2. Influência da Massa Molecular do Polímero e da Proteína no Coeficiente da Partição	28
2.5.3. Influência do pH do Sistema no Coeficiente de Partição	29
2.5.4. Influência das Interações entre a Proteína e o Sistema de Fases no Coeficiente de Partição	29
2.5.5. Influência da Concentração dos Componentes do Sistema no Coeficiente de Partição	30
2.5.6. Influência da Concentração de Proteínas no Coeficiente de Partição	31
2.6. TEORIA DE FORMAÇÃO DAS FASES	31
2.7. TEMPO DE SEPARAÇÃO DAS FASES	34
2.8. MODELAGEM MATEMÁTICA DO COEFICIENTE DE PARTIÇÃO	35
2.9. APLICAÇÃO EM LARGA ESCALA	36
2.10. SISTEMAS BIFÁSICOS AQUOSOS MAIS ESTUDADOS	39
2.11. EQUIPAMENTOS UTILIZADOS NA EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO	40
2.12. PROCESSAMENTO CONTÍNUO	46
2.13. TRANSFERÊNCIA DE MASSA EM SISTEMAS BIFÁSICOS AQUOSOS	48
2.14. ASPECTOS ECONÔMICOS	51
2.15. MODELAGEM MATEMÁTICA DA EXTRAÇÃO DIFERENCIAL	53
3. MATERIAIS E MÉTODOS	57
3.1. DESCRIÇÃO E OPERAÇÃO DO EQUIPAMENTO	57
3.1.1. Procedimento de Operação da Micro-Coluna	58
3.1.2. Variáveis Estudadas	60
3.3. PREPARO DE AMOSTRA E SOLUÇÕES	61

3.3.1. Preparo da Amostra de Caldo	61
3.3. 2. Preparo das Soluções Estoques	61
3.4. EXTRAÇÃO EM DESCONTÍNUO	62
3.5. MÉTODOS ANALÍTICOS	63
3.5.1. Determinação de Proteína Total	63
3.5.2. Determinação da Atividade Enzimática	64
3.6. METODOLOGIA DE CÁLCULO	65
3.7. PLANEJAMENTO FATORIAL	66
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
4.1. EXTRAÇÃO DESCONTÍNUA	68
4.1.1. Partição das Proteínas	68
4.1.2. Partição para Atividade Enzimática Específica	74
4.2. EXTRAÇÃO CONTÍNUA UTILIZANDO UMA MICRO-COLUNA DE CAMPÂNULAS PULSANTES	80
4.2.1. Planejamento dos Ensaios	81
4.2.2. Efeito da Razão entre as Fases (RV) e da Frequência da Pulsação (FP) das Campânulas na Porcentagem de recuperação de Proteína Total com Bromelina P.A.	82
4.2.3. Efeito da Razão entre as Fases (RV) e da Frequência da Pulsação (FP) das Campânulas na Porcentagem de recuperação de Proteína Total	83
4.2.4. Efeito da Razão entre as Fases (RV) e da Frequência da Pulsação (FP) das Campânulas na Recuperação da Atividade da Bromelina	85
4.2.5. Efeito da Razão entre as Fases (RV) e da Frequência da Pulsação (FP) das Campânulas no Coeficiente de transferência de Massa	87
4.2.6. Efeito da Razão entre as Fases (RV) e da Frequência da Pulsação (FP) das Campânulas no Número de Unidades de Transferência	89
4.2.7. Efeito da Razão entre as Fases (RV) e da Frequência da Pulsação (FP) das Campânulas no “ Hold up” da Micro-Coluna	91
5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES	94
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Classificação de extração segundo Hanson	46
Tabela 3.1: Variáveis estudadas na operação de uma microcoluna	60
Tabela 3.2 : Variáveis estudadas nos ensaios em batelada	66
Tabela 4.1: Discriminação dos efeitos e níveis para Variação 1	69
Tabela 4.2: Valores dos efeitos mais significativos para Variação 1.	69
Tabela 4.3: Descrição dos níveis e efeitos para variação 2	71
Tabela 4.4: Valores dos efeitos para Variação 2.	71
Tabela 4.5: Comportamento do Coeficiente de Partição para Variação 2 em pH 7	72
Tabela 4.6: Discriminação dos efeitos e níveis para Variação 1A	72
Tabela 4.7: Efeitos e interações para a Variação 1A.	74
Tabela 4.8: Descrição dos níveis e efeitos para Variação 2A.	76
Tabela 4.9 : Valores dos efeitos para a Variação 2A	77
Tabela 4.10: Descrição dos níveis e efeitos	81
Tabela 4.11 : Efeitos para a porcentagem de recuperação de proteína total	82
Tabela 4.12 : Porcentagem de recuperação de proteína total	83
Tabela 4.13 : Cálculo dos efeitos para recuperação da proteína total	84
Tabela 4.14 : Porcentagem de recuperação de atividade enzimática	85
Tabela 4.15 : Cálculo dos efeitos para recuperação de atividade enzimática	86
Tabela 4.16 : Coeficiente de transferência de massa	87
Tabela 4.17: Cálculo dos efeitos na transferência de massa	88
Tabela 4.19 : Número de unidades de transferência	89
Tabela 4.18 : Cálculo dos efeitos no número de unidades de transferência	90
Tabela 4.20 : Cálculo do “hold up” na coluna	91
Tabela 4.21 : Cálculo dos efeitos no “hold up” na coluna	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Exemplo de diagrama de fases	23
Figura 2.2. Exemplo de um extrator em estágios discretos	43
Figura 2.3: Exemplo de colunas que atuam sob a força da gravidade	45
Figura 3.1: Esquema da Micro-coluna de campânulas pulsantes	57
Figura 3.2: Preparo da Amostra	61
Figura 3.3: Esquema da extração	63
Figura 4.1 : Comportamento do coeficiente de partição para variação 1	70
Figura 4.2: Comparação das linhas de amarração na Variação 1A	75
Figura 4.3 : Comparação das linhas de amarração para Variação 2 A	78
Figura 4.4: Influência do pH e da linha de amarração na variação 1A.	75
Figura 4.6: Influência do pH e da linha de amarração na variação 2 A.	78

NOTAÇÃO E NOMENCLATURA

A	Área da secção transversal da coluna
a	Área superficial por unidade de volume
Ae	Atividade Específica (U/mg)
Ae _{fundo}	Atividade específica da Fase Inferior
Ae _{topo}	Atividade Específica da Fase Superior
AUT	Altura de Unidades de Transferência
BSA	Albumina Bovina (Bovine Serum Albumin)
C _f	Concentração da Fase Inferior
C _t	Concentração da Fase Superior
Da	daltons
E	Fator de Extração
FP	Frequência de Pulsação (1pulso/min)
H	Vazão da fase pesada
L	Vazão da fase leve
K	Coefficiente de Partição
K _{bioesp}	Fator de Afinidade Bioespecífica
K _{conf}	Fator de Conformação
K _{eletro}	Fator eletroquímico
K _{hfob}	Fator de afinidade hidrofóbica
K _{tam}	Fator Tamanho
L	Vazão da fase dispersa
MPEG	Massa Molecular do PEG
P	Proteína Total (mg/L)
PEG	Polietileno Glicol
pl	Ponto Isoelétrico
P _{topo}	Concentração de Proteínas na Fase Superior (mg/L)
P _{fundo}	Concentração de Proteínas na Fase Inferior (mg/L)
p/p	Peso/peso
r	Taxa de transferência
s	Desvio padrão
Sefeitpo	Desvio Padrão dos Efeitos
SBA	Sistema Bifásico Aquosos
NUT	Número de unidades de Transferência
TCA	Ácido Tricloroacético
X _m	Média dos resultados Obtidos
X _i	Grandeza Medida
y*	Concentração da fase dispersa

2. REVISÃO DA LITERATURA E FUNDAMENTOS

2.1. Proteínas

Berzelius cunhou a palavra proteína em 1838, para salientar a importância dessa classe de moléculas. Proteína vem do grego Protéicos, que significa “o que vem em primeiro lugar”, sendo responsáveis pelo funcionamento das funções vitais dos organismos animais, nos quais são alguns dos principais constituintes.

As proteínas são as moléculas orgânicas mais abundantes nas células e constituem 50% ou mais de seu peso seco. São encontradas em todas as partes de todas as células, uma vez que são fundamentais sob todos os aspectos da estrutura e função celular. Existem muitas espécies diferentes de proteínas, cada uma especializada em determinada função biológica diferente.

2.1.1. Enzimas

A maior parte da história da bioquímica é a história da pesquisa sobre enzimas. A catálise biológica inicialmente descrita e reconhecida no início do século XIX, em estudos sobre a digestão da carne por secreções do estômago e a conversão do amido em açúcares simples pela saliva e por vários extratos vegetais. Na década de 50, Louis Pasteur concluiu que a fermentação do açúcar em álcool pela levedura é catalisada por fermentos. Ele postulou que esses fermentos depois nomeados de enzimas, eram inseparáveis da estrutura das células vivas do levedo, uma hipótese que prevaleceu por muitos anos. Em 1897, Eduard Buchner, descobriu que extratos de levedo podiam fermentar o açúcar até o álcool, provando que as enzimas envolvidas na fermentação continuavam funcionando mesmo quando removidas da estrutura das células vivas. Desde então numerosos estudos vêm sendo realizados na tentativa do isolamento das numerosas enzimas diferentes e o estudo de suas propriedades catalíticas.

A catálise enzimática das reações é essencial para os sistemas vivos. Sob condições biológicas relevantes, as reações não catalisadas tendem a ser lentas. A maioria das moléculas biológicas são muito estáveis no ambiente aquoso de pH

neutro e temperatura moderada encontrado no interior das células. Muitas reações bioquímicas comuns envolvem eventos químicos que são muito improváveis nas condições do ambiente celular, como a formação transiente de intermediários eletricamente carregados e instáveis ou a colisão de duas ou mais moléculas com a orientação precisa e necessária para que ocorra a reação. (LEHNINGER, 1995).

As reações necessárias para digerir alimentos, enviar sinais através de nervos, ou contrair um músculo simplesmente não ocorrem em velocidade útil sem catálise.

Uma enzima contorna estes problemas fornecendo um ambiente específico dentro do qual uma dada reação é energeticamente mais favorável. A característica distintiva de uma reação catalisada enzimaticamente é que ela ocorre no interior dos limites de uma cavidade, ou fenda, na estrutura molecular da enzima chamado sítio ativo. A molécula que se liga ao sítio ativo e que sofre a ação da enzima é chamada substrato. O complexo enzima-substrato tem papel central na reação enzimática, ele é o ponto de partida para os tratamentos matemáticos que definem o comportamento cinético das reações catalisadas enzimaticamente e para as descrições teóricas dos mecanismos enzimáticos.

2.1.2. Bromelina

Bromelina é o nome genérico dado ao conjunto de enzimas proteolíticas encontradas nos vegetais da família *Bromeliaceae*, da qual o abacaxi é o mais conhecido. As enzimas proteolíticas encontradas nos talos recebem o nome de bromelina do talo e tem o número sistemático EC 3.4.22.4, e as encontradas no fruto são chamadas de bromelina do fruto ou ainda, bromelina e tem o número sistemático EC 3.4.22.5. A bromelina é uma glicoproteína, tendo um resíduo oligossacarídeo por molécula, que está covalentemente ligado à cadeia peptídica. A bromelina do talo é uma enzima sulfidrilica, e este grupamento é essencial para a sua atividade proteolítica. A bromelina do fruto é uma proteína ácida, e seu ponto isoelétrico foi determinado por focalização isoelétrica como pH 4,6 e mudanças

conformacionais irreversíveis ocorrem em valores de pH maiores que 10,3 (MURACHI, 1976).

A enzima não está presente nos primeiros estágios de desenvolvimento do fruto, porém, seu nível aumenta rapidamente, mantendo-se elevado até o amadurecimento, onde tem um pequeno decréscimo. Essa é uma das vantagens da utilização das proteases do abacaxi em comparação com outras proteases vegetais. Apesar da diminuição da atividade proteolítica durante a maturação, o abacaxi é o único fruto que possui concentrações relativamente altas de proteases no estado maduro. No mamão e no figo, tanto a papaína como a ficina, somente são encontradas em altos níveis quando o fruto está verde; com o completo amadurecimento, a concentração de proteases praticamente desaparece. Diferentes partes da planta podem ser usadas como matéria-prima para a obtenção da bromelina: folhas, talos, polpa da fruta, cascas e resíduos industriais do processamento do fruto.

Outras fontes de enzimas proteolíticas são as proteases microbianas, por exemplo de: *Bacillus subtilis*, *Aspergillus* sp., *Actinomyces* sp., e as proteases animais tripsina (EC 3.4.21.4) e pepsina (EC 3.4.23.1), além das vegetais papaína (EC 3.4.22.2) e ficina (EC 3.4.22.3) já citadas. Algumas das proteases microbianas são geralmente proteases alcalinas e têm sido usadas na produção de sabões e detergentes para a remoção de manchas de sangue por exemplo.

A bromelina tem diversos usos, todos baseados em sua atividade proteolítica, como nas indústrias alimentícias e farmacêuticas. Pode-se mencionar sua utilização no amaciamento de carnes, na clarificação de cervejas, na fabricação de queijos, no preparo de alimentos infantis e dietéticos, no pré-tratamento de soja, no tratamento do couro, na indústria têxtil, no tratamento da lã e da seda, no tratamento de distúrbios digestivos, feridas e inflamações, preparo de colágeno hidrolisado, etc. Foi verificado por ROWAN et. al. (1990) que a bromelina do fruto tem uma atividade proteolítica maior que a bromelina do talo em diversos substratos protéicos, e sua atividade é máxima em pH 8,0 e a

temperatura de 70°C. A bromelina do talo apresentou atividade máxima a 60°C e pH 7,0. A forma de bromelina comercialmente encontrada é a bromelina do talo, apesar da grande quantidade de resíduos de abacaxi fruto proveniente das indústrias de conservas de abacaxi.

As fontes de bromelina são geralmente impuras e as principais enzimas contaminantes são outras enzimas proteolíticas e enzimas não proteolíticas, tais como: fosfatases, peroxidases, celulasas e outras glicosidases (MURACHI, 1976). SUH et. al. (1992) purificou a bromelina do fruto e do talo até a homogeneidade (18 e 46 vezes de aumento de pureza respectivamente) por cromatografia de gel-filtração e determinou os pesos moleculares em 32.5 e 37 KDa respectivamente, com rendimento de 23% em atividade. MURACHI (1976) purificou a bromelina do talo de abacaxi por cromatografia de gel-filtração, e determinou que o peso molecular da fração pura era de 28 KDa por SDS-PAGE. (ROWAN et. al. 1990) descreve a presença de quatro proteases principais presentes em abacaxis (*Ananas comosus*): bromelina do fruto, bromelina do talo, ananaína e comosaína.

2.1.3. Desnaturação

Quando uma solução de proteína, como a albumina do ovo, é aquecida lentamente até 60^o ou 70^o C, a mesma torna-se gradualmente leitosa e logo forma um coágulo. Isto é comum já que ocorre quando fervemos ovos em água. A clara do ovo, que contém albumina, coagula pelo aquecimento num sólido branco. Depois que o calor coagulou a clara não sofre redissolução pelo resfriamento, nem forma outra vez uma solução límpida como a original. Portanto, o aquecimento transformou a ovoalbumina e, aparentemente, de forma irreversível. Esse efeito do aquecimento ocorre virtualmente com todas as proteínas, não importando seu tamanho ou função biológica, embora a temperatura exata para provocá-lo varie. A mudança provocada pelo calor e outros agentes é conhecida como *desnaturação*.

Há outra importante consequência da desnaturação de uma proteína, ela, quase sempre, perde sua atividade biológica característica. Assim, quando uma

solução aquosa de uma enzima , por exemplo, é aquecida até seu ponto de ebulição por uns minutos e depois resfriada, a enzima torna-se insolúvel e, principalmente, não mais apresenta atividade catalítica.

A desnaturação de proteínas pode ser provocada não apenas pelo calor, mas também por valores inadequados de pH, por solventes orgânicos, por solutos como a uréia, pela exposição da proteína a alguns tipos de detergentes, pela agitação vigorosa da solução proteica até formação abundante de espuma, presença de certos íons ou sais caotrópicos na solução que contém as proteínas, entre outros. Cada uma das formas citadas como causa de desnaturação pode ser considerada como tratamento relativamente suave, isto é, a desnaturação pode ocorrer em condições amenas, não há necessidade de ocorrer em condições drásticas. As moléculas de proteína nativa são frágeis e facilmente desorganizadas pelo calor e outros tratamentos aparentemente suaves.

2.1.4. Processamento da Fruta

A fruta em calda, que é o principal produto industrializado do abacaxi, ocupa, atualmente, a segunda posição em vendagem no mercado internacional, logo em seguida do pêssego em calda.

As técnicas industriais de preparo de fatias e pedaços para enlatamento são conhecidas internacionalmente. Linhas completamente automatizadas encontram-se em várias fábricas espalhadas pelo mundo tais como Havai, Formosa, Filipinas, Tailândia, Austrália, África do Sul e outros países, no mundo todo.

Essas linhas, em capacidade de 80 a 120 frutas por minuto, apresentam, atualmente, rendimentos próximos de 46% de partes sólidas da fruta para enlatamento.

2.1.5. Produtos e Subprodutos do Processamento

Na grande indústria do abacaxi, a industrialização da fruta é integrada. Isso significa que não existe uma indústria trabalhando com um ou dois produtos, mas procura-se tirar o máximo de rendimento da fruta em relação ao produto principal (fruta em calda) e aos produtos de caráter secundário (como é o caso do suco simples e do suco concentrado), e mesmo os subprodutos, como é o caso específico do suco da casca e resíduos fibrosos, este última utilizada na fabricação de ração animal.

O processamento tem início com a lavagem das frutas, que chegam do campo em grandes recipientes ou carretas, já desprovidas da coroa que pode ser utilizada para o replantio da fruta. A seguir, as frutas são conduzidas por meio de transportadoras para uma seção superior onde a lavagem é completada.

Um sistema de transportadores conduz as frutas lavadas para um segundo pavimento, no qual, é feito um corte em uma das extremidades da fruta. Essa operação tem por finalidade principal eliminar as partes restantes da coroa e talo, a fim de facilitar o trabalho posterior da máquina ginaca. Essas partes eliminadas, seguem, por meio de um transportador, para a linha de processamento de ração.

Na etapa seguinte, ainda no segundo pavimento, as frutas são selecionadas por tamanho, seleção esta que é feita por meio de roscas sem fim, dispostas de tal forma que permitem a classificação das frutas em três tamanhos distintos: grande, médio e pequeno.

As frutas de tamanho médio constituem aproximadamente 60 a 65% do total de abacaxis que entram na usina de processamento.

O processo tem por finalidade dar um fluxo contínuo às fases posteriores, reduzindo assim a capacidade ociosa da ginaca. Esta máquina cujo nome foi dado em homenagem a seu inventor o engenheiro havaiano de sobrenome Ginaca, é completamente automatizada e de grande capacidade (80-120 frutas

por minuto), executando uma série de operações sucessivas, e que são as seguintes: - corte das extremidades, descascamento da fruta e encaminhamento do cilindro à etapa seguinte do processamento. O equipamento também é dotado de um dispositivo raspador, que erradica a polpa da casca e das extremidades do fruto. A maior parte deste material erradicado (polpa erradicada) se destina à produção de “*crush*”(espécie de salada de frutas) e uma pequena parte à produção de suco .

Nas ginacas de produção mais antiga também havia um dispositivo para remoção do miolo do cilindro da fruta

Dentro de um sistema mais moderno, conhecido como “sistema de processamento de abacaxi em dois diâmetros da Honiron, a remoção da parte central do cilindro da fruta é feita em fase posterior. Esse sistema permite maior rendimento industrial em termos sólidos, pois o cilindro é cortado em fatias quando ainda inteiro, isto é, com miolo, e estas apresentam maior resistência mecânica à remoção do miolo, reduzindo-se assim, o número daquelas quebradas.

Nas diversas linhas de ginaca geralmente encontradas nas grandes indústrias de abacaxi do mundo, a máquina é usualmente regulada para o processamento de frutas dos três tamanhos anteriormente mencionados.

Do total produzido em 1999 nos EUA, aproximadamente 70% forma industrializados e os restantes 30% consumidos na forma fresca. O Brasil diferencia-se totalmente dos grandes produtores e consumidores mundiais de abacaxi, pois quase toda a sua produção é consumida na forma fresca, sendo a quantidade industrializada insignificante. Do total mundial industrializado, 46% foram comercializados no mercado mundial, excluindo-se desse percentual o comércio entre o Havai e os EUA, que perfazem sozinhos cerca de 40% das transações realizadas.

2.1.6. Consumo de Bromelina

Para a utilização de bromelina, a indústria alimentícia não se apresenta como um mercado atrativo pois, vem sendo largamente utilizada a papaína no amaciamento de carnes e a grande barreira seria romper o cartel de indústrias produtoras da enzima, pois o consumidor só compra a carne amaciada ou o amaciante de carnes sem preocupar-se com o princípio ativo do produto. Também, atualmente a África do Sul vem produzindo e exportando papaína a preços sem concorrência à princípio.

A indústria de cervejas, onde a bromelina pode ser usada como clarificante, aboliu a utilização da mesma, alegando que esta enzima produz resíduos de difícil retirada dos tanques de armazenagem do produto.

A concentração principal está na indústria farmacêutica brasileira. Além de ser uma das indústrias que mais investe em tecnologias e novos produtos, tendo uma previsão de investimentos no período de 1997 – 2000 de US\$ 1.300 milhões (ABIFARMA). Reflexos do plano econômico que melhorou substancialmente o poder aquisitivo dos brasileiros que estão investindo em saúde e medicamentos, o que vem refletindo no aumento da expectativa de vida pois, segundo o IBGE, o número de idosos atualmente é o dobro do registrado em 1980. A bromelina também é largamente utilizada em procedimentos técnicos de análises clínico laboratoriais.

Até bem pouco tempo atrás um novo remédio que era lançado no mercado brasileiro não tinha a sua fórmula protegida então, logo que era lançado, sem proteção legal, um concorrente logo aparecia. A proteção legal é muito importante na indústria de farmacos, pois chega-se a gastar 15 anos com pesquisas, o que gera um investimento de capital em torno de US\$ 700 milhões. Esta proteção dura 20 anos até a patente ser de conhecimento público.

2.2. PROCESSOS DE RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

O processo de separação e purificação de bioprodutos, chamado também de *dowstream processing* é , atualmente um segmento muito importante na indústria biotecnológica, representando 80 a 90% do custo de produção. Portanto o desenvolvimento de um processo eficiente e de baixo custo é de extrema importância(BELTER et al.,1988,HARRISON,1994).

A grande questão ao se iniciar um processo de purificação é o grau de pureza exigido para a proteína. Proteínas para fins terapêuticos ou de uso direto em humanos necessitam de um alto grau de pureza, o que não é necessário para as enzimas aplicadas em processos industriais. Em uma purificação em larga escala o processo consiste de 4 a 6 etapas divididas em dois grupos. O primeiro formado pelos processos de recuperação da proteína: separação e ruptura de células, separação dos fragmentos e concentração da proteína. No segundo o objetivo é purificar a proteína, através das seguintes etapas: pré-tratamento, purificação e refinamento do produto final(ASENJO,1990).

As técnicas mais utilizadas para a separação das células presentes no caldo fermentado são: filtração rotativa à vácuo e centrifugação .Para o rompimento das células as técnicas mais comuns são: diálise por choque térmico, por solvente, ultrassonificação, homogeneizador e triturador mecânico. A remoção das células pode ser feita por extração em duas fases ,já que estas tendem a ficar na interface. A purificação pode ser feita por: destilação , precipitação, extração em duas fases, cromatografia e cristalização. O tratamento do produto final pode ser feito por filtração estéril, remoção de pirogênio e secagem(ASENJO,1990).

A escolha do método depende das propriedades da proteína e do grau de pureza desejado. Com relação á cromatografia, por exemplo, existem vários princípios de separação que são selecionados de acordo com as propriedades físico-químicas de cada substância de interesse. Assim, para uma amostra que contém uma mistura de proteínas de diversos pesos moleculares, pode-se aplicar a gel filtração que utiliza o princípio de separação por tamanhos. Quando o fator é

a hidrofobicidade, a melhor opção é a cromatografia por interação hidrofóbica(ANSEJO, 1990).

2.3. PRECIPITAÇÃO

A separação de proteínas de meios aquosos por precipitação é um dos métodos mais tradicionais para a recuperação e parcial purificação de biomoléculas. A precipitação é uma operação unitária muito comum e amplamente utilizada na separação de proteínas. Este método implica na alteração da estrutura tridimensional da proteína desconformando-a. Pode ser agressivo, sendo aplicado somente quando a ressolubilização da precipitado é possível. Os precipitados de proteínas são agregados de moléculas protéicas grandes o suficiente para serem decantados ou centrifugados. É uma técnica de fácil ampliação de escala e com viabilidade para operação contínua a custos aceitáveis para grandes volumes. Porém, é uma técnica mais de concentração do que propriamente de purificação.

A solubilidade das proteínas depende da distribuição de grupos ionizáveis, hidrofóbicos e hidrofílicos na superfície da molécula. Tais características são responsáveis por interações polares com o solvente aquoso, interações iônicas com os sais presentes no meio, além da repulsão eletrostática entre moléculas de mesma carga. A presença de sais, solventes orgânicos e pH são fatores importantes na solubilidade das proteínas (SCOPES, 1994).

A adição de solventes orgânicos miscíveis tais como etanol, metanol ou acetona a um meio aquoso contendo proteínas causa uma variedade de efeitos, os quais combinados provocam a precipitação da proteína. O solvente destrói a camada de hidratação em torno dos grupos hidrofóbicos e passa a circundar tais regiões devido à maior solubilidade destas em meio ao solvente. As regiões carregadas com a carga positiva ou negativa da superfície da proteína passam a interagir, devido a retenção de água pelo solvente orgânico, atraindo-se umas às outras e formando agregados. As interações do solvente com as zonas hidrófobas internas causam desconformação irreversível da proteína. Isto pode ser minimizado pela redução da temperatura até valores da ordem de zero graus

celsius ou abaixo, pois a baixas temperaturas a flexibilidade da molécula é menor, reduzindo a capacidade de penetração do solvente e a desnaturação das proteínas. Os álcoois de cadeia mais longa apresentam maior efeito desnaturante do que os de cadeia mais curta (SCOPES, 1994).

Uma carga global próxima a zero na superfície da proteína, o que acontece no ponto isoelétrico das proteínas, minimiza a repulsão eletrostática podendo causar precipitação por interações entre as zonas hidrofóbicas. Esse processo chama-se precipitação isoelétrica, sendo realizado apenas com a correção do pH. De modo geral, a precipitação por qualquer método é facilitada no ponto isoelétrico da proteína. A adição de sais neutros, principalmente $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a elevadas concentrações (1,5 a 3,0 M) reduz a disponibilidade da água devido a hidratação dos íons, criando condições para a precipitação, a qual ocorre principalmente por interação das zonas hidrófobas. O sal e outros precipitantes no meio não provocam a precipitação de todas as proteínas do meio, pois seu efeito é o de reduzir a solubilidade. Com isso, a concentração de sal ou solvente que provoca a precipitação varia com a concentração da proteína e a presença de contaminantes. Este fato pode ser aproveitado se existir a intenção de realizar-se um fracionamento (CESAR, 1999).

2.4. EXTRAÇÃO EM DUAS FASES AQUOSAS

2.4.1. Sistemas de Duas Fases Aquosas

Na escolha de meios de extração para aplicações em biotecnologia, vários critérios devem ser considerados, já que nesta área alguns parâmetros tais quais, solubilidade e estabilidade dos compostos são importantes e não podem ser desprezados. Entre estes critérios deve-se citar (PORTO, 1998):

- O meio não deve ser tóxico ao sistema biológico nem ao homem;
- A recuperação do bioproduto a partir do meio extrator deve ser fácil;

- Deve ter baixo custo e estar disponível comercialmente em grande quantidade;
- Ser possível de esterilizar;
- Ser imiscível ou parcialmente miscível com soluções aquosas;
- Não deve apresentar tendências de formação de emulsões estáveis com materiais biológicos;
- Não ser inflamável.

Além disso, em processos de extração líquido-líquido aplicados a quaisquer sistemas, é imprescindível que os solventes escolhidos formem duas fases (sejam imiscíveis ou parcialmente miscíveis) e tenham densidades diferentes. Além destes fatores a separação entre as fases deve ser rápida.

Nos processos biotecnológicos, em que se opera com biomoléculas ou células, existe um número muito limitado de solventes adequados a serem usados. Assim, a introdução dos sistemas de duas fases aquosas em processos biotecnológicos é uma alternativa que possibilita o emprego da extração líquido-líquido nestes processos, já que estes sistemas caracterizam-se por ajustar-se aos critérios requeridos pelos processos de biosseparações(MATIASSEN et al, 1987).

O uso de solventes orgânicos é, normalmente, limitado pelas características hidrofílicas dos produtos de fermentação, levando à necessidade de utilização de elevadas razões entre as fases orgânica e aquosa, devido aos baixos coeficientes de partição dos produtos em relação ao solvente orgânico. Além disso, os solventes orgânicos são geralmente tóxicos para as proteínas e, também, provocam desnaturação das mesmas.

Sistemas de duas fases aquosas formam-se pela adição de soluções aquosas de dois polímeros hidrofílicos, como PEG (polietileno glicol) e dextrana ou de um polímero e um sal, como PEG e fosfato de potássio. A fase mais leve é

rica em polietileno glicol enquanto a fase mais pesada é enriquecida com dextrana ou sais. Os polímeros e os sais são solúveis em água, mas são incompatíveis entre si e se separam em duas fases (ALBERTSSON, 1986). Eles constituem um meio conveniente e adequado para a extração de substâncias de origem biológica pois a constituição das fases, entre 70% e 90% de água, proporciona um ambiente ameno para o trabalho com compostos biologicamente ativos, preservando sua estabilidade molecular e permitindo, assim, o seu processamento neste meio (COIMBRA,1995).

A separação espontânea, em fases distintas, devido a adição de soluções aquosas de dois polímeros foi inicialmente observada pelo microbiologista holandês Beijerinck, em 1986, ao misturar ágar com gelatina ou amido solúvel. A fase inferior era rica em ágar e a superior em gelatina (ou amido). Em 1956, Albertsson constatou que sistemas formados por polímeros solúveis e solventes orgânicos também possibilitam a partição de materiais biológicos, ou seja, permitiam que uma terceira substância introduzida no sistema fosse coletada, preferencialmente, numa das fases por ajuste de parâmetros físico-químicos. Devido a esta particularidade os sistemas de duas fases aquosas são empregados no isolamento e purificação de biomoléculas de importância comercial, tais como, proteínas, vírus, fragmentos de membranas e organelas celulares. De acordo com Albertsson, é possível ter uma separação bastante seletiva de substâncias usando sistemas aquosos de polímeros (ALBERTSSON, 1986).

Os sistemas de duas fases aquosas formados por PEG-Dextrana- Água e PEG-Sal-água têm sido, nos últimos anos, os mais freqüentemente estudados e utilizados para purificação de um grande número de biomoléculas (DIAMOND et al, 1992)

Albertsson reconheceu a possibilidade de utilizar-se sistemas de duas fases aquosas como um método de separação aplicado a materiais biológicos sob condições que preservam a sua atividade biológica. Além disso, os sistemas de duas fases aquosas são usados também na determinação de propriedades superficiais de biomoléculas , tais como, carga e hidrofobicidade. Assim, ao lado

de trabalhos no campo tecnológico existe também o interesse na utilização da partição como meio de preparação de amostras para uso em técnicas analíticas. Para tanto, são aplicados os diferentes tipos de sistemas de duas fases aquosas existentes.

A variada faixa de aplicabilidade dos sistemas de duas fases aquosas tem estimulado o estudo a fim de estabelecer fundamentos para o trabalho nestes sistemas, além de identificar os mais adequados para a separação de diferentes biomoléculas. (GUAN et al, 1993)

Albertsson (1971) comparou sistemas de duas fases aquosas com os solventes mais convencionais, de acordo com a natureza hidrofóbica, hidrofílica. A fase rica em sal é mais hidrofílica e a fase rica em PEG (polietilenoglicol) é mais hidrofóbica.

Considera-se que a separação de moléculas, incluindo proteínas, em sistemas de duas fases aquosas é dependente das características da superfície molecular dos compostos a serem patrocinados tais como: carga, tamanho e propriedades hidrofóbicas.

A extração com sistemas de duas fases aquosas oferece certas vantagens para o processamento em larga escala. Algumas delas são: o elevado rendimento, a faixa de trabalho próxima do equilíbrio, a fácil ampliação de escala ("scale up") e o processamento contínuo. Com isto, o interesse na aplicação de sistemas de duas fases aquosas deixou de se restringir à biologia celular para concentrar-se na análise dos fundamentos da separação de fases e da partição de proteínas, na redução dos custos do processamento, no aumento da seletividade da extração (por exemplo, pela adição de ligantes), na pesquisa de novos componentes formadores das fases, especialmente para substituir a dextrana, que é um componente de elevado custo, e na operação em múltiplos estágios (Coimbra, 1995).

2.4.2. Tipos de Sistemas de Duas Fases Aquosas

Existem várias substâncias que podem formar duas ou mais fases aquosas ao se misturarem. Estas substâncias podem ser polímeros ou compostos de baixo peso molecular, como os sais, que permitem a separação de fases.

Os sistemas de duas fases aquosas podem ser divididos em quatro grandes grupos (ALBERTSSON, 1986):

a) dois polímeros não iônicos

exemplos: PEG/ ficoll, PEG/Dextrana, PEG/polivinil álcool, polipropileno glicol/dextrana, metil celulose/hidroxipropildextrana, ficoll/dextrana;

b) um polieletrólito e um polímero não iônico

exemplos: sulfato dextrana de sódio/polipropileno glicol, carboximetildextrana de sódio/PEG, carboximetilcelulose de sódio/ metil celulose;

c) dois polieletrólitos

exemplos: sulfato dextrana de sódio/carboximetildextrana de sódio, carbometildextrana de sódio/carboximetil clulose de sódio;

d) um polímero não iônico e um composto de baixo peso molecular

exemplo: polipropileno glicol/fosfato de potássio, PEG/fosfato de potássio, metoxipolietileno glicol/fosfato de potássio, polipropileno glicol/glicose, PEG/glicose, PEG/sulfato de magnésio, PEG / citrato de sódio.

Há ainda novos sistemas formados por PEG/ FeSO_4 e PEG/ Na_2SO_4 que apresentam algumas vantagens em relação aos sistemas com sais de fosfato e citrato, como, por exemplo, o baixo nível de PEG na fase salina, que reduz as perdas do PEG e facilita a purificação das biomoléculas e a reciclagem do PEG. Nesse tipo de sistema foi observado que a concentração de sal na fase PEG e a

concentração na fase salina tendem a diminuir com o aumento da temperatura (PATHAK et al, 1991).

Apesar da grande variedade de sistemas de duas fases aquosas, a quantidade de sistemas realmente aplicáveis para extração líquido-líquido fica reduzida basicamente aos formados por PEG/sal (fosfato/citrato/sulfato) e PEG/dextrana, quando se levam em consideração fatores importantes do ponto de vista industrial, como custo e possibilidade de reciclagem dos reagentes, tempo de separação das fases, possibilidade de esterilização, atoxicidade e faixa de aplicação. Devido a tais fatores, os estudos mais recentes tendem a concentrar-se mais nesses dois sistemas, sendo o sistema PEG/sal o mais estudado devido ao seu baixo custo e menor tempo de separação das fases em relação ao sistema PEG/dextrana (COIMBRA, 1995).

2.4.3. Polietileno Glicol

O polietileno glicol, $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, é um poliéster sintético neutro, linear ou de cadeia ramificada, disponível numa grande variedade de pesos moleculares, de poucas centenas de milhares de daltons. Solubiliza-se em água e em diferentes solventes orgânicos. A sua solubilização em água é atribuída à ligação das moléculas de água a muitas ou todas as moléculas em torno da cadeia de polietileno. Essa ligação ocorre pelo mecanismo de pontes de hidrogênio. Ligações deste tipo são relativamente fracas e podem ser quebradas de várias maneiras.

O PEG é também conhecido pelos nomes comerciais de poliglicol E®, carbowax E®, dependendo da empresa que o fabrica. Para pesos moleculares acima de 20000 daltons são denominados óxidos de polietileno, PEO. São fornecidos na forma de soluções incolores estáveis ou pastas se possuem pesos moleculares menores que 1000 Da. Os de pesos moleculares elevados, acima de 1000 Da, são encontrados na forma de pó ou de flocos brancos. Podem ser estocados a temperatura ambiente, embora a 4⁰ C a ocorrência de oxidação em soluções seja retardada. A oxidação do PEG, detectada pela diminuição do pH

devida a liberação de grupos ácidos, altera a coloração da solução para marrom (COIMBRA, 1995).

Sendo não antigênico nem imunogênico foi aprovado pelo FDA, "Food and Drug Administration". Devido a sua capacidade de formação de uma camada protetora, o PEG pode diminuir a taxa de rejeição de materiais em sistemas biológicos em humanos. Devido às suas propriedades o PEG tem uma série de aplicações farmacêuticas, biológicas e bioquímicas. Ele pode formar um composto ativado PEG-proteína que mantém a proteína ativa e diminui consideravelmente a reação imune, além de aumentar o tempo de vida de soros sanguíneos. Ele pode ser ligado também a superfícies, formando uma camada protetora e biocompatível, para ser empregado em aparelhos de diagnósticos, substituição de artérias e dispositivos relacionados a sangue. O "PEG protetor" pode ser usado também para evitar a adsorção de proteínas em análises bioquímicas de eletroforese por zona capilar, que é uma importante técnica analítica empregada em bioquímica. Além disso, o PEG pode ser usado com lipossomas para a liberação controlada e distribuição seletiva de medicamentos, pois os lipossomas sem o PEG podem ser rapidamente atacados e eliminados do corpo humano, sem cumprir a sua função. Por ser solúvel em muitos solventes orgânicos, o PEG pode ser utilizados para solubilizar enzimas neste meio sem desnaturá-las através da formação de uma camada protetora. Além disso, compostos insolúveis em água podem tornar-se solúveis quando ligados ao PEG, como por exemplo substratos de enzimas, cofatores, corantes, etc(HARRIS, 1992).

2.4.4. Sistema PEG/Sal

A formação de sistemas PEG/sal foi primeiro observada por Albertsson nos anos 50, mas os fundamentos teóricos ainda não são bem explicados. Os sistemas PEG/dextrana já foram muito estudados, porém, nos últimos anos o enfoque principal está nos sistemas PEG/Sal. Eles foram introduzidos para a aplicação prática da separação de proteínas em larga escala devido à maior diferença de densidade entre as fases, menor viscosidade e menores custos; levando a uma separação mais rápida para os sistemas PEG/dextrana. A

aplicação industrial de sistemas PEG/sal foi incentivada e desenvolvida pela disponibilidade de separadores comerciais que permitam separações de proteínas continuamente e mais rapidamente(KULA, 1990 e FRANCO,1992).

Para sistemas PEG/sal, os efeitos de “salting out” parecem atuar aumentando o comprimento da linha de amarração, retirando as proteínas da fase salina para a fase rica em PEG, ou , se a solubilidade da proteína na fase rica em PEG não for suficiente, elas tendem a precipitar na interface. Os limites de solubilidade e “salting out” são dependentes das proteínas, portanto uma resposta diferencial é esperada quando uma mistura de proteínas é manipulada (KULA,1982).

2.4.5. Diagrama de Fases

A formação das duas fases aquosas depende da concentração dos componentes do sistema. O diagrama de fases mostra a região monofásica e bifásica de acordo com a concentração de cada componente expressa em % p/p.

A curva que separa a região de duas fases da região de uma fase é chamada curva binodal ou curva de equilíbrio. A região acima da curva binodal é chamada bifásica e abaixo monofásica.

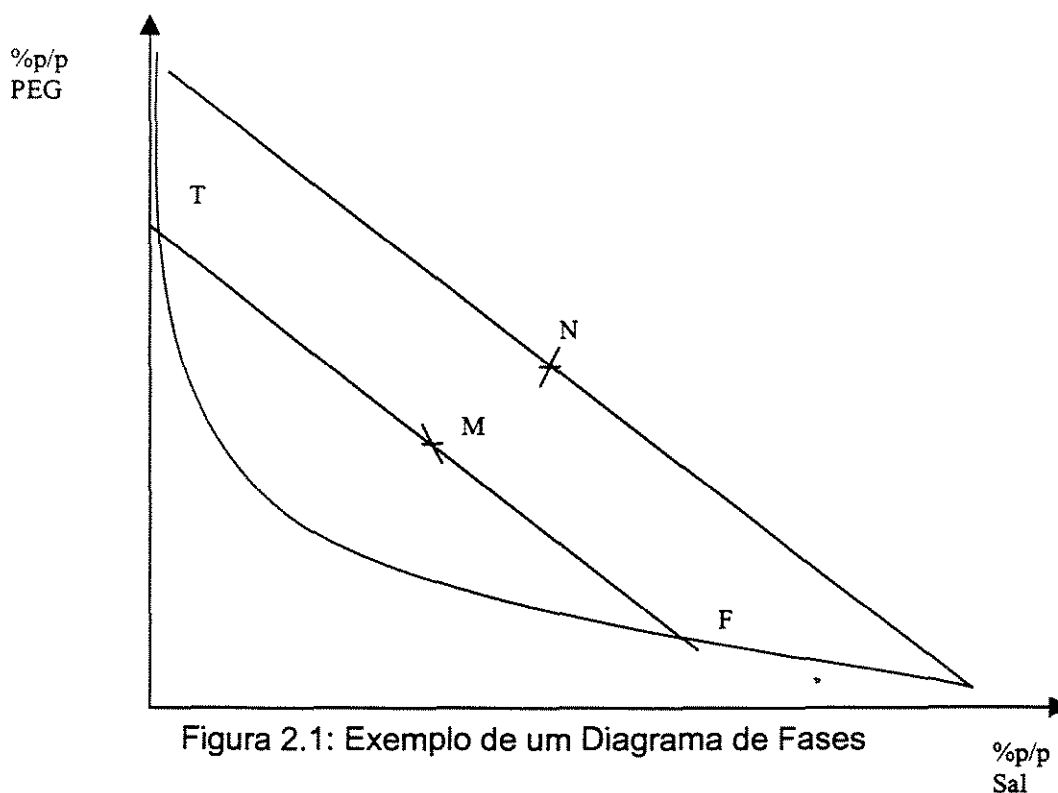


Figura 2.1: Exemplo de um Diagrama de Fases

A figura 2.1 mostra um exemplo genérico de um diagrama de fases. A composição inicial do sistema é dado pelo ponto M e a composição final de cada fase após atingir o equilíbrio é dada pelos pontos T (fase superior ou de topo) e F (fase inferior ou de fundo). O segmento TMF é chamado de tie-line ou linha de amarração, e todos os sistemas cuja composição inicial está contida

nessa linha possuem a mesma composição de fases após o equilíbrio, porém com diferentes razões de volumes entre as fases superior e inferior. Já a linha de amarração determinada pelo ponto N define uma nova linha de amarração que aumentou proporcionalmente a concentração entre as fases em relação à linha de amarração determinada por M.

Como poderemos observar o fato de mudarmos da linha de amarração, definida pelo ponto M, para a linha de amarração definida pelo ponto N, variando proporcionalmente a concentração dos componentes das fases, não obteremos uma melhora significativa na recuperação e purificação da proteína em estudo (CESAR,2000).

2.4.6. Fatores que Influenciam no Sistema de Fases

Os principais fatores que influenciam no sistema de fases e consequentemente alteram o diagrama de fases são: peso molecular do polímero, concentração dos componentes do sistema e temperatura.

Quanto maior o peso molecular do polímero, menor a concentração necessária para a formação de duas fases. Isso significa que a curva binodal desloca-se no sentido da região monofásica à medida que o peso molecular do polímero aumenta. Para um sistema polímero-polímero (PEG/dextrana, por exemplo) a curva binodal torna-se cada vez mais assimétrica a medida que a diferença entre os pesos moleculares dos polímeros aumenta. O peso molecular do polímero afeta também o tempo de separação das fases, mas tal problema pode ser minimizado pela centrifugação do sistema após a mistura das fases (ALBERTSSON, 1986, ALBERTSSON et al., 1994). Ele afeta também o comprimento da linha de amarração, que tende a aumentar com o aumento da concentração dos polímeros (FORCINITI et al., 1991).

A concentração dos componentes do sistema pode afetar a viscosidade e a densidade do sistema, causando diferenças no tempo de separação das fases e na razão de volumes.

A temperatura causa influência no diagrama de fases pois altera a composição das fases no equilíbrio, deslocando a curva binodal, e modificando também o comprimento da linha de amarração. Em geral, o comprimento da linha de amarração diminui com o aumento de temperatura. O seu efeito varia de acordo com o tipo de sistema. No caso de sistemas PEG/dextrana, a formação das fases é facilitada em temperaturas baixas (menores que a ambiente) e para os sistemas PEG/fosfato, a situação é oposta, pois temperaturas mais altas e próximas do ambiente facilitam a separação entre as fases. Quando o sistema está próximo ao ponto crítico, ele é mais instável devido ao deslocamento da curva binodal, podendo atingir mais facilmente a região monofásica. O aumento da temperatura do sistema causa ainda, em um sistema PEG/sal, aumento na concentração de PEG na fase polimérica e redução da sua concentração na fase salina. Esse efeito é uma das razões de se trabalhar com a temperatura do sistema fixa.

O pH e o tipo de cátion também são variáveis que podem influenciar no diagrama de fases. Diminuindo o valor do pH, as concentrações necessárias de polímero e sal de um sistema PEG/sal aumenta, deslocando a curva binodal para a direita. Esse fato pode ser explicado pelo aumento da razão $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$, para o caso do fosfato, com a diminuição do pH, pois como o ânion monovalente é menos efetivo no “salting out” do PEG (fenômeno de expulsão devido ao tamanho do PEG), será necessária uma concentração maior dos componentes para formar o sistema bifásico. No caso do tipo de cátion, a substituição de fosfato de potássio desloca a curva binodal para a direita, e portanto a concentração dos componentes necessária para a formação do sistema de duas fases aumenta, sugerindo que o cátion sódio é mais eficiente que o cátion potássio para o efeito do “ salting out” do PEG.

2.5. Fundamentos da Partição das Proteínas

Devido à atenção que vem sendo dada à produção de proteínas pela engenharia genética e o desenvolvimento da tecnologia de enzimas renovaram o interesse pelos processos de separação de proteínas e suas descrições quantitativas que servem de base para o "scale up". Os fundamentos de partição de biomoléculas entre as duas fases ainda não são totalmente compreendidos.

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

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

- Tipo dos polímeros que formam as fases: peso molecular médio, distribuição do peso molecular, modificações químicas poliméricas.
- Composição das fases: comprimento da linha de amarração, tipos de íons presentes ou adicionados ao sistema, força iônica.

- Biomolécula: tamanho, carga, propriedades superficiais, concentração.
- pH e temperatura

As condições adequadas para a partição devem ser encontradas experimentalmente devido à interdependência dos fatores citados acima.

2.5.1. Coeficiente de Partição

O coeficiente de partição (K) é uma grandeza que representa a relação de concentração da substância de interesse na fase superior e inferior após atingido o equilíbrio:

$$K = C_T / C_F \quad 2.1$$

Onde:

C_T é a concentração da substância de interesse na fase superior no equilíbrio

C_F é a concentração da substância de interesse na fase inferior do equilíbrio.

O K é uma variável que mede a eficiência do processo de separação da substância de interesse pois mostra a sua distribuição nas duas fases aquosas. Pode ser calculado tanto para a substância de interesse como para os contaminantes ou proteínas totais presentes na amostra, podendo-se comparar estes valores. O que se deseja é que os dois coeficientes tenham uma ordem de grandeza bem distinta entre si. Como os sistemas em duas fases aquosas são aplicados aos processos de separação em biotecnologia, geralmente as substâncias de interesse são produtos biotecnológicos, principalmente proteínas e enzimas, às quais normalmente o K está associado.

Diversos tipos de interações podem ocorrer entre as substâncias de interesse e os componentes do sistema, tais como: interações de cargas, interações entre as pontes de hidrogênio, força de van der Waals e interações hidrofóbicas. Portanto existe uma série de fatores que podem influir na eficiência da partição (ALBERTSSON, 1986).

Nos sistemas de duas fases aquosas, os pigmentos têm preferência pela fase superior pois são substâncias hidrofóbicas (LAHORE et al., 1995, HUSTEDT et al., 1985).

2.5.2. Influência da Massa Molecular do Polímero e da Proteína no Coeficiente de Partição

O peso molecular do polímero influencia o valor de K. Em um sistema PEG/sal, se o peso molecular do PEG for elevado, a partição da proteína será mais favorável à fase salina. Caso o peso molecular do PEG seja baixo, ocorrerá o oposto, sendo a partição favorável à fase polimérica. O mesmo ocorre nos sistemas PEG/dextrana: se o peso molecular do PEG for elevado e o da dextrana for baixo, a partição será favorável à fase contendo dextrana. Isso ocorre provavelmente devido ao aumento do efeito do volume excluído que ocorre na fase PEG. Esse efeito é menor para substâncias de baixo peso molecular.

O peso molecular da substância a ser separada também influencia em K, pois quanto maior for a molécula, maior será a área de contato que interage com os componentes do sistema e, de acordo com as características da molécula e com o tipo de interação, ela será mais favorável a uma das fases. Esse fator é muito importante quando se deseja separar duas substâncias com pesos moleculares muito diferentes (JOHANSON, 1994, ALBERTSSON, 1986, YANG et al., 1994).

O K depende também do peso molecular da proteína. Ele diminui como aumento do peso molecular e a magnitude dessa diminuição é maior para PEG com baixo peso molecular e tende a ficar estável para PEG com alto peso

molecular (BAMBERGER ET AL., 1985, ALBERTSSON, 1986, FORCINITI et al., 1991). O tipo de proteína também influi no valor de K, porque as proteínas são macromoléculas polieletrólitas que carregam cargas quando estão em soluções aquosas. As cargas dependem da composição, da sequência de aminoácidos, e também das propriedades da solução aquosa, como o pH e a concentração dos solutos (SCHLUCK et al., 1995)..

2.5.3. Influência do pH do Sistema no Coeficiente de Partição

Outro fator importante que influencia o K é o pH do sistema. Alternado o pH, ocorrem mudanças na distribuição de cargas da proteína. Em baixos valores de pH ocorre o aumento da carga positiva e em valores altos de pH, da carga negativa. Trabalhando-se em um valor de pH próximo ao ponto isoelétrico (pI), onde a somatória de cargas da proteína é praticamente nula, existirá apenas o efeito do tamanho e concentração do polímero e do tamanho e composição da superfície da proteína, considerando-se apenas os efeitos eletrostáticos. (FORCINITI et al., 1991).

Na partição da cutinase o K aumenta com o aumento do pH devido ao deslocamento da curva binodal. Além disso, aumentando o pH, a concentração do ânion HPO_4^{2-} aumenta em relação ao ânion H_2PO_4^- , o que aumenta o efeito do 'salting out' fazendo com que a cutinase migre para a fase PEG (SEBASTIÃO et al., 1994)

2.5.4. Influência das Interações entre a Proteína e o Sistema de Fases no Coeficiente de Partição

Para o entendimento da influência de alguns fatores em K , é importante compreender o que é solubilidade de proteínas. Uma proteína apresenta uma superfície formada por regiões carregadas positivamente e negativamente, além de possuir regiões hidrofílicas e hidrofóbicas. A distribuição dessas regiões depende do tipo de proteína. A solubilidade da proteína é determinada pelas

interações entre tais regiões e o solvente que está presente no meio onde ela está contida. A solubilidade depende, portanto, de fatores termodinâmicos que favorecem ou não a sua solubilidade no solvente. O aumento da proporção de zonas hidrófobas na superfície da proteína resulta no aumento da afinidade a solventes apolares, como é o caso do PEG, fazendo com que esta permaneça na fase superior.

A solubilidade das proteínas nas soluções de PEG depende da interação hidrofóbica entre a proteína e o grupo etileno do PEG. Isso pode explicar a alta tendência das proteínas hidrófobas de se deslocarem para a fase superior rica em PEG. Neste caso, o PEG tende a interagir fortemente com as regiões apolares da proteína (SCHMIDT et al., 1996).

2.5.5. Influência da Concentração dos Componentes do Sistema no Coeficiente de Partição

A concentração dos componentes do sistema e portanto, o comprimento da linha de amarração, também afetam o K . Em sistemas próximos ao ponto crítico, as proteínas em geral apresentam uma partição igual entre as duas fases, portanto o valor de K é igual a 1. Com o aumento da concentração dos componentes, que corresponde a um aumento no comprimento da linha de amarração, o valor de K será maior ou menor que 1 dependendo do tipo de proteína. Existem exceções a essa regra, podendo ocorrer valores de K diferentes de 1 para sistemas próximos ao ponto crítico, ou K pode aumentar com o aumento da concentração dos componentes até um máximo e depois diminuir. Para o caso de células ou particulados, o K é maior para os sistemas próximos ao ponto crítico. O efeito do comprimento da linha de amarração em K é maior em proteínas com alto peso molecular. Além disso, para um sistema PEG/sal, um aumento no comprimento da linha de amarração leva a um aumento da concentração de sal na fase inferior e a um valor praticamente constante na fase superior, favorecendo o efeito do “salting out” da fase rica em sal para a fase rica em PEG (BAMBERGER et al., 1985, ALBERTSSON, 1986, MINAMI, 1997).

2.5.6. Influência da Concentração de Proteínas no Coeficiente de Partição

O K depende também da concentração da proteína presente na amostra. Para determinar seu valor é importante trabalhar com concentrações não muito altas de proteínas (de preferência menores que 1g/L), pois essas concentrações podem provocar a precipitação da proteína devido a presença de PEG(SCHMIDT et al, 1996).

A concentração de proteínas também é importante perto do ponto crítico, pois ao se adicionar uma pequena quantidade de proteína em um sistema próximo ao ponto crítico, o diagrama de fases pode modificar-se deslocando a curva binodal, como ocorre quando adicionamos uma pequena quantidade de água. Com isso, o valor de K poderá mudar (MINAMI, 1997). Quando o sistema está afastado do ponto crítico, não ocorre deslocamento da curva binodal para concentrações muito baixas de proteína, pois a composição das fases praticamente não se modifica com a adição de proteína. Porém, para altas concentrações pode haver influência na formação das fases que provoca redistribuição dos componentes do sistema, modificando o diagrama de fases e, consequentemente, o valor de K (GUAN et al, 1994).

2.6. TEORIA DE FORMAÇÃO DAS FASES

Existem diversos modelos e teorias para a formação dos sistemas de duas fases aquosas que tentam prever a curva binodal dos sistemas polímero-polímero e polímero-sal. A existência de tantos modelos deve-se ao pouco conhecimento das misturas líquido-líquido, principalmente de polímeros e soluções eletrolíticas. Na realidade não existe, até o momento, uma boa compreensão das teorias de misturas de líquidos. (CABEZAS Jr, 1996)

A grande maioria dos modelos está contida em dois grupos básicos: um grupo baseado na teoria da solução de polímeros, e outro grupo com teorias adaptadas dos tratamentos termodinâmicos do equilíbrio de fase líquida. Dentro desse dois grupos, a modelagem de formação das fases pode ser dividida em

quatro tipos: modelos baseados em expansão virial osmótica; modelos baseados na extensão da teoria de Flory-Huggins; modelos incorporando a teoria da equação integral como principal elemento; modelos que não se encaixam em nenhuma destas categorias, como o modelo de volume excluído. Existe ainda, o modelo Ptizer que é o mais aplicável para os sistemas polímero-sal. No caso dos sistemas polímero-sal, ainda não existem muitas teorias que se apliquem bem a este tipo de sistema, pois a maioria não considera o efeito dos eletrólitos nas soluções, levando a um erro na modelagem da formação das fases. Além disso, o estudo de tais sistemas ainda é muito recente (CABEZAS Jr, 1996, WU et al, 1996, WALTER et al. 1991).

As condições utilizadas para a modelagem da formação das duas fases são a igualdade dos potenciais químicos de cada componente (o solvente, a água, e os solutos, o polímero e/ou sal) nas duas fases aquosas e o balanço de massa de cada componente, ambos após o equilíbrio entre as fases (CABEZAS Jr, 1996).

O modelo de expansão virial osmótico ficou mais conhecido com o desenvolvimento do trabalho de Edmond e Ogston. O equacionamento matemático e a interpretação física dos parâmetros do modelo não são complicados. Existem dois tipos diferentes de expansão virial osmótica, uma é a teoria de McMillan- Mayer e a outra é a teoria de Hill. Na teoria de McMillan-Mayer, o solvente é tratado como uma substância sem características especiais, e portanto considera-se somente a interação entre as moléculas do soluto, simplificando muito os mecanismos estatísticos do problema. Porém, aqui existe a necessidade de correção da pressão pois como o solvente não é importante, o seu potencial químico deve ser constante e independente do soluto e portanto a pressão não pode ser constante. Logo, para se utilizar esse modelo em condição de pressão constante, deve-se acrescentar a pressão osmótica da solução. Já a teoria de Hill não considera o solvente como uma substância secundária e por isso os potenciais químicos dos componentes podem ser determinados em temperatura e pressão constantes (CABEZAS Jr, 1996).

A teoria da treliça é uma idéia de modelagem macromolecular de misturas líquidas em termos de uma treliça de cristal. A idéia principal é que em uma treliça as macromoléculas e as moléculas pequenas podem se distribuir e redistribuir até que todos os arranjos ou configurações possam ser estudados. Basicamente é um estudo estatístico de como essas moléculas podem ser arranjadas. A teoria de Flory-Huggins utiliza-se destes princípios. Ela é a mais utilizada em sistemas polímero-polímero, chegando a oferecer uma ótima aproximação da curva binodal. A sua grande vantagem em relação a outras teorias é a simplicidade aliada à qualidade de suas previsões e correlações da formação de fases. Nesse modelo o sistema é representado por uma treliça tridimensional, onde cada lado é preenchido com uma molécula de solvente ou um segmento de um dos polímeros. O problema básico é obter a expressão da energia livre de Gibbs de mistura. Existem tentativas de adaptar esta teoria para os sistemas polímero-sal, porém estes modelos ainda não estão muito ajustados para a formação de fases neste tipo de sistema (CABEZAS Jr, 1996, WALTER et al, 1991, BROOKS et al., 1985, WU et al., 1996).

Outra teoria muito utilizada nos sistemas polímero-polímero, para modelar a curva binodal, é a do volume excluído, baseada em argumentos estatísticos e geométricos: as duas fases estão saturadas com cada polímero, ou seja, todo o volume está ocupado pelas moléculas dos dois polímeros e da água de hidratação; a concentração de cada polímero em cada fase é determinada pela quantidade de moléculas de cada polímero ajustado no volume da fase.

A teoria geométrica estatística aplicada em sistemas polímero-polímero considera as seguintes hipóteses: as moléculas da mesma espécie estão distribuídas randomicamente na fase homogênea; a estrutura da solução está geometricamente saturada em termos de tamanho e forma de todas as moléculas do sistema; a existência de interações moleculares não muda a natureza da distribuição molecular. A formação das duas fases é explicada da seguinte forma: na situação monofásica, as moléculas do soluto estão separadas e as moléculas adicionais de soluto ainda podem ser inseridas no espaço livre que existe. No

ponto de separação de fase, as moléculas do soluto estão bem próximas umas das outras e a solução não aceita mais moléculas adicionais de soluto. Quando a concentração total do soluto aumenta, ocorre a formação de duas soluções geometricamente saturadas e estruturalmente diferentes(GUAN et al., 1994).

A teoria de Debye-Huckel é a mais adequada para os sistemas que contém soluções com cargas, como é o caso dos sistemas polímero-sal ou sistemas polímero-polímero com sais. Essa teoria leva em consideração a distribuição dos íons na solução para o cálculo de potencial químico e é mais utilizada em soluções com concentração iônica até 0,1 M, de onde se obtém ótimos resultados. À medida que a concentração iônica aumenta, o desvio entre os resultados teóricos e experimentais aumenta. Isso ocorre porque a teoria é precisa apenas para soluções diluídas, onde o comportamento eletrostático domina. Em soluções concentradas, o comportamento eletrostático é reduzido devido à presença de muitos íons que tendem a isolar as cargas eletrostáticas entre si (CABEZAS Jr, 1996).

O modelo virial de Ptizer é um modelo que pode ser aplicado com sucesso em sistemas polímero-sal. Ele utiliza o excesso de energia livre de Gibbs nos sistemas polímero-sal, combinando os parâmetros eletrostáticos com a equação virial. Esse modelo é uma extensão do modelo de Debye-Huckel, pois além das interações eletrostáticas, considera-se o efeito da força iônica. Com a utilização do termo da equação virial, o modelo leva em consideração também os solutos não-eletrólitos, como é o caso dos polímeros, o que faz com que ele se adapte melhor aos sistemas polímero-sal (WU et al., 1996)

2.7. Tempo de Separação das Fases

O tempo de separação das fases após a mistura dos componentes depende do tipo de sistema. Sistemas contendo PEG/sal possuem um tempo de separação das fases muito menor que os sistemas PEG/dextrana devido à densidade e viscosidade do sistema. Em sistemas dextrana/ficoll, o tempo varia de 1 a 6 horas pela ação da gravidade, enquanto em sistemas PEG/dextrana esse

valor cai para 5 a 30 minutos dependendo da concentração e do peso molecular dos polímeros. Nos sistemas PEG/fosfato, o tempo de separação entre as fases é inferior a 5 minutos (COIMBRA, 1995).

Outro fator que também influencia o tempo de separação é a velocidade de coalescência das pequenas bolhas que se formam durante a agitação. Quando se agita um sistema de fases de maneira a uniformizá-lo, inicialmente ocorre a formação de pequenas regiões ricas em cada componente. Com o tempo, essas regiões aumentam e separam-se em duas regiões distintas (BAMBERGER et al, 1985).

A posição em relação ao ponto crítico também exerce influência no tempo de separação das fases. Nos sistemas próximos ao ponto crítico, o tempo de separação é maior devido a uma pequena diferença de densidade. Já no caso dos sistemas muito distantes do ponto crítico, a viscosidade aumenta devido ao aumento da concentração do polímero, tornando a separação de fases mais lenta.

2.8. Modelagem matemática do Coeficiente de Partição

Como o valor de K depende de diversos fatores, o desenvolvimento de um modelo para predizê-lo torna-se específico para um tipo de sistema ou substância. Existem vários trabalhos para o desenvolvimento de equações que possam prever o valor de K, mas que são específicas (ASENJO et al., 1994, EITEMAN et al., 1994).

Segundo ALBERTSSON (1986), pode existir, na partição de substâncias, cinco fatores diferentes que podem atuar separadamente (predominância de um fator em relação aos outros) ou em conjunto de acordo com o tipo de substância e do sistema de fases. São eles:

- Fator do tamanho, que existe quando a partição depende do tamanho da molécula ou da área superficial das partículas;

- Fator eletroquímico, que surge quando o potencial elétrico existente entre as fases do sistema é usado para separar as moléculas de acordo com a sua carga elétrica;
- Fator de afinidade hidrofóbica, que é a utilização das propriedades hidrofóbicas do sistema de fases para separar as moléculas em função da sua hidrofobicidade;
- Fator de afinidade bioespecífica, que utiliza a afinidade entre os locais da molécula como ligantes do polímero para a separação;
- Fator de conformação, que é considerado quando a conformação da molécula é o fator predominante.

Esses fatores podem ser agrupados na seguinte equação:

$$\ln K = \ln K^0 + \ln K_{eletro} + \ln K_{bioesp} + \ln K_{tam} + \ln K_{conf} \quad 2.2$$

Onde:

K_{eletro} é o fator eletroquímico;

K_{hifob} é o fator de afinidade hidrofóbica;

K_{bioesp} é o fator de afinidade bioespecífica;

K_{tan} é o fato do tamanho;

K_{conf} é o fator de conformação;

K_0 são os outros fatores que podem causar influência em K.

2.9. APLICAÇÕES EM LARGA ESCALA

Nas últimas décadas, várias pesquisas têm sido realizadas com sistemas bifásicos aquosos em escala laboratorial para a separação de proteínas, organelas celulares, vírus e outros materiais biológicos. A aplicação de

sistemas bifásicos para a partição de proteínas em larga escala também tem sido demonstrada, nos últimos anos, através da utilização de centrífugas e extratores (DIAMOND & HSU, 1992; WALTER & JOHASSON, 1986).

A extração bifásica aquosa exibe inúmeras vantagens sobre outros métodos de separação e recuperação. De acordo com ALBERTSSON (1986) e WALTER & JOHASSON (1986), as principais vantagens da aplicação dos sistemas bifásicos aquosos são:

- Facilidade no aumento de escala;
- Rápida transferência de massa;
- Equilíbrio alcançado com recurso a baixas energias na forma de mistura mecânica;
- Possibilidade de operação em contínuo;
- Possibilidade de operação à temperatura ambiente sendo
- Mais econômico que outros processos de separação.

As operações envolvendo os sistemas bifásicos aquosos são, de um modo geral, facilmente executadas em qualquer escala técnica. Isto se deve principalmente a rapidez com que ocorre o equilíbrio das fases permitindo um coeficiente de partição constante devido a baixa tensão interfacial destes sistemas, a simplicidade das unidades de operação e a disponibilidade comercial dos equipamentos necessários (CABRAL & AIRES-BARROS, 1993). Em particular, a facilidade em se obter o “scale up” pode ser demonstrado pela independência do coeficiente de partição com relação ao volume dos sistemas. Aumentos de escala com fatores de 25.000 já foram mencionados na literatura. Para facilitar a utilização destes sistemas de escala laboratorial para larga escala, no entanto, faz-se necessário a caracterização do sistema bifásico

adequado para a partição de uma determinada proteína e a correlação deste com o coeficiente de partição da biomolécula (DIAMOND & HSU,1992).

Assim, quando se deseja isolar uma determinada proteína de uma mistura complexa, torna-se essencial encontrar condições ideais. Isto é realizado normalmente, conforme descrito anteriormente, via experimentos em escala laboratorial, para então se realizar o “scale up”. Para se obter o projeto de um experimento, é importante otimizar o rendimento e a partição versus o restante dos componentes da mistura, isto é, o fato de purificação. A grande vantagem é que os componentes que podem prejudicar os passos de purificação são removidos sem a necessidade da utilização de centrifugações e filtrações por membranas. Ainda, a partição espontânea de proteínas reside no fato de que o material contaminante é facilmente removido em um só passo. Sob condições favoráveis, é possível atingir-se um elevado fator de purificação no primeiro passo de extração (MATIASSEN & LING,1987)

Resultados obtidos com a taumatina (proteína com propriedades adoçantes), revelara, em um único passo de extração com sistema bifásico PEG – 6000/ Fosfato contendo NaCl, a partir de extrato bruto livre de fragmentos de células, valores de rendimento e fator de purificação de 90-95% e 20, respectivamente (CASCONE et al,1991).

Estudos realizados por KRONER et al (1982), estabeleceram uma comparação entre o processo de purificação utilizando sistemas de duas fases aquosas e o convencional constituído essencialmente por precipitação seguida por dois passos cromatográficos e obtiveram grau de pureza semelhantes, atingindo-se um rendimento superior no protocolo de extração líquido-líquido (71% versus 51%). Uma análise econômica comparativa entre os dois processos, envolvendo custo de pessoal, material e operação revelou que uma unidade de atividade enzimática produzida pelo protocolo clássico tinha um custo de cerca de 40 vezes superior ao de uma unidade de enzima resultante das extrações sequenciais em sistemas de duas fases aquosas.

2.10. SISTEMAS BIFÁSICOS AQUOSOS MAIS ESTUDADOS

Existe uma grande variedade de polímeros hidrófilos, naturais ou sintéticos, capazes de gerar a separação de fases ao se misturarem com um segundo polímero ou com um soluto de baixo peso molecular, como um sal.

Em princípio, todos os tipos de sistemas bifásicos aquosos podem ser empregados na separação de biomoléculas. No entanto, quando se considera o aumento de escala onde critérios como custo, quantidade de reagentes, tempo de separação das fases e reciclagem dos componentes não podem ser desconsiderados, o número de sistemas capazes de conjugar os requisitos necessários é bastante reduzido.

Um dos fatores chave na aplicação em grande escala da partição bifásica aquosa reside na seleção do sistema bifásico aquoso mais indicado. A grande maioria dos trabalhos encontrados na literatura para sistemas polímero-polímero tem sido efetuada com PEG e um polissacarídeo, usualmente uma Dextrana fracionada (ALBERTSSON, 1986; WALTER & JOHANSSON, 1994).

Estes sistemas parecem exibir características fundamentais, apresentam propriedades físicas favoráveis, como baixa viscosidade em ambas as fases e uma razoável diferença de densidade entre as duas fases e são formados por polímeros biodegradáveis e disponíveis em grande quantidade, enquadrando-se dentro da legislação de um grande número de países para o trabalho com produtos alimentícios e farmacêuticos (DIAMOND & HSU, 1992).

O polietileno glicol é o polímero padrão para os sistemas bifásicos aquosos. A utilização do PEG torna-se vantajosa devido ao baixo custo do polímero e as propriedades físicas e químicas favoráveis. Por outro lado, a Dextrana apresenta um inconveniente: o elevado custo. Este polímero, constituído exclusivamente por unidades de glicose, pode ser obtido por um processo fermentativo envolvendo a bactéria *Leuconostoc mesenteroides* (ALSOP, 1983) ou diretamente, por síntese enzimática e por síntese

química(HARRIS &ALPANI, 1985).Estas técnicas de obtenção direta da Dextrana não são, no presente, competitivas pois quase todas as preparações comerciais são obtidas pela via fermentativa, e esta, por sua vez, representa um elevado custo.

Para combater a falta de competitividade econômica dos sistemas bifásicos constituídos por PEG e Dextrana tem-se recorrido quase exclusivamente a sistemas PEG/Sal. Os mais empregados na aplicação em grande escala destas técnicas de purificação são os sistemas PEG/Fosfato e PEG/Sulfato(BOLAND et al, 1991; KULA et al, 1982; PAPAMICHAEL et al, 1992). Estudos comparativos sobre a aplicação de várias técnicas de purificação mostram que estes sistemas podem competir com outros métodos de purificação.

2.11. EQUIPAMENTOS UTILIZADOS NA EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

Ultimamente, em virtude da necessidade em se procurar alternativas mais viáveis economicamente para uma dada separação, a extração líquido-líquido vem sendo usada de maneira crescente. Isso torna-se evidente pelo grande número de novos equipamentos desenvolvidos neste campo.

Alguns fatores que vêm estimulando o desenvolvimento da extração líquido-líquido, atualmente, são (HUMPHREY et al.,1984):

- Perspectivas de economia de energia em compara a destilação;
- Possibilidade de evitar a degradação dos compostos, devido ao efeito da temperatura, que pode ser causada por processos que fazem uso de energia térmica;
- Desenvolvimento de equipamentos mais eficientes que permitam um contato das fases líquidas mais efetivo;

- Melhor entendimento dos princípios para desenvolvimento, projeto e “scale-up” dos processos de extração.

No passado, as operações de extração líquido-líquido eram restritas a processos que utilizassem um pequeno número de estágios devido a elevada altura dos estágios teóricos associados a colunas gravitacionais que representava um alto investimento de capital, tornando o processo de extração bastante oneroso. Nas últimas décadas, contudo, novos projetos de extratores tipo coluna e tanques misturadores foram desenvolvidas possibilitando em vários casos considerar a extração líquido-líquido como alternativa para separações que requerem um grande número de estágios teóricos (LOGSDAIL et al., 1957). O desenvolvimento de novos equipamentos para efetuar extração líquido-líquido tem tornando esta método mais competitivo com relação aos outros processos de separação existentes(SOUZA, 1997).

Para o desenvolvimento de equipamentos de extração líquido-líquido, são alvo de considerações e fatores, como (STEINER, 1998):

- O sistema de trabalho: solvente a ser usado, grau de pureza do refinado, condições de escoamento dos líquidos, entre outros;
- Dados de equilíbrio: são imprescindíveis, deverão estar disponíveis na temperatura de trabalho;
- Dados de transferência de massa.

Durante o processo de extração vários fenômenos acontecem no interior do extrator, alguns dos quais prejudicam a transferencia de massa. Os mais conhecidos são definidos abaixo:

- “Hold up”: é a fração retida de fase dispersa, que é a razão do volume da fase dispersa pelo volume útil total do equipamento;

- **Inundação:** quando as condições de operação na coluna fazem com que seja impossível as correntes escoarem em contracorrente e uma fase de dispersa na outra. Nesta situação, as correntes entram e saem da coluna numa mesma extremidade.

- **"Backmixing"**(mistura axial): é o retorno axial da fase dispersa. A fase dispersa escoar em sentido oposto ao esperado. Ele faz com que o gradiente de concentração, que é a força motriz da transferência de massa da coluna, diminua, prejudicando a taxa de transferência de massa e a eficiência da separação.

- **"Backflow"**: é o retorno axial da fase contínua. Ocorre quando a fase contínua é carregada na direção oposta a esperada.

Num processo de extração, existem diversos fatores que influenciam o despenho do extrator, principalmente em escala industrial. Portanto, é necessário um estudo em escala piloto para melhor definir as condições de operação.

A utilização de extratores verticais nos processos de extração líquido-líquido é justificado devido à pequena área que ocupam, terem boa eficiência de separação e apresentarem facilidades de operação e manutenção.

Existem vários tipos de extratores que podem ser classificados de acordo com os princípios gerais de operação e construção. Vários autores dividiram os extratores em duas categorias, de acordo com o tipo de contato entre as fases em (HANSON, 1971):

- **Sistemas de contato e separação de fases em estágios (descontínuos):** estes sistemas são formados por uma série de estágios compostos por tanques misturadores-decantadores, onde a solução e o solvente são misturados até serem atingidas as concentrações de equilíbrio em ambas as fases. Após isso, deixa-se decantar a fase mais densa e, então, faz-se a separação das fases antes delas passarem ao próximo estágio. Nestes equipamentos, obtém-se altas eficiências de separação em cada estágio. A desvantagem é o grande espaço físico que ocupam (Figura 2.2).

- **Sistemas de contato diferencial (contínuos):** nos sistemas diferenciais, os líquidos escoam continuamente em contracorrente, sem misturadores ou decantadores intermediários, sendo que estes contadores são normalmente colunas verticais. O escoamento em contracorrente ocorre em função da diferença de densidade entre as fases. A fase mais densa é alimentada no topo e flui de maneira descendente no interior da coluna e a fase menos densa é alimentada na base e flui em direção ao topo da coluna. As colunas de contato diferencial são equipamentos mais compactos e ocupam um menor espaço físico que os misturadores-decantadores.

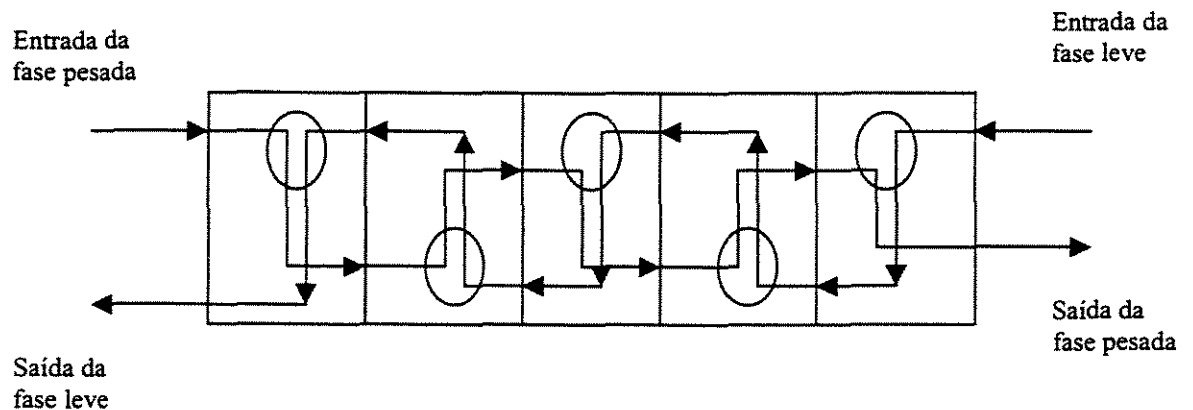


Figura 2.2 – Exemplo de um extrator em estágios discretos

Esta categoria pode ainda ser subdividida de acordo com a maneira de se promover a mistura das fases, em:

- Colunas sem agitação mecânica e separação pela gravidade, como colunas de pratos perfurados fixos, colunas tipo Spray e colunas recheadas (Figura 2.3). Nestes equipamentos, a forma de promover o contato entre as fases e portanto a transferência de massa, é a

ação da força gravitacional, devido a diferença de densidade entre as fases. São os mais simples extratores diferenciais usados na extração líquido-líquido. Apresentam baixo custo de instalação e manutenção e ocupam reduzido espaço físico. A principal desvantagem é a baixa eficiência de separação.

- Colunas com agitação mecânica e separação pela gravidade, como coluna de discos rotativos (RDC), coluna de fluxo pulsado, coluna de pratos pulsados, coluna "Oldshue-Rushton", coluna "Sheibel" e coluna Kuhni. Nestes extratores, além da força da gravidade, tem-se a ação da agitação causada mecanicamente que pode ser empregada através de pulsações ou sistemas rotativos. Nas colunas agitadas mecanicamente por meio de sistemas rotativos, a força da gravidade atua em conjunto com a energia introduzida por estes sistemas de rotação, que podem ser: discos rígidos ou perfurados, pás, turbinas, etc. O grau de dispersão, e portanto o grau de transferência de massa é bastante elevado em comparação aos equipamentos sem agitação mecânica.
- Contadores centrífugos, que utilizam a força centrífuga como força motriz para transferência de massa. São de desenvolvimento mais recente e possuem alta eficiência de separação e ocupam pouco espaço físico. A desvantagem é o seu alto custo de implantação. São exemplos o extrator Podbielniak, Luwesta e de laval.

A classificação dos equipamentos segundo HANSON (1971) pode ser observada na Tabela 2.1:

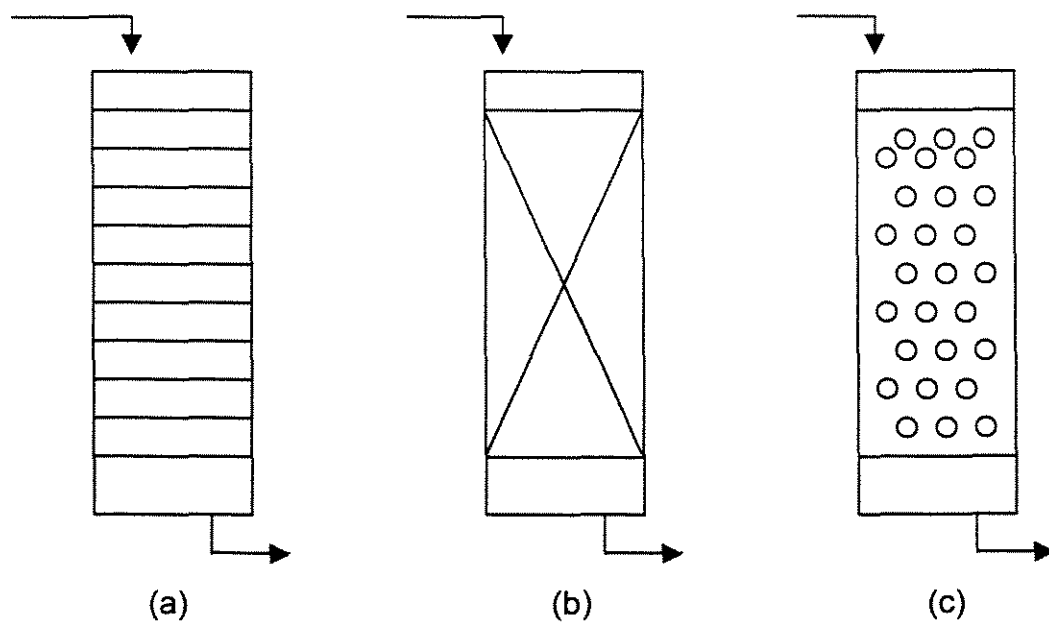


Figura 2.3 – Exemplos de colunas que atuam sob a força da gravidade. (a) coluna de pratos fixos perfurados; (b) coluna recheada; (c) coluna Spray

Tabela 2.1 – Classificação de extração segundo HANSON(1971).

Tipo de Agitação	Contato com Separação de Fases	Contato Contínuo
Sem Agitação		Coluna Spray Coluna de chicanas Colunas recheadas Colunas de pratos perfurados
Agitado pro Rotação	Misturados-decantador simples Misturador-decantador com bomba Centrífuga de estágio individual Misturador-decantador com pulsação	Coluna Sheibel Coluna dOldshue-Rushton Colunas de discos rotativos Coluna misturados multi-estágio
Agitado por Pulsação	Misturador-decantador com pulsação	Coluna recheadas com pulsação Colunas de pratos perfurados Colunas de fluxo pulsado Coluna pratos pulsados

2.12. PROCESSAMENTO CONTÍNUO

A maioria dos processos de extração de partículas biológicas tem sido realizados de modo descontínuo; recentemente, a utilização de processos contínuos tem ganhado um grande impulso, uma vez que o processamento contínuo apresenta inúmeras vantagens (BOLAND, 1990):

- Redução do tempo de processamento: os processamentos de fases aquosas atualmente são muito rápidos. A mistura e o equilíbrio das fases ocorre em alguns minutos quando se utilizam equipamentos adequados. Portanto, a utilização do processo contínuo permite processar rapidamente grandes quantidades de material, com instalações reduzidas em relação à quantidade de material que está sendo processada, resultando numa economia de capital e energia.

- Automação do processo, o que significa redução de custo de mão-de-obra a ser empregada;
- Obtenção de produtos mais homogêneos: a combinação entre processo contínuo e automação mantém o processamento mais constante, com poucas variações e maior uniformidade ao longo da corrida;
- Maior rendimento de produtos lábeis: devido a rapidez do processamento, as perdas de materiais lábeis são minimizadas;
- Possibilidade de reciclagem dos componentes constituintes das fases.

A aplicação de Sistemas Bifásicos Aquosos (SBA) para a purificação em contínuo tem sido demonstrada em vários trabalhos utilizando diferentes sistemas de extração. ALBERTSSON (1986), descreveu a operação de uma unidade Craig, em modo contracorrente, empregando sistemas PEG/Dextrana. KULA et al (1982) pesquisaram a extração de formiato desidrogenase com sistemas PEG/ Sal. HUSTEDT et al (1988) analisaram um processo contínuo em uma coluna Kuhmi, em um extrator Graesser, em uma coluna Podbielniak e em uma unidade misturadora-deantadora usando SBA.

Em operação semicontínua, SAWANT et al (1990), PAṬIL et al (1991) e JAFARABAD et al (1992 a; 1992 b) avaliaram a transferência de massa e a fração retida de fase dispersa para a albumina de soro bovino e para amiloglicosidase. Para a purificação da albumina foram empregadas as colunas tipo Spray e York-Scheibel operando com sistemas PEG/ Dextrana e PEG/Fosfato de potássio, respectivamente. Para a separação da amiloglicosidase, foi utilizado o sistema PEG/Fosfato de sódio nas colunas York-Scheibel e Empacotada.

COIMBRA et al (1994) utilizaram um extrator Graesser para a separação das proteínas α -lactoalbumina e β -lactoglobulina do soro do leite com sistemas

bifásicos PEG/Fosfato e avaliaram a performance do extrator com relação à eficiência de separação e à transferência de massa. (COIMBRA et al 1995). PAWAR et al (1997) analisaram a fração retida da fase dispersa e o coeficiente de transferência de massa em uma coluna Spray modificada utilizando sistema bifásico PEG/Sulfato para a extração de amiloglicosidase e β -galactosidase. Mais recentemente PORTO et al (1997-1999) avaliaram a transferência de massa e a fração retida da fase dispersa para o citocromo b5 e albumina de soro bovino em coluna de discos perfurados rotativos com sistema PEG/ Fosfato de potássio.

2.13. TRANSFERÊNCIA DE MASSA EM SISTEMAS BIFÁSICOS AQUOSOS

Quando um sistema contém dois ou mais componentes cujas concentrações variam de ponto a ponto no sistema, há uma tendência natural à massa ser transferida, minimizando as diferenças de concentração no sistema, já que de acordo com a Segunda lei da termodinâmica, sistemas que não estão em equilíbrio, tendem a alcançar o equilíbrio ao longo do tempo. O transporte de um constituinte de uma região de maior concentração para outra de menor concentração é chamado de “transferência de massa”.

É de fundamental importância no estudo de um processo de extração líquido-líquido ou de um extrator em particular, a avaliação da transferência de massa deste equipamento.

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 no filme líquido interfacial.

O estudo da transferência de massa visa principalmente avaliar o quanto o sistema se aproxima do equilíbrio. Com este estudo, pode-se definir um limite ideal de operação para o extrator.

Em equipamentos de extração líquido-líquido, em contracorrente, a transferência de massa ocorre numa dispersão de gotas que fluem pela gravidade através da fase líquida contínua, sendo o contador de discos rotativos um exemplo destes equipamentos.

A mudança de concentração numa gota, numa dada parte da coluna, é dependente da diferença de densidades, do coeficiente de transferência de massa, da área interfacial e do tempo de contato, sendo que todas essas variáveis dependem do diâmetro das gotas. Segundo HANSON (1968) a transferência de massa ocorre entre a fase contínua e as gotas.

Em sistemas líquido-líquido, o aumento da agitação, inicialmente causa um aumento da área interfacial (através da diminuição no tamanho das gotas) e assim, aumentando a taxa de transferência de massa. Porém, isso não ocorre indefinidamente. Primeiramente, há um limite para o aumento da área interfacial que pode ser obtida. Em segundo lugar, abaixo de um certo tamanho de gotas, estas começam a se comportar como esferas rígidas sem circulação pelo lento processo de difusão molecular. Em terceiro lugar, após um certo ponto, o aumento na agitação pode começar a suprimir a interação gota-gota, reduzindo a mistura na fase dispersa e também a taxa de transferência de massa. Há portanto um grau ótimo de agitação que fornece a taxa de transferência de massa máxima (ROD, 1966).

Segundo HANSON (1968), a coalescência das gotas da fase dispersa numa fase contínua é fundamental para ocorrer a separação das fases. Em geral, quanto menor o tamanho das gotas, mais lenta a coalescência. Quanto menores forem as gotas, maior será a tendência da solução emulsificar.

Em colunas de discos perfurados rotativos, o coeficiente global de transferência de massa pode ser determinado por:

$$N = Kda (C^* - C) V \quad 2.3$$

Em que : N - fluxo de proteína para a fase dispersa(g/s.cm²)

K_{da} - coeficiente global de transferência de proteína

C^* - concentração de proteína na interface em equilíbrio com a fase contínua(g/cm³).

C – Concentração da proteína na fase dispersa(g/cm³).

V – volume da fase contínua.

Considerando que as duas fases são imiscíveis, que a quantidade de soluto transferida entre as fases é pequena, que o coeficiente de partição para a proteína é independente da sua concentração e que o coeficiente de transferência se mantém constante ao longo da coluna, a integração da expressão acima é possível gerando:

$$N = K_{da} \Delta C_{lm} V \quad 2.4$$

Onde ΔC_{lm} representa a média logarítmica da diferença de concentrações entre a interface e a fase dispersa. O balanço material global do soluto na coluna origina:

$$Q(C_{ent} - C_{sai}) = K_{da} \Delta C_{lm} V \quad 2.5$$

Em que Q , C_{ent} e C_{sai} representam, respectivamente, a velocidade de fluxo da fase dispersa, a concentração de proteína na corrente de entrada da fase dispersa, a concentração de proteína na corrente de saída da fase dispersa. Reorganizando a expressão, obtém-se a expressão:

$$K_{da} = Q/V \cdot \ln (C_{ent} - K C_f / C_{sai} - K C_f) \quad 2.6$$

Onde K representa o coeficiente de partição do soluto.

Sabe-se que existem dois aspectos distintos sobre a eficiência de extração a serem considerados: o primeiro costuma diferenciar o comportamento real do ideal; o segundo interpreta a eficiência em termos de mecanismos de

transporte de massa. Baseado nestes aspectos, várias definições de eficiência tem sido propostas.

O desempenho de um contador de discos rotativos com saia perfurada foi estudado por KAWASE (1990) em escala piloto. Os dados obtidos para este equipamento foram examinados usando a correlação proposta para uma coluna de discos rotativos. Foram realizados estudos sobre a eficiência de extração, na qual as concentrações das fases no topo e no fundo da coluna foram medidas. O cálculo da eficiência de extração neste equipamento foi realizado usando a seguinte relação, baseada nas concentrações da fase onde se encontra o soluto.

$$E_k = \frac{C_f - C_r}{C_f} \times 100 \quad 2.7$$

Onde: C_f é a fração mássica de soluto na alimentação e

C_r é a fração mássica de soluto no refinado.

Esta definição representa um índice de recuperação do soluto.

2.14. ASPECTOS ECONÔMICOS

A escolha entre os diferentes métodos de separação é feita de acordo com aspectos econômicos e com as características físicas e químicas dos componentes da mistura a ser separada.

O conhecimento em sistemas bifásicos aquosos e suas habilidades de partição de moléculas biológicas tem sido estudada por mais de 40 anos. Desde então, o interesse nesta área mostrou-se reduzido até os últimos anos, quando uma série de pesquisas tomaram lugar dentro do mundo científico (MATIASSEN & LING, 1987).

A extração de proteínas em sistemas bifásicos aquosos consiste num processo que requer um custo relativamente alto de reagentes. Uma análise econômica da recuperação e purificação da enzima formato desidrogenase a partir

de *Candida biondii* demonstrou que o uso de sistemas bifásicos aquosos possui vantagens econômicas quando comparado a outros métodos. O tempo de operação reduzido, que influi diretamente nos custos de energia, constitui o maior fator do baixo custo operacional da partição com sistemas bifásicos aquosos (CABRAL & AIRES-BARROS, 1993).

O custo operacional, por sua vez, está extremamente relacionado com o tipo e concentração dos polímeros necessários para a formação das fases do sistema e sua capacidade. Conforme mencionado anteriormente, o preço dos polímeros mais empregados, como a Dextrana, é bastante elevado, embora o sistema PEG-Dextrana possua características importantes como a biodegradabilidade, além de reunir uma elevada gama de informações sobre a partição de vários compostos ao longo dos anos. O uso prático da Dextrana apenas seria justificado em casos raros, como na produção de produtos especiais (MATIASSEN & LING, 1987). Para combater este problema, tem-se recorrido ao Hidroxipropilamido, similar a Dextrana e mais econômico.

Apesar do elevado custo associado aos reagentes químicos, KRONER et al (1984) verificaram que esta técnica de extração não deixa de ser competitiva com outras técnicas como a centrifugação, filtração com tambor e filtração com membranas. Estes autores obtiveram, igualmente, um elevado consumo de reagentes, cerca de 53% do custo total, embora estes custos tenham sido compensados pelo baixo custo observado para o consumo energético e para o investimento em equipamento.

Por estes fatos, torna-se fundamental reduzir substancialmente os custos dos reagentes químicos, quer pelo recurso a novos reagentes, quer pela implementação de técnicas de recirculação de reagentes.

2.15 MODELAGEM MATEMÁTICA DE EXTRAÇÃO DIFERENCIAL

A extração diferencial ocorre quando um líquido pesado e um líquido leve estão continuamente em contato em contracorrente. O soluto é transferido de uma fase para a outra, mas nunca é atingida a condição de equilíbrio. O resultado é uma considerável separação do produto, levando-se em conta o pequeno intervalo de tempo de contato entre as fases, que é maior nos misturador-decantador.

A análise da extração diferencial depende de equações principais. As primeiras duas equações são similares as usadas em extração por estágios. Uma é a equação de equilíbrio:

$$x = Ky^* \quad 2.8$$

Onde y^* é a concentração na fase pesada que poderia estar em equilíbrio com a concentração x na fase leve numa dada posição da coluna.

A segunda equação é o balanço de massa que é determinado ao longo da altura da coluna diferencial, partindo do fundo até uma altura z . O resultado é:

$$Hy + L(0) = Hy_0 + Lx \quad 2.9$$

Ou

$$x = \frac{H}{L}(y - y_0) \quad 2.10$$

Onde y_0 é a concentração em $z=0$. Note que ambos x e y são concentrações na posição z na qual não há equilíbrio. Esta equação é chamada linha de operação.

A terceira equação, expressa a taxa de soluto que é transferido da fase pesada para a fase leve. Esta também se baseia no balanço de massa, mas é

escrita somente para a fase pesada. A obtenção desta equação é feita a partir do balanço de massa diferencial feita na fase pesado para um volume $A\Delta z$:

$$\left(\begin{matrix} \text{solute} \\ \text{acumulado} \end{matrix} \right) = \left(\begin{matrix} \text{fluxo} \\ \text{de_saida} \end{matrix} \right) - \left(\begin{matrix} \text{solute} \\ \text{transferido} \end{matrix} \right)$$

Em termos simbólicos, isto pode ser escrito como:

$$0 = -H \left((y|_z - y|_{z+\Delta z}) \right) - rA\Delta z \quad 2.11$$

Dividindo por $A\Delta z$ e aproximando Δz a zero:

$$0 = \left(\frac{H}{A} \right) \frac{dy}{dz} - r \quad 2.12$$

Agora precisamos encontrar uma expressão para a taxa de transferência r .

A taxa de transferência de massa deverá ser proporcional a área superficial por unidade de volume, onde o soluto é transferido mais rapidamente quanto menor for o tamanho da bolha. Esperamos que a taxa seja proporcional a distancia da concentração em relação ao equilíbrio. Portanto, podemos escrever:

$$r = ka(y - y^*) \quad 2.13$$

Onde a é a área superficial por unidade de volume, y^* é a concentração na fase pesada a qual poderia estar em equilíbrio com a concentração x , e k é uma constante, chamada “coeficiente de transferência de massa”. A constante k é como uma constante de taxa de reação.

Combinando a eq 2.12 e eq 2.13, nós encontramos

$$\frac{dy}{dz} = \left(\frac{ka}{H/A} \right) (y - y^*) \quad 2.14$$

Esta é a terceira equação das três equações usadas para a análise de processos de extração diferenciais.

Nós podemos calcular a altura de um extrator diferencial a partir da equação de equilíbrio, da linha de operação e do balanço de massa na fase pesada. Combinado essas equações, e rearranjando o resultado é:

$$l = \int dz \quad 2.15$$

$$l = \frac{(H/A)}{ka} \int_{y_0}^{y_1} \frac{dy}{y - y^*} \quad 2.16$$

$$l = \frac{(H/A)}{ka} \int_{y_0}^{y_1} \frac{dy}{(y - x/K)} \quad 2.17$$

$$l = \frac{(H/A)}{ka} \int_{y_0}^{y_1} \frac{dy}{y - H/LK(y - y_0)} \quad 2.18$$

$$l = \left[\frac{(H / A)}{ka} \right] \left\{ \frac{E}{E-1} \ln \left(\frac{y_1 - x_1 / K}{y_0} \right) \right\} \quad 2.19$$

$$l = [AUT] \{NUT\} \quad 2.20$$

Na literatura da engenharia, a quantidade dentro do colchete, a qual tem a dimensão de um comprimento, é chamado de “Altura de unidades de transferência” ou AUT, é uma medida de eficiência do equipamento. A quantidade contida entre as chaves é adimensional, é chamada de “Número de Unidades de Transferência” ou NUT, é uma medida da dificuldade da separação (BELTER, 1988).

A quantidade E, é chamada de fator de extração, e é dada por:

$$E = \frac{KL}{H} \quad 2.21$$

A equação 2.19 é a base para o projeto de processos de extração líquido-líquido diferencial.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. DESCRIÇÃO E OPERAÇÃO DO EQUIPAMENTO

Um esquema da micro-coluna de campânulas pulsantes é mostrado na figura 3.1. Esta micro-coluna, é constituída de um tubo de acrílico de 30 cm de altura, com diâmetro interno de 2,70 cm em parede de 0,15 cm de espessura.

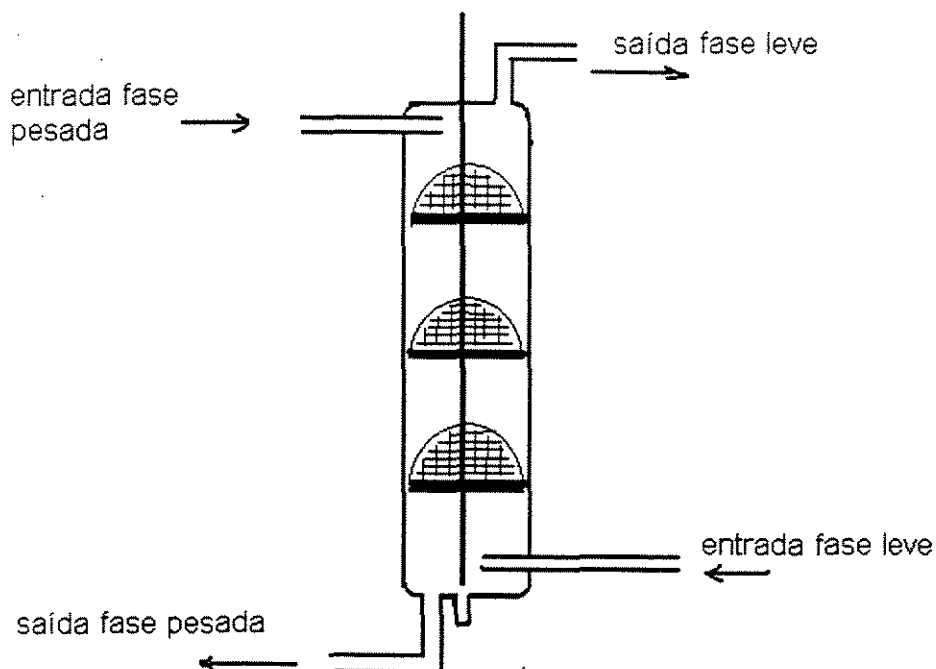


Figura 3.1 – Esquema da micro-coluna de campânulas pulsantes.

No centro da micro-coluna, está localizada uma haste de aço inox, na qual estão coladas três campânulas que estão distanciadas 6cm uma das outras. O diâmetro da base das campânulas é de 2,68 cm. As campânulas são construídas

com uma base de latão e uma peneira de aço de malha MESH 24 e, portanto, possui uma área livre para o escoamento de 38%.

Durante o pulso, a campânula movimenta-se num percurso de 2 cm para baixo e 2cm para cima, o que faz uma amplitude de 4 cm.

Os pulsos são fornecidos por um dispositivo, que proporciona um movimento harmônico controlado por um motor

Os bocais de alimentação e saída são de aço inox e possuem um diâmetro interno de 2,5 mm e um diâmetro externo de 3 mm. Tanto as conexões da base, como do topo da micro-coluna são de Teflon.

A alimentação na coluna de cada fase, tanto a leve como a pesada é feita através de duas bombas peristálticas independentes, previamente calibradas.

Os tubos que conduzem as entradas e saídas das fases são de silicone, com diâmetro interno de 2 mm. Os tubos de silicone, além de serem muito flexíveis, são compatíveis com as soluções utilizadas.

Os experimentos ocorrerão com temperaturas na faixa de 19 °C a 23 °C.

3.1.1. Procedimentos de Operação da Micro-Coluna

Para operação da micro-coluna, com a finalidade de obter-se dados relativos à hidrodinâmica, transferência de massa e eficiência, segue o procedimento a seguir.

Primeiro, enche-se a micro-coluna com a fase contínua, ou seja, a fase rica em Sal, que neste caso é a fase pesada. Em seguida, coloca-se em operação a bomba peristáltica com alimentação da fase pesada, ajustando-se a vazão de entrada e saída. Após o ajuste da vazão, aciona-se o sistema de pulsação e ajusta-se a sua frequência no valor desejado.

Posteriormente, coloca-se em operação a bomba peristáltica que alimenta a fase dispersa, que é a fase leve(fase rica em PEG), iniciando sua alimentação com a vazão desejada. O controle de vazão da saída da fase leve, é feita em

nível, ou seja, sua saída é feita quando esta completa o espaço na micro-coluna relativo a sua coalescência e decantação da fase pesada que possa ter sido arrastada na operação.

Após o início da alimentação da fase leve, anota-se o tempo até que esta comece a sair da coluna, onde tem-se então efetivamente o início de operação do equipamento. Quando do início da saída da fase leve, começa-se a contagem de tempo de operação da micro-coluna. O tempo de operação foi inicialmente de 40 min, quando se pode definir o tempo em que o sistema entrava em regime permanente(estado estacionário), para as condições de operação definidas neste trabalho. Posteriormente, para os ensaios de transferência de massa e eficiência este tempo foi reduzido a 30 min de operação efetivamente, sendo que o estado estacionário é atingido com menos de 20 min.

No estado estacionário, as concentrações de saída das duas fases praticamente não variam com o tempo, havendo sim pequenas oscilações, o que ocorre normalmente nos sistemas reais. Num sistema em regime permanente, teoricamente as concentrações não variam com o tempo, ou seja, em sistemas que trabalham muito próximos dos sistemas ideais.

Durante a operação do equipamento são feitas coletas periódicas de amostras nas saídas das fases leve e pesada da micro-coluna, para posterior análise de proteína total e atividade enzimática. São feitas também medidas de vazões, através da coleta de um volume conhecido num determinado período de tempo. Com esses dados pode-se conhecer tanto o comportamento das concentrações, como das vazões ao longo do tempo de operação.

As fases contínua(pesada) e dispersa(leve) entram em contato no interior da micro-coluna, onde ocorre a transferência de soluto entre as fases. As fases que deixam a coluna são: extrato que é constituído principalmente por solvente e o soluto extraído(neste caso, a saída da fase leve), e a fase refinado, que é rica no meio de alimentação e do soluto não extraído.

3.1.2. Variáveis Estudadas

Neste trabalho, são analisadas as influências de algumas variáveis de operação sobre a transferência de massa e hidrodinâmica da micro-coluna, possibilitando a identificação das melhores condições de operação do sistema.

Na Tabela 3.1, são apresentadas as variáveis que são avaliadas na operação do equipamento e seus valores

Tabela 3.1 – Variáveis estudadas na operação da Micro-coluna

	Valor mínimo	Valor máximo
Razão entre as fases	0,8	1,1
Frequência de pulsos(pulso/min)	33	43

Nos experimentos em descontínuo, variou-se a composição, pH e peso molecular do sistema de duas fases aquosas a fim de se encontrar as melhores condições termodinâmicas(coeficiente de partição), de extração. Foram estudadas duas linhas de amarração, dois níveis de pH e dois pesos moleculares de PEG.

Com o objetivo de estudar a influência das vazões e da frequência de pulso das campânulas na transferência de massa da coluna, trabalhou-se com um peso molecular, um pH e uma linha de amarração definidos.

3.3. PREPARO DE AMOSTRA E SOLUÇÕES

3.3.1. Preparo de Amostra de Caldo

O trabalho experimental foi conduzido no Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Engenharia Industrial - FEI. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico. As amostras foram preparadas com abacaxi de diversos tipos, encontrados em mercados e exceto a coroa, foram triturados e filtrados eliminando as fibras, e armazenados, à temperatura de -18°C . Para os ensaios as amostras foram descongeladas e utilizadas no mesmo dia. Caso a quantidade de amostra descongelada não fosse utilizada, era novamente congelada.

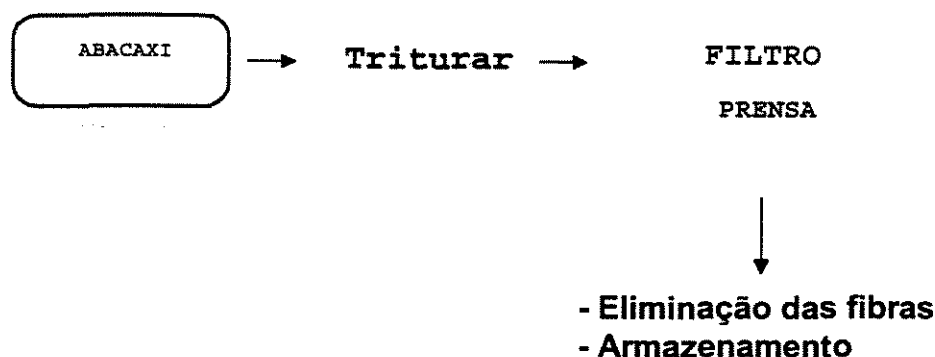


Figura 3.2: Preparo da amostra

3.3.2. Preparo das Soluções Estoques

Os ensaios foram realizados a partir de soluções estoques concentradas de PEG e tampão fosfato para facilitar a preparação dos sistemas bifásicos.

a) Solução estoque de tampão fosfato pH 7, com concentração de 40 % p.

Pesaram-se 14 g de fosfato de potássio monobásico e 26 g de fosfato de potássio dibásico que foram dissolvidos em 60 g de água deionizada. Em seguida verificou-se o pH da solução.

b) Solução estoque de tampão fosfato pH 9, com concentração de 40 % p.

Pesaram-se 1,67 g de fosfato de potássio monobásico e 38,33 g de fosfato de potássio dibásico que foram dissolvidos em 60 g de água destilada. Em seguida verificou-se o pH da solução.

c) Solução estoque de PEG, com concentração 50% p para PEG de peso molecular 1500 e 4000.

Pesaram-se 50 g de PEG (1500, 4000) que foram dissolvidos em 50 g de água deionizada.

3.4. EXTRAÇÃO EM DESCONTÍNUO

Os sistemas foram preparados a partir de soluções estoque de PEG e fosfato. Esses sistemas foram preparados, pesando-se em tubo de centrifuga graduado de 15 mL, a quantidade de solução estoque de cada componente necessária para a obtenção da composição desejada. Em seguida foram adicionados 1g de caldo de abacaxi e, por fim, a quantidade de água para atingir 5g de sistema.

Depois de preparados, os sistemas foram agitados em vórtice por 45 s e em seguida, centrifugados a 1.000xg por 5 minutos, para atingir a separação das fases mais rapidamente.

Posteriormente, foram retiradas alíquotas das fases superior e inferior, com o auxílio de uma pipeta automática, para a determinação da atividade enzimática e proteína total.

A figura 3.3. mostra a rotina dos ensaios.

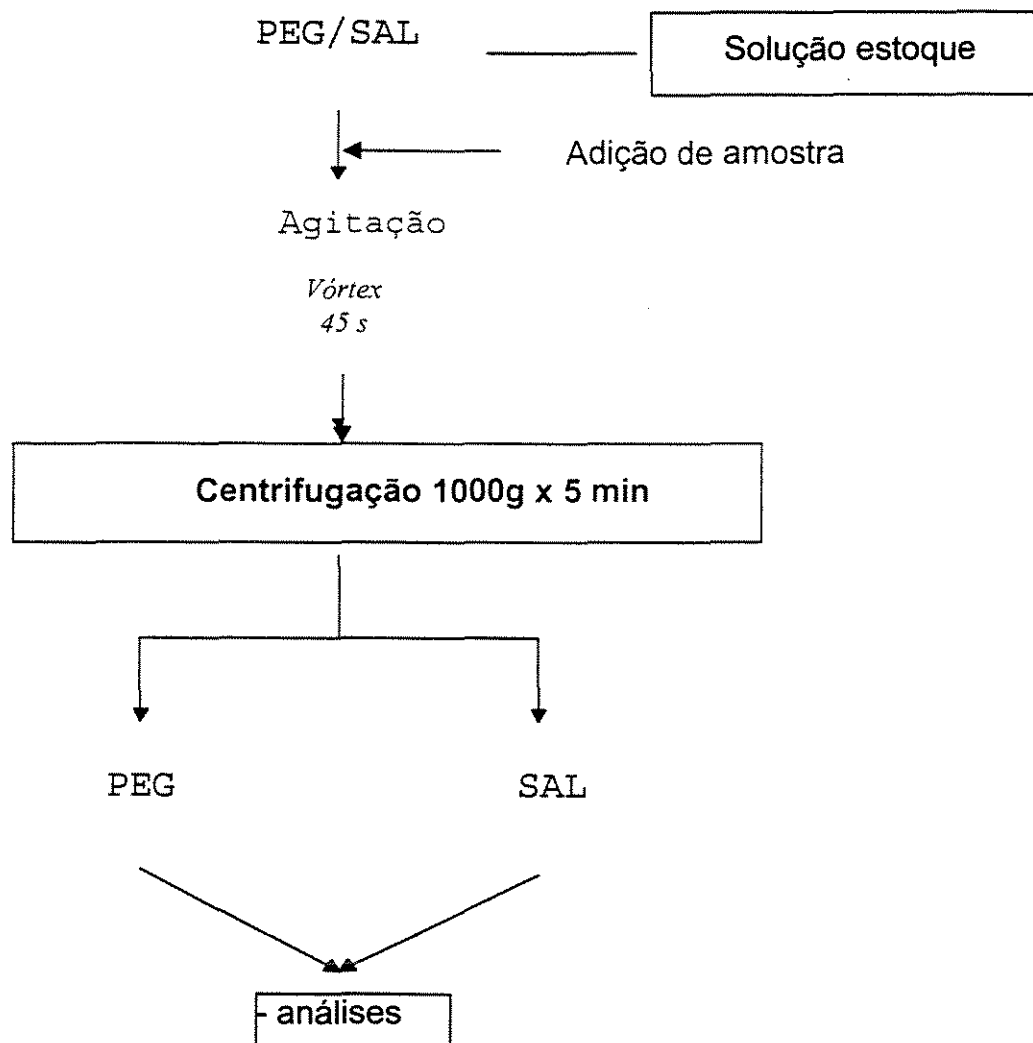


Figura 3.3: Esquema da extração

3.5. MÉTODOS ANALÍTICOS

3.5.1. Determinação de Proteína Total

O método de BRADFORD (1976) foi utilizado para determinar a concentração de proteínas totais presentes nas duas fases. Este método baseia-se na ligação da substância Coomassie Brilliant Blue G-250 com a proteína, formando um complexo colorido que possui máxima absorção de cor na faixa de 465 a 595 nm.

O reativo foi preparado dissolvendo-se 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 em 50 mL de etanol a 95% sob vigorosa agitação. A esta solução adicionaram-se 100 mL de ácido fosfórico a 85% e diluiu-se com água destilada até o volume final de 1 L.

Procedimento:

Em um tubo de ensaio colocam-se 100 µL da amostra e 5 mL do reativo. Agitou-se o tubo em vórtice e foi deixado em repouso por 5 minutos. Em seguida, leu-se a absorbância das amostras a 595 nm. O branco foi preparado com água destilada. Para os cálculos da concentração de proteína, fez-se uma curva de calibração utilizando soluções de albumina bovina (BSA) com concentrações variando de 100 a 1000mg/L.

3.5.2. Determinação da Atividade Enzimática

A atividade proteolítica foi determinada pelo método descrito por MURACHI (1970) e BALDINI *et. al.* (1993) através da hidrólise enzimática da caseína a 1,2% (p/v) pH 6,0 a 35°C durante 10 minutos, seguindo-se de precipitação do substrato não hidrolisado com solução de ácido tricloroacético (TCA). No branco, a adição de solução de TCA foi feita antes da adição da enzima. A quantidade de produtos hidrolíticos não precipitados, ou seja, de peptídeos solúveis em TCA foi determinada a 280 nm contra um branco.

Uma unidade de atividade enzimática corresponde a quantidade de enzima capaz de variar em uma unidade a leitura de absorbância a 280 nm, durante 10 min a 35°C.

A atividade específica foi expressa como unidades de enzima por mg de proteínas.

3.6. METODOLOGIA DE CÁLCULO

Coefficiente de Partição

$$Kp = \frac{P_{topo}}{P_{fundo}} \quad 3.1$$

e:

$$K_a = \frac{A_{topo}}{A_{fundo}} \quad 3.2$$

A_{topo} é a atividade enzimática da fase superior (U/mg de proteína)

A_{fundo} é a atividade enzimática da fase inferior (U/mg de proteína)

P_{topo} é a concentração de proteínas totais na fase superior (mg/L)

P_{fundo} é a concentração de proteínas totais na fase inferior (mg/L)

Atividade Específica

A atividade específica foi calculada pela equação:

$$A_e = \frac{A}{P} \quad 3.3$$

Onde: A é atividade enzimática.

P é a concentração de proteínas totais (mg/L)

3.7. PLANEJAMENTO FATORIAL

Como estão sendo levadas em consideração, três variáveis: concentração das fases, pH e peso molecular do PEG, utilizou-se o planejamento denominado 2^3 , onde três variáveis são analisadas em dois níveis.

Para realizarmos este estudo, precisamos definir a matriz de planejamento listando os ensaios em uma ordem padrão. Todas as colunas começam com o nível (-) e depois os sinais vão-se alternando, um a um na primeira coluna, depois dois a dois e finalmente quatro sinais positivos e quatro negativos. A Tabela 3.2 apresenta as variáveis estudadas no sistema descontínuo e seus níveis.

Tabela 3.2 Variáveis estudadas nos ensaios em batelada

Fatores	Nível (-)	Nível (+)
Concentração	17,5/17,5	15/15
pH	7	9
Massa Molecular PEG	1500	4000

Como o planejamento é $2^3 = 8$ ensaios, no mínimo.

Desvio Padrão Amostral

O desvio padrão (s) foi calculado através da equação:

$$s = \left\{ 1/(N-1) \left[\sum (x_i - \bar{x})^2 \right] \right\}^{1/2} \quad 3.4$$

Onde:

x_i

é a grandeza medida

$\bar{x}$

é a média entre os resultados obtidos.

Desvio Padrão dos Efeitos

O desvio padrão para os efeitos é calculado por:

$$S_{\text{efeito}} = (s^2/2)^{1/2} \quad 3.5$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos capítulos anteriores, foram abordados a teoria envolvida no processo estudado, os materiais e métodos usados no trabalho e os cálculos realizados.

Este capítulo apresentará os resultados obtidos experimentalmente e as tendências observadas no comportamento do sistema.

4.1. EXTRAÇÃO DESCONTÍNUA

A metodologia do planejamento experimental (BRUNS et al,1996) é aplicada a fim de verificar-se a influência de cada variável e da interação entre as variáveis no comportamento do sistema. A extração com sistemas de duas fases aquosas vem sendo estudada como uma promissora técnica para separação de proteínas e enzimas.

Nos ensaios de extração em descontínuo, avalia-se o coeficiente de partição da proteína e da atividade específica indicando quais são as melhores condições de partição para as proteínas do sistema e para a enzima em estudo.

4.1.1. Partição das Proteínas

A extração é estudada a fim de encontrar-se as condições relativas ao sistema de duas fases aquosas, que permitem a obtenção dos melhores resultados de extração. As condições analisadas são: comprimento da linha de amarração (concentração de PEG e sais – fosfatos de potássio), massa molecular do polímero (PEG – polietileno glicol), e pH.

O material estudado é o caldo do abacaxi, que contém bromelina e outras proteínas e enzimas. O objetivo é a obtenção do sistema ideal para obter-se a bromelina com maior grau de purificação.

Foram definidas quatro linhas de amarração, dois níveis de pH e dois valores de massa molecular do polímero.

As linhas de amarração foram estudadas duas a duas, variando juntamente com os dois níveis do pH e da massa molecular do polímero.

4.1.1.1. Linha de amarração 17,5/17,5% p/p e 15/15 %p/p – VARIAÇÃO 1

Primeiramente foram analisadas as linhas de amarração de 17,5/17,5%p/p e 15/15%p/p, onde a concentração global de componentes variam proporcionalmente, aumentando apenas o comprimento da linha de amarração, e variando-se todos estes fatores foram calculados os efeitos, a partir do coeficiente de partição da proteína.

Tabela 4.1 - Discriminação dos efeitos e níveis para Variação 1

Efeito		(-)	(+)
1	Linha de amarração	15/15	17.5/17.5
2	pH	7	9
3	M PEG	1500	4000

Tabela 4.2 - Valores dos efeitos mais significativos para Variação 1

Efeito	Interação $\pm$ eq.3.5
1	-1,813 $\pm$ 1,86
2	0,037 $\pm$ 1,86
3	1,7095 $\pm$ 1,86
12	-0,742 $\pm$ 1,86
13	-0,0535 $\pm$ 1,86
23	2,676 $\pm$ 1,86
123	3,243 $\pm$ 1,86

Os valores indicam que a linha de amarração não é um efeito significativo, pois a concentração de PEG e sal é a mesma no sistema, porém verifica-se que a massa molecular do polímero combinada com a variação de pH produzem um efeito significativo, além da interação entre os três fatores que gera o melhor resultado.

Conforme podemos observar na figura 4.1, aumentando-se o pH consequentemente deve-se aumentar o peso molecular do PEG a fim de obter-se a melhor partição. O aumento do coeficiente de partição com o aumento da linha de amarração pode ser atribuído a mudança na composição das fases (RABELO,1999). Apresentamos uma comparação das linhas de amarração e os melhores resultados de partição de proteínas, praticamente coincidiram nas linhas de amarração estudadas, mostrando que não houve mudança significativa na partição das proteínas com o aumento da linha de amarração. Isso pode ser atribuído a não ter havido mudança na composição relativa entre as fases .

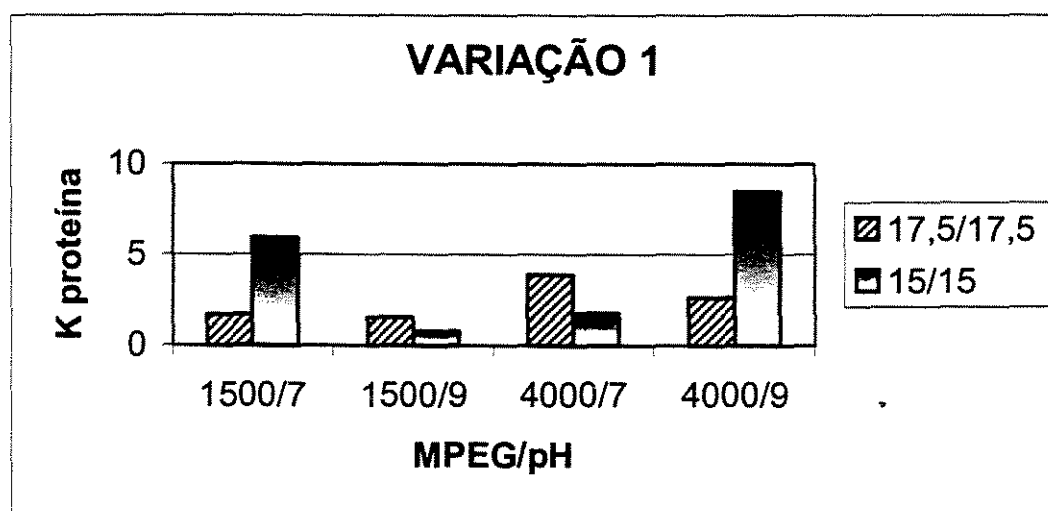


Figura 4.1 - Comportamento do coeficiente de partição para variação 1

4.1.1.2. Linha de amarração 15/17,5 % p/p e 17,5/15 % p/p – Variação 2

Neste item foram analisadas as linhas de amarração de 15/17,5 p/p e 17,5/15p/p, onde a concentração global de componentes varia aumentando, em

uma linha de amarração a fase PEG, e na outra a fase sal. O comprimento da linha de amarração também é alterado, e variando-se todos estes fatores foram calculados os efeitos, a partir do coeficiente de partição da proteína.

Tabela 4.3 - Descrição dos níveis e efeitos para variação 2

Efeito		(-)	(+)
1	Linha de amarração	15/17,5	17.5/15
2	pH	7	9
3	M PEG	1500	4000

Tabela 4.4 - Valores dos efeitos para Variação 2

Efeito	Interação $\pm$ Eq.3.05
1	-1.116 $\pm$ 0,698
2	-0.86 $\pm$ 0,698
3	0.758 $\pm$ 0,698
12	0.771 $\pm$ 0,698
13	-0.013 $\pm$ 0,698
23	-0.29 $\pm$ 0,698
123	0.3148 $\pm$ 0,698

Neste caso, o efeito que apresenta-se como o mais significativo é a linha de amarração. Pode-se dizer que para que haja variação significativa no comprimento da linha de amarração, deve ocorrer uma mudança significativa na concentração entre as fases.

O aumento da massa molecular do polímero aumenta a seletividade do sistema porém diminui o valor do coeficiente de partição da proteína, favorecendo a fase sal. Na Tabela 4.5 , podemos perceber que aumentando-se o peso molecular do polímero, a linha de amarração que apresenta um melhor valor para K é a menos concentrada na fase salina.

Com o aumento do pH, ocorrem mudanças na distribuição de cargas da proteína. Em baixos valores de pH ocorre aumento da carga positiva e em altos valores de pH, da carga negativa. Além disso, aumentando o pH, a concentração do ânion HPO_4^{2-} aumenta em relação ao ânion H_2PO_4^- , aumentando o efeito do "salting out".

Tabela 4.5 - Comportamento do coeficiente de partição para variação 2 em pH 7

pH 7	Massa Molecular	
	1500	4000
Linha de Amarração		
15/17,5	2,528	1,497
17,5/15	0.969	0.851

O aumento do coeficiente de partição com o aumento do comprimento da linha de amarração pode ser atribuído a mudança na composição relativa entre as fases. Um aumento do comprimento da linha de amarração promove um aumento de concentração de fosfato na fase inferior enquanto que na fase superior ela permanece relativamente constante e igual à sua solubilidade limite no PEG. Isso provoca um " salting out" de proteínas da fase rica em sal (fosfato de potássio) para a fase rica em PEG, mediada pelos efeitos do volume excluído do PEG. (RABELO, 1999).

A solubilidade das proteínas em soluções de PEG tem sido interpretada por vários autores em termos do efeito do volume excluído do polímero (POLSON et al, 1964). Segundo a teoria desenvolvida, as proteínas são excluídas

estericamente de regiões do solvente ocupadas pelo polímero, sendo que as solubilidades são proporcionais ao volume de solvente disponível (solvente sem PEG). Portanto, quanto maior for o volume excluído do PEG, menor é o volume de solvente disponível, o que significa uma diminuição do coeficiente de partição (PORTO, 1998).

A influência da massa molecular do polímero está relacionada também a massa molecular da proteína. Foi observado que a partição de aminoácidos ou proteínas de baixa massa molecular não é muito influenciada por variações na massa molecular dos polímeros. Contudo, com proteínas de maior massa molecular, a partição é mais influenciada pela variação da massa molecular dos polímeros formadores das fases (ALBERTSSON, 1986). Proteínas com alta massa molecular são mais influenciadas por variações na massa molecular dos polímeros do que proteínas de pequena massa molecular.

A alteração da massa molecular do PEG pode provocar variações na composição das duas fases em equilíbrio, como alterações no diagrama de fases, influenciando a partição de biomateriais.

4.1.2. Partição para Atividade Enzimática Específica

A extração é estudada a fim de encontrar-se as condições relativas ao sistema de duas fases aquosas, que permitem a obtenção dos melhores resultados de extração. As condições analisadas são as mesmas que para a partição de proteínas.

Estudou-se o comportamento desta variável pois é um indicador do grau de purificação obtido na partição da atividade enzimática em relação às proteínas totais no sistema, indicando possivelmente a concentração de bromelina em cada uma das fases.

As linhas de amarração, variáveis e níveis foram estudados como no item anterior.

4.1.2.1. Linha de amarração 17,5/17,5%p/p e 15/15%p/p – VARIAÇÃO 1A

Primeiramente foram analisadas as linhas de amarração de 17,5/17,5 p/p e 15/15p/p, onde a concentração global de componentes não varia, apenas o comprimento da linha de amarração, e variando-se todos estes fatores foram calculados os efeitos, a partir do coeficiente de partição para a atividade específica da proteína.

Tabela 4.6 - Discriminação dos efeitos e níveis para Variação 1A

Efeito		(-)	(+)
1	Linha de amarração	15/15	17.5/17.5
2	pH	7	9
3	M PEG	1500	4000

Na análise da partição da atividade enzimática específica foram obtidos os resultados apresentados na tabela 4.7.

Tabela 4.7 - Efeitos e interações para a Variação 1A.

Efeito	Interação $\pm$ Eq 3.06
1	-0,2808 $\pm$ 0,2068
2	-0,1628 $\pm$ 0,2068
3	0,1574 $\pm$ 0,2068
12	0,1144 $\pm$ 0,2068
13	-0,2039 $\pm$ 0,2068
23	-0,2244 $\pm$ 0,2068
123	0,2536 $\pm$ 0,2068

A interação entre todos os efeitos estudados é o melhor resultado que podemos obter. Os efeitos isolados podem ser desprezados, porém a interação entre eles influi significativamente na partição para a atividade específica. A figura 4.2, ilustra a influência destes parâmetros.

Na mesma linha de amarração o aumento do pH, diminui o efeito para a partição, efeito esse que pode ser explicado pelo aumento da proporção H_2PO_4^- / HPO_4^{2-} . Segundo SARUBBO (2000), o ânion monovalente é menos efetivo no "salting out" do PEG.

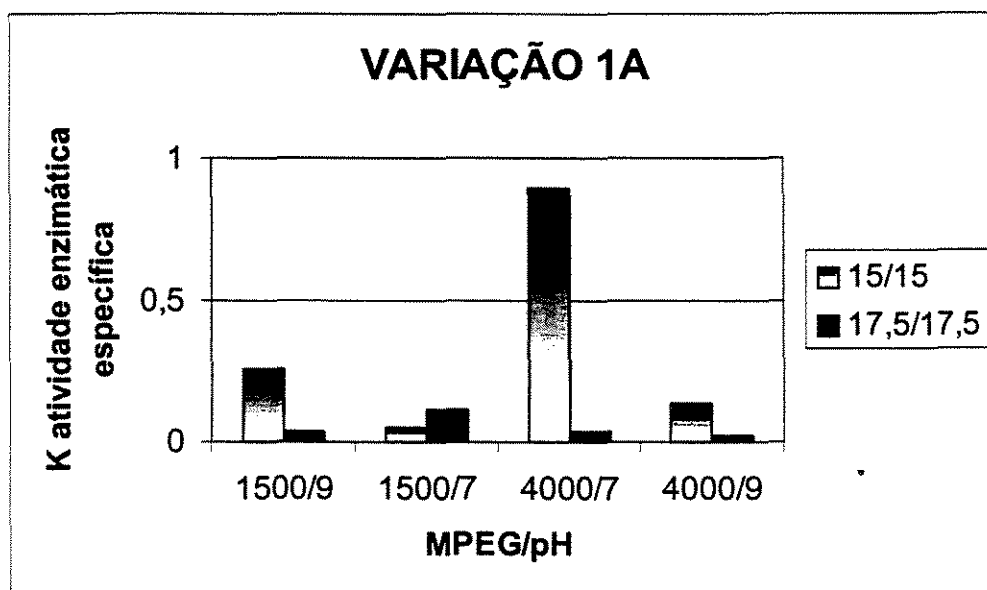


Figura 4.2 - Comparação das linhas de amarração na Variação 1A

O efeito da massa molecular do polímero pode ser atribuído ao maior número de grupos hidrofílicos terminais nas cadeias de PEG mais curtas, o que reduz a hidrofobicidade global e aos efeitos de volume excluído, que aumentam com o aumento da massa molecular do polímero(SARMENTO, 1994; HUDDLESTON, 1991).

Apresentamos uma comparação das linhas de amarração e os melhores resultados de partição de proteínas praticamente coincidiram nas linhas de amarração estudadas, mostrando que não houve mudança significativa na partição da atividade enzimática , exceto na situação de pH mais baixo e mais alto peso onde nitidamente vemos que a linha de amarração menos concentrada é a favorecida.

O PEG de maior massa molecular tende a ser mais seletivo que é de interesse quando estudarmos a purificação de uma enzima que tem em seu substrato, contaminantes como outras proteínas e enzimas.

4.1.2.2. Linha de amarração 15/17,5 % p/p e 17,5/15 % p/p – Variação 2A

Neste item foram analisadas as linhas de amarração de 15/17,5 % p/p e 17,5/15 % p/p, onde a concentração global de componentes varia concentrando, em uma linha de amarração a fase PEG, e na outra a fase sal. O comprimento da linha de amarração também é alterado, e variando-se todos estes fatores foram calculados os efeitos, a partir do coeficiente de partição da atividade enzimática, da mesma forma que anteriormente para a proteína.

Tabela 4.8 - Descrição dos níveis e efeitos para variação 2A

Efeito		(-)	(+)
1	Linha de amarração	15/17,5	17.5/15
2	pH	7	9
3	M PEG	1500	4000

Tabela 4.9 - Valores dos efeitos para Variação 2A.

Efeito	
1	$-0,3062 \pm 0,2916$
2	$0,448 \pm 0,2916$
3	$-0,1557 \pm 0,2916$
12	$-0,5139 \pm 0,2916$
13	$-0,0431 \pm 0,2916$
23	$0,0049 \pm 0,2916$
123	$0,1034 \pm 0,2916$

O aumento da linha de amarração aliada à variação no pH denota um maior grau de purificação. Na figura 4.4 , podemos perceber que aumentando-se o peso molecular do polímero, a linha de amarração que apresenta um melhor valor para K é a mais concentrada na fase salina, pois esta deve ser rapidamente saturada pelos materiais solúveis que estão contidos no caldo do abacaxi facilitando o efeito do “salting out” da enzima.

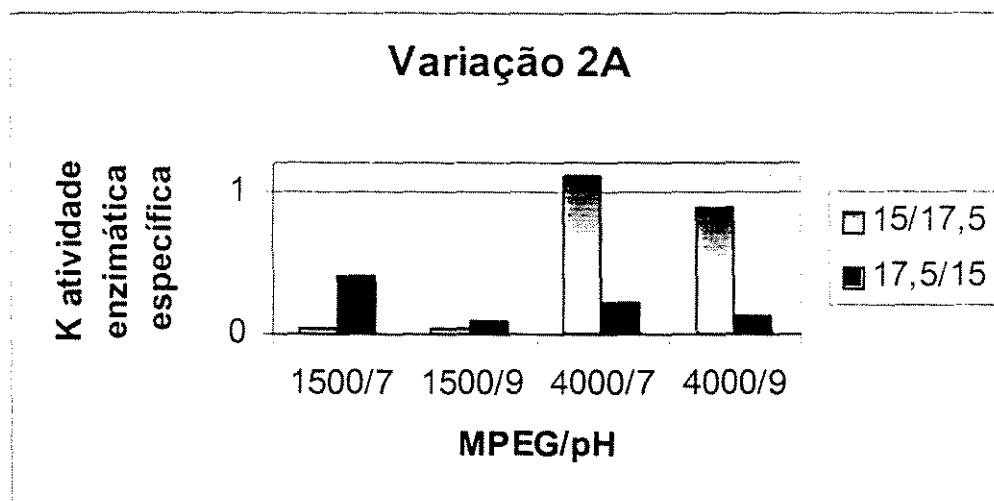


Figura 4.3 – Comparação das linhas de amarração na Variação 2A

A solubilidade das proteínas em soluções de PEG tem sido interpretada por vários autores em termos do efeito do volume excluído do polímero (POLSON et al, 1964). Podemos perceber que em relação à partição para a atividade específica da bromelina a fase PEG é favorecida, aumentando então o valor do seu coeficiente de partição.

4.2. EXTRAÇÃO CONTÍNUA UTILIZANDO UMA MICRO-COLUNA DE CAMPÂNULAS PULSANTES

A seleção de sistemas de extração líquido-líquido para aplicações em larga escala implica o recurso de regras convencionais bem definidas em processo de engenharia química: diferenças de densidade entre as fases superiores a 5% são desejáveis, a viscosidade de ambas as fases devem ser inferiores a 10 mPas e a tensão superficial deve situar-se entre 1 a 50 mPam. Estas condições são desejadas para a formação de uma dispersão de fases adequada (CUSACK et al., 1991). Os SBA possuem propriedades físicas que os tornam diferentes dos sistemas convencionais orgânicos-aquosos empregados em engenharia química. Nos sistemas aquosos, a fase pesada exibe valores de viscosidade superiores a 10 mPas e tensão interfacial é superior a 1 mPam. A diferença de densidade entre as fases constitui o único parâmetro que se encontra dentro dos limites referidos anteriormente.

Apesar das dificuldades, os sistemas bifásicos têm sido aplicados com sucesso a processos de extração líquido-líquido em larga escala. De modo geral, as colunas de extração, pela sua simplicidade de construção e operação, constituem uma alternativa atrativa quando se deseja misturar, equilibrar e separar duas fases líquidas imiscíveis. A grande vantagem no recurso das colunas é a eliminação do emprego de dispendiosas centrífugas, uma vez que a separação de fases é promovida pela gravidade.

Para os ensaios de extração em contínuo foi utilizado o sistema PEG1500 e fosfato de potássio em pH 7, nas concentrações globais de 17,5%peso e 17,5%peso respectivamente, o sistema foi escolhido por se tratar de um sistema que além da disponibilidade de material, suas características e propriedades já foram amplamente estudadas (RABELO,1999).

4.2.1. Planejamento de Ensaios

Para a investigação da influência dos parâmetros de operação da micro-coluna, foi utilizada a metodologia de planejamento fatorial, onde a definição de cada ensaio é apresentada abaixo, e os efeitos e seus níveis estão representados na tabela 4.9.

Ensaio tipo E1

Relação entre as vazões das fases leve e pesada(RV): 1,1

Frequência de pulsação das campânulas perfuradas(FP): 43 pulsos/min

Ensaio tipo E2

Relação entre as vazões das fases leve e pesada: 1,1

Frequência de pulsação das campânulas perfuradas: 33pulsos/min

Ensaio tipo E3

Relação entre as vazões das fases leve e pesada: 0,8

Frequência de pulsação das campânulas perfuradas: 33pulsos/min

Ensaio tipo E4

Relação entre as vazões das fases leve e pesada: 0,8

Frequência de pulsação das campânulas perfuradas: 43pulsos/min

A combinação, ou seja, o efeito combinado das variáveis é representado pela Tabela 4.10.

Tabela 4.10 - Descrição dos níveis efeitos.

Efeito		(-)	(+)
1	Razão entre a vazão das fases	0,8	1,1
2	Frequência de pulso(Pulso/min)	33	43

4.2.2 Efeito da Razão entre as vazões das fases (RV) e da Frequência da pulsação (FP) das Campânulas na Porcentagem de Recuperação de Proteína Total com Bromelina P.A.

Para uma primeira investigação das influências dos parâmetros de operação da micro-coluna, foi utilizada *Bromelina P.A.* solubilizada na fase salina. Este procedimento permite num primeiro momento, localizar condições mais adequadas de operação da coluna e determinar faixas de variação das variáveis independentes avaliadas nesse processo.

Pode se observar através da tabela 4.10, que o resultado mais significativo é o da interação entre os efeitos, e que aumentando-se a razão entre as fases, ou aumentando-se a frequência de pulso há um aumento na porcentagem de recuperação.

Tabela 4.11 - Efeitos calculados para porcentagem de recuperação de proteína total.

Efeito	
Média	94,4
1	2,1
2	1,8
12	5,6
erro	1,1

4.2.3. Efeito da Razão entre as vazões das fases (RV) e da Frequência da pulsação (FP) das Campânulas na Recuperação de Proteína Total.

A necessidade de desenvolver sistemas mais econômicos e aplicáveis em processos de larga escala torna também a coluna de campânulas pulsadas uma candidata com atrativos, quando se deseja estudar a sua capacidade de recuperação de proteínas a partir de uma solução inicial. Assim fica claro a importância de um estudo da influência das variáveis independentes na recuperação da proteína total.

A tabela 4.12 mostra os resultados encontrados para porcentagem de recuperação de proteína total nos ensaios realizados, sendo que o ensaio E4 é realizado em triplicata, e o valor para este ensaio corresponde a média obtida na triplicata.

A tabela 4.13 apresenta o cálculo do efeito de cada variável e do efeito combinado de ambas na recuperação da proteína total.

Podemos observar na tabela 4.12 que os resultados encontrados para recuperação da proteína a partir da solubilização do precipitado do caldo de abacaxi, apresentam resultado satisfatório para recuperação de proteína total, 60% em média.

Na tabela 4.13 observamos que o efeito mais significativo é a relação entre as vazões das fases leve e pesada, quanto maior esta relação, ou seja, quanto maior a vazão da fase leve, maior será a recuperação de proteína, como era esperado. Vemos também que a frequência de pulsação não é significativa para a faixa de trabalho e que a combinação dos efeitos não é também tão significativa.

Tabela 4.12 - Porcentagem de recuperação de proteína total

	RV	FP	%Rec. PT
E3	0,8	33	60,10
E4	0,8	43	55,63
E2	1,1	33	66,50
E1	1,1	43	70,00
Média			60,06

Tabela 4.13 - Cálculo dos efeitos para recuperação da proteína total

Efeito	
(1)RV	10,385
(2)FP	-0,97
12	7,97
erro	6,01

4.2.4. Efeito da Razão entre as vazões das fases (RV) e da Frequência da pulsação (FP) das Campânulas na Recuperação da Atividade da *Bromelina*.

O efeito das variáveis independentes do equipamento na recuperação da atividade enzimática foi avaliado também pelos ensaios propostos no planejamento experimental, em se tratando de enzimas, a porcentagem de recuperação de atividade enzimática nos apresenta a capacidade de seletividade do sistema empregado na separação e recuperação.

A tabela 4.14 mostra o resultados encontrados para porcentagem de recuperação de atividade enzimática nos ensaios realizados, sendo que o ensaio E4 é realizado em triplicata, e o valor para este ensaio corresponde a média obtida na triplicata.

A tabela 4.15 apresenta o cálculo do efeito de cada variável e do efeito combinado de ambas na recuperação da atividade.

Podemos observar tabela 4.14 que os resultados encontrados para recuperação da atividade a partir da solubilização do precipitado do caldo de abacaxi, apresentam excelentes resultado para recuperação de atividade enzimática, o que mostra uma grande eficiência do processo na recuperação da *bromelina*.

Na tabela 4.15 observamos que ambos os efeitos das variáveis independentes são significativos, e que o aumento da relação entre as vazões das fases leve e pesada, aumenta a recuperação da *bromelina*. Mas na frequência de pulsação das campânulas esse é efeito é praticamente o dobro. Vemos que o efeito combinado das variáveis não é significativo neste estudo.

Tabela 4.14 - Porcentagem de recuperação de atividade enzimática

	RV	FP	atividade
E3	0,8	33	38,52
E4	0,8	43	59,72
E2	1,1	33	59,7
E1	1,1	43	74,05
Média			57,99

Tabela 4.15 - Cálculo dos efeitos para recuperação de atividade enzimática

Efeito	
(1)RV	17,755
(2)FP	35,55
12	-6,85
erro	9,06

4.2.5. Efeito da Razão entre as vazões das fases (RV) e da Frequência da pulsação (FP) das Campânulas no Coeficiente de Transferencia de Massa.

O estudo da transferência de massa no interior de colunas de extração líquido-líquido é de fundamental importância para o conhecimento dos seus limites de operação.

Quando duas fases imiscíveis estão em contato na extração em contracorrente, o tamanho e a quantidade de gotas que surgem na zona de contato são governadas principalmente pela velocidade das fases e pela frequência do pulso das campânulas, neste estudo pretendemos avaliar a influência de cada variável independente.

Uma baixa frequência resulta em grandes gotas, proporcionando pequenas áreas interfaciais e baixa transferência de massa. Uma alta frequência de pulso permite a formação de pequenas gotas esféricas, levando a altas taxas de transferência de massa devido ao aumento da área interfacial (STRAND et al., 1962).

Tabela 4.16 - Coeficiente de transferência de massa

	RV	FP	Ka(s ⁻¹)
E3	0,8	33	7,42E-03
E4	0,8	43	2,11E-04
E2	1,1	33	5,00E-04
E1	1,1	43	6,90E-04
Média			0,0022

A tabela 4.16 mostra os resultados encontrados para o coeficiente de transferência de massa nos ensaios realizados, sendo que o ensaio E4 é realizado em triplicata, e o valor para este ensaio corresponde a média obtida na triplicata.

A tabela 4.17 apresenta o cálculo do efeito de cada variável e do efeito combinado de ambas no coeficiente de transferencia de massa.

Podemos observar na tabela 4.16 que os resultados encontrados para coeficiente de transferência de massa a partir da solubilização do precipitado do caldo de abacaxi, são compatíveis em ordem de grandeza aos encontrados na literatura para sistemas protéicos.

Na tabela 4.17 observamos que ambos os efeitos das variáveis independentes não são significativos, e que o aumento da relação entre as vazões das fases leve e pesada, diminui o coeficiente de transferência de massa para *bromelina*. Para a frequência de pulsação das campânulas esse efeito é o mesmo. Vemos que o efeito combinado das variáveis é significativo neste estudo.

Tabela 4.17 - Cálculo dos efeitos na transferência de massa

Efeito	
(1)RV	-0,0032
(2)FP	-0,007
12	0,0074
erro	0,0001

4.2.6. Efeito da Razão entre as vazões das fases (RV) e da Frequência da pulsação (FP) das Campânulas no Número de Unidades de Transferência.

O efeito das variáveis independentes do equipamento no número de unidades de transferência é avaliado pelos ensaios propostos no planejamento experimental. Nós podemos calcular a altura de um extrator diferencial ou equipamento de extração líquido-líquido contínuo, pelo produto da “Altura de unidades de transferência” ou AUT, que é uma medida de eficiência do equipamento pelo chamado “Número de Unidades de Transferência” ou NUT, que é uma medida da dificuldade da separação.

Nesta avaliação é possível observar a influência direta destas variáveis de operação na separação, ou melhor, ter uma medida da dificuldade do separação das enzimas proteolíticas dentro da coluna.

Tabela 4.18 Número de unidades de transferência

	RV	FP	NUT
E3	0,8	33	0,48
E4	0,8	43	0,37
E2	1,1	33	1,02
E1	1,1	43	1,41
Média			0,82

A tabela 4.18 mostra os resultados encontrados para o número de unidades de transferência nos ensaios realizados, sendo que o ensaio E4 é realizado em triplicata, e o valor para este ensaio corresponde a média obtida na triplicata.

A tabela 4.19 apresenta o cálculo do efeito de cada variável e do efeito combinado de ambas no número de unidades de transferência.

Podemos observar na tabela 4.18 que os resultados encontrados para número de unidades de transferência a partir da solubilização do precipitado do caldo de abacaxi, apresentam grande variação para número de unidades de transferência, que são compatíveis com a geometria do equipamento.

Na tabela 4.19 observamos que os efeitos das variáveis independentes são significativo, e que o aumento da relação entre as vazões das fases leve e pesada, aumenta o número de unidades de transferência. Para a frequência de pulsação das campânulas esse é efeito é o mesmo. Vemos que o efeito combinado das variáveis, também é significativo neste estudo.

Tabela 4.19 - Cálculo do efeitos no número de unidades de transferência.

Efeito	
(1)RV	0,79
(2)FP	0,28
12	0,50
erro	0,2222

4.2.7. Efeito da Razão entre as vazões das fases (RV) e da Frequência da pulsação (FP) das Campânulas no "Hold Up" da Micro-Coluna.

Nos últimos anos, novos tipos de equipamentos de extração tem sido desenvolvidos para se obter uma melhor flexibilidade operacional, entre os quais se destaca as colunas com campânulas pulsantes, já que neste tipo de equipamento, o contato entre as duas fases depende primeiramente da frequência de pulso das campânulas. O ajuste desta variável independente pode atingir as condições mais favoráveis num processo de extração.

Um parâmetro muito importante para a caracterização hidrodinâmica de um equipamento de extração consiste na fração retida de uma das fases, que está disponível para transferência de massa dentro do equipamento, ou seja, o "hold up". Neste trabalho, o "hold up" se refere a fração retida da fase rica em PEG. Significa portanto a relação volumétrica entre a fase leve e o volume total útil do equipamento.

O "hold up" é um parâmetro que depende do equipamento selecionado, das condições operacionais empregadas e das propriedades físicas das fases.

Tabela 4.20 - Cálculo do “hold up” na coluna.

	RV	FP	Hold-up
E3	0,8	33	0,2100
E4	0,8	43	0,2418
E2	1,1	33	0,1700
E1	1,1	43	0,2445
Média			0,2166

A tabela 4.20 mostra os resultados encontrados para o “hold up” da fase leve nos ensaios realizados, sendo que o ensaio E4 é realizado em triplicata, e o valor para este ensaio corresponde a média obtida na triplicata.

A tabela 4.21 apresenta o cálculo do efeito de cada variável e do efeito combinado de ambas no “hold up” da fase leve.

Podemos observar na tabela 4.20 que os resultados encontrados para “hold up” da fase leve a partir da solubilização do precipitado do caldo de abacaxi, apresentam um “hold up” da fase leve, na ordem de 20 a 25% do volume útil do equipamento.

Tabela 4.21 Cálculo dos efeitos no “hold up”.

Efeito	
(1)RV	-0,0187
(2)FP	0,1063
12	0,0427
erro	0,0027

Na tabela 4.21 observamos que os efeitos das variáveis independentes são significativos, e que o efeito combinado também é significativo. A maior contribuição é o aumento da Frequência da pulsação, que aumenta o “hold up” da fase leve. Para a razão entre as fases esse é efeito é inverso, porém nota-se claramente aqui a maior influência da frequência de pulsação.

5. CONCLUSÃO E SUGESTÕES

Este trabalho apresenta como proposta o desenvolvimento de um processo de extração de *Bromelina* do abacaxi a partir do caldo precipitado, tendo como base tecnológica principal a extração líquido-líquido em uma coluna de extração contínua de campânulas pulsantes utilizando sistema bifásico aquoso.

Apresentamos neste trabalho também, um enfoque maior das condições de operação do equipamento, bem como do estudo de parâmetros importantíssimos do ponto de vista do projeto de equipamento, como a transferência de massa em regime contínuo, e a determinação do número de unidades de transferência para a coluna diferencial.

Os altos valores de recuperação de proteína total encontrados, 60% em média nos ensaios realizados e principalmente de atividade enzimática, 58% em média também, mostram um grande potencial a ser explorado ainda nesse processo. O processo anterior à extração líquido-líquido de concentração do caldo de abacaxi por precipitação com etanol, com certeza mostra-se eficiente e potencializa o processo de recuperação da *bromelina*.

Pode-se verificar e comprovar a influência da razão entre as fases alimentadas na coluna, que sempre se apresenta como fator importante na estimativa e projeto, bem como na determinação da eficiência das colunas de extração. Um fator importante determinado neste trabalho é a frequência de pulsação das campânulas, apresentando sempre valores significativos em relação ao erro experimental. Este parâmetro merece um estudo mais aprofundado em trabalhos futuros, como por exemplo em um aumento de escala do equipamento.

O equipamento utilizado neste trabalho mostrou-se bastante eficiente e adequado ao trabalho com bioprodutos, bem como se mostrou altamente flexível em relação as condições de operação e de fácil montagem.

Um trabalho de “scale-up” nesta coluna seria altamente interessante, ou seja, aumentar a escala do equipamento e verificar suas possibilidades de

operação em uma escala mais produtiva, bem como um estudo econômico do processo, visto que a matéria-prima da *bromelina*, o abacaxi, é uma fruta abundante no nosso país.

Um trabalho de modelagem, visando o estudo das condições de operação do equipamento, como do sistema aquoso, ou seja, estudo de massa molecular do polímero ou concentração do sistema, que podem ser feitos com sistema operando em contínuo, seria de grande valia. Outra sugestão, é a inclusão de um estudo para alta purificação da *bromelina*, bem como a utilização de métodos cromatográficos na identificação da mesma.

O estudo do processo proposto neste trabalho mostrou-se altamente atraente como um possível e principalmente eficaz processo de recuperação e purificação de *Bromelina* do abacaxi, chegando a 74% de recuperação de atividade com frequência de 43 pulsos por min e razão de 1,1 entre as fases.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

- AIRES-BARROS, MR., Extração líquido-líquido de produtos biológicos: recuperação de produtos de fermentação (ácidos carboxílicos) e proteínas. Lisboa, 1990.184 p. Tese de Doutorado. Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior Técnico
- ALBERTSSON, P.A., Partition of Cell Particles and Macromolecules, John Wiley, 2rd., 1971.
- ALBERTSSON, P.A., Partition of Cell Particles and Macromolecules, John Wiley, 3rd., 1986.
- ALBERTSSON, P.A.; TJERNELD, F., *Phase Diagrams*. Methods in Enzymology, v.228, p.3-13, 1994
- ALLINGER, KN.L.; CAVA, M.P.; DE JONGH, D.C.; JOHNSON, C.R.; LEBEL, N.^a; STEVENS, C.L.Química Orgânica, 2 ed. Rio de Janeiro, ed Guanabara Koogan, 1978
- ALSOP, R.M., *Industrial productions of dextrans.* Progress Industrial Microbial, v.18, p.1-44, 1983.
- ASENJO, J.A., Aqueous two-phase for: I. Systems, principles and manipulation of selectivity.II.Processes and models. São Paulo, 1994. Apostila Instituto de Pesquisas Tecnológicas.
- ASENJO, J.A., Industrial prospects of aqueous two-phase processes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, V. 59, P.109, 1994
- ASENJO, J.A., Separation processes in biotechnology. New York, Marcel, Dekker, 1990
- BALDINI, V.L.S.; IADEROZA, M.; FERREIRA, E.A.H.; SALES, A.M.; DRAETTA, I.S. e GIACOMELLI, E.J. Ocorrência da Bromelina e

- cultivares de abacaxizeiro. Colet. ITAL, v.23, n.1, p.44-55, Campinas, 1993.
- BAMBERGER, S.; SEAMAN, G.V., BROWN, J.A., BROOKS, D.E., *The partition of sodium phosphate and sodium chloride in aqueous dextran-polyethyleneglycol two phase systems*, J. Coll. And Interf. Sci., v.99, n.1, p. 187-193, 1984.
- BAMBERGER, S.; BROOKS, D.E.; SHARP, K.A.; VAN ALSTINE, J.M.; WEBWE, T.J., Preparation of phase system and measurement of their physicochemical properties.IN: BROOKS, D.E.; WALTER, H.; FISHER, D. Partitionning in aqueous two phase systems. Orlando, Academic Press, 1985.
- BELTER P.A., CUSSLER, E.L.; HU, W.S.Biosseparotions: downstream processing for biotechnology. Minneapolis, Jhn Wiley & Sons, 1988.
- BOLAND, J.M. *Extration of proteins from animal tissue using multiphase aqueous systems*. Bioseparation, v. 1 p. 293-304, 1990.
- BOLAND , J. M.; HESSELINK, P.G..M.; PAAPMICHAEL, N. ; HUSTED, H. *Extrative purification os enzymes from animal using aqueous two-phase systems: Pilot scale studies*. Journal of Biotechnonolugy, v. 19, p. 19-34, 1991.
- BRADFORD, M. M., *A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities for protein utilizing the principle of protein-dye binding*_Analytical Biochemistry, v. 72, 1976.
- BASKIR, J.N., HATTON,T.A., SUTTER, U.W.*Protein partitioning in two-phase aqueous polymer systems*, Biotechnology Bioeng., v.34, p.541-558, 1989.

- BROOKS, D.SHARP, K. FISHER, D. *Theorical Aspects of partitioning*.IN: Partitioning in aqueous two-phase systems, H. Walter, D.E. BROOKS, D.FISHER, academic Press, Orlando, 1985.
- BRUNS, R.E.; SCARMÍNIO, I.S.; BARROS NETO, B., Planejamento e Otimização de Experimentos, 2ª edição, Editora UNICAMP, São Paulo, 1996. 299p
- BROOKS, D.E.; NORRIS-JONES, R., *Preparation and analysis for two-fases systems*. Methods in Enzymology, v. 228, p. 14-27, 1994.
- CABEZAS Jr, H. *Theory of phase formation in aqueous two-phase systems* Journal of Chromatography B, V. 680, p. 3-30, 1996.
- CASCONE, O; ANDREWS, B.A.; ANSEJA, J.A., *Partitioning and purification of thaumatin in aqueous two-phase systems*. Enzyme Microbiology and Tecnology, v.13, p. 629-635, 1991.
- CABRAL, J.M.S., AIRES-BARROS, M.R.,__*Liquid-liquid extration of biomolecules using aqueous two-phase systems*. IN: JOHN WILEY & SONS LTD.Recovey process for biological materials, New York; p. 273-301, 1993.
- CAVALCANTE, P.B.; Frutas comestíveis da Amazônia ; Publicações avulsas17, 1972
- CESAR, A.C.W., SILVA, R. e LUCARINI, A.C., *Recuperação das Enzimas Proteolíticas Presentes na Casca e Talo do Abacaxi*, R I C, 01, 47-54 , São Carlos, 1999.
- CESAR, A.C.W. Otimização do parâmetros de extração líquido-líquido em duas fases aquosas na recuperação da bromelina presente no abacaxi, Campinas, 2000. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual de Campinas.

- COIMBRA, J.S.R., Desempenho de um extrator tipo Grassier na separação de proteínas do soro de queijo usando sistemas aquosos bifásicos. Tese de doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 1995.
- CUSACK, R.W., FREMEAUX, P., GLATZ, D. *Though basically simple, the Techniques has surprise wide range of useful variation.* Chemical Engineering, p. 66-76, 1991.
- DIAMOND, A.D., HSU, J.T., *Aqueous Two-phase Systems for Biomolecule Separation*, IN: Advances in Biochemical Engineering Biotechnology, Managing (ed), Springer- Verlag Berlin Heidelberg, v.47, p. 90-134, 1992
- EITEMAN, M.A., *Temperature-dependent phase inversion and its effect on partitioning in the poly(ethylene glycol) ammonium sulphate aqueous two-phase system.* Journal of Chromatography A, v. 668, p. 13-19, 1994
- EITEMAN, M.A.; GAINER, J., Predicting partition coefficients in polyethylene glycol-potassium phosphate aqueous two-phase system. Journal Of Chromatography A, v. 586, p. 341-346, 1991.
- FRANCO, T.T. Use of modified proteins in aqueous two-phase systems. Effect of surface hydrophobicity and charge. Tese de doutorado. Faculty of Agriculture and Food, University of Reading, 1992
- FORCINITI, D.; HALL, C.K.; KULA, M.R. *Influence of polymer molecular weight and temperature on phase composition in ATPS.* Fluid Phase Equilibria, v. 61, p. 243-262, 1991.
- FORCINITI, D.; HALL, C.K.; KULA, M.R. *Protein partition at the isoelectric point: influence of polymer molecular weight and concentration and protein size.* Biotechnology and Bioengineering, v. 38, p. 986-994, 1991.

GREVE, A.; KULA, M.R., *Recycling of salts in partition protein extraction processes*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v. 50, p. 27-42, 1991.

GUAN, Y. e KULA, M-R, *Recycling of Salt from the Primary Bottom Phase of a Protein Extraction Process*. J.Chem.Tech. Biotechnol. , 50 (1991), 27-42

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

GUAN, Y.; TREFRY, T.E., LILLEY, T.H. *Application of a statistical geometrical theory to aqueous two-phase systems*. Journal of Chromatography A, 668, p-31-45, 1994.

HANSON, C. *Recent research in solvent extraction*. Chemical Engineering, v.9. p. 135-142, 1968.

HANSON, C., *Recent advances in liquid-liquid extraction*. New York, Pergamon Press, 1971.

HARRIS, J.M., YALPANI, M. *Polymer-ligands used affinity partitioning and their synthesis*. IN: WLATER, H.; BROOKS, D.E., FISHER, D. (eds), *Partition in aqueous two-phase systems*. Academic press, Orlando, Fla, p.589-625, 1985.

HARRIS, J.M. *Poly(ethylene glycol) chemistry: biotechnical and biomedical applications*, Ed Plenum, NY, 1992

HUMPRHEY, J.L., ROCHA, J.A., FAIR, J.R., *The essentials for extraction*. Chemical Engineering, v.17, p.76-95, 1984.

HUDDLESTON, J.G., OTTOMAR, K.W., NGONYANI, D.M., LYDDIATT, A., *Influence of system and molecular parameters upon fractionation of*

- intracellular proteins from Saccharomyces by aqueous two-phase partition.* Enzyme Microb. Technol., v.13, p.24-32, 1991.
- HUDDLESTON, J.G.; WANG, R.; FLANAGAN, J.A., O' BRIEN, S; LYDDIATT, A., *Variation of protein partition coefficients with volume ratio in poly(ethylene glycol) salt aqueous systems.* Journal of Chromatography A, v.668, p.3-11, 1994.
- HUSTEDT, H. KRONER, K.H. e PAPAMICHAEL, N. , Continuous Croscurrent aqueous Two Phase Extration from Biomass-Automated Recovery in Prodution Scale, Process Biochemistry, 23 (1988), 129-137
- HUSTEDT, H; KRONER, K.H.; KULA, M.R.Applications of phase partitioning in the biotechnology.In: BROOKS, D.E.; WALTER, H.; FISHER, D.Partitioning in aqueous two-phase systems. Orlando, Academic Press, 1985.
- JAFARABAD, K.R., SAWANT, S.B., JOSHUI, J.B., SIKDAIR, S.K. *Enzyme and protein mass transfer coefficient in aqueous two-phase system.I- Spray extration columns.* Chemical and Engineering Science, v. 47, p. 57-68, 1992a.
- JAFARABAD, K.R., SAWANT, S.B., JOSHUI, J.B., SIKDAIR, S.K. *Enzyme and protein mass transfer coefficient in aqueous two-phase system.II- York-Schibel extration columns.* Chemical and Engineering Science, v. 47, p. 69-73, 1992b.
- JOHANSSON, G. Partitioning of proteins. In: BROOKS, D.E.; WALTER, H.; FISHER, D. Partitioning in aqueous two phase systems. Orlando, Academic Press, 1985.
- JOHANSSON, G. *Partitioning procedures and techniques: cells, organelles and, membranes.* Methods in Enzymology, v.228, p. 42-63, 1994.

- KAWASE, Y. *Dispersed-phase holdup and mass transfer in a rotating disc contactor with perforated skirts*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v. 48, p. 247-260, 1990.
- KRONER, K.H., HUSTEDT, H. e KULA, M-R, Extractive Enzyme Recovery: Economic Considerations, Proc. Biochem. Eng. , Fiechter A., Berlin, vol 24. (1982), 73-118
- KULA, M.R., *Purification of enzymes by liquid-liquid extration*, IN: Advances in Biochemical Bioengineering, A.Fiechter (ed), Springer-Verlag, 1982.
- KULA, M-R, Trends and Future Prospects of Aqueous Two-Phase Extration, Biosep., 1 (1990)
- LAHORE, H.M.F., MIRANDA, M.V., FRAILE, E.R., BONINO, M.J.B.J.; CASCON, O., Partition behaviour and purification of a *Mucor bacilliformis* acid proteases in aqueous two-phase systems. Process Biochemistry, v.30, p. 615-621, 1995
- LEHNINGER, A.L., Princípios de Bioquímica, Savier, 1995.
- LOGSDAIL, D.H., THORNTON, J.D., PRATT, H.R.C. *Liquid-liquid extraction part XII: flooding rates and performance data for a rotary disc contactor*.
- MATIASSEN, B.LING, T.G.I., *Extraction in aqueous systems for biotechnology*. IN: VENAL, N.S., HUDSON, M.J., Biochemistry and Biotechnology, p. 270-292, 1987.
- MEDINA, J.C., BLEINTROTH, W.E., HASHIZUME, T.; ABACAXI - da cultura ao processamento e comercialização ITAL, 1978
- MINAMI, N.M., Extração Líquido-Líquido aplicada à separação e purificação da amiloglicosidase, São Paulo, 1997, 190p., Universidade de São Paulo, Dissertação de Mestrado.

MOLYNEAUX, P. Water Soluble Synthetic Polymers: Properties and Behavior, CRC, Boca Raton, vol1, 1984.

MURACHI, T. Bromelain enzymes. In: LORAND, L. Methods in Enzymology, v.XLV, p.475-85, New York, Academic Press, 1976.

PAPAMICHAEL, N. BOERNER, B. e HUSTED, H. Continuous Aqueous Phase Extraction of Proteins: Automated and Recycling of Process Chemicals, J. Chem. Tech. Biotechnol., 54 (1992)

PATHAK, S.P.; SUDSHA.; SAWANT, S.B.; JOSHI, J.B. New salt polyethylene glycol systems for two phase aqueous extraction. The Chemical Engineering Journal, v. 46, p. B31-B34, 1991

PATIL, T.A., JAFARABAD, K.R., SAWANT, S.B., JOSHI, J.B. New salt-polyethylene glycol systems for two-phase aqueous extraction. The Chemical Engineering Journal, v. 46, p.B31-B34, 1991.

PAWAR, P.A., PARASU-VEERA, U., SAWANT, S.B., JOSHI, J.B. Enzyme mass transfer coefficient in aqueous two-phase systems:modified spray extractions columns. The Canadian Journal of Chemical Engineering, v.75, p. 751-758, 1997.

POLSON, A., POTGIETE, G.M., LARGIER, J.F., MEARS, G.E.F., JOUBERT, F.J., Biochemical and Biophysical Acta, v. 82, p.463, 1964.

PORTO, A.L.F., Extração líquido-líquido de proteínas utilizando sistemas de duas fases aquosas em coluna de discos perfurados rotativos.Campinas, 1998, 98 p. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, 1998.

PORTO, A.L.F., LIMA-FILHO, J.L., AIRES BARROS, M.R., CABRAL, J.M.S., TAMBOURGI, E.B. Extraction of recombinant cytochrome b5 from disrupted Escherichia coli cells with an aqueous two-phase system

in a continuous perforated rotating disc contactor. Biotechnology Techniques, v.11, p. 641-643, 1997.

PORTO, A.L.F., SARUBBO, L.A., LIMA-FILHO, J.L., AIRES-BARROS, M.R., CABRAL, J.M.S., TAMBOURGI, E.B. *Hydrodynamics and mass transfer in two-phase aqueous extraction using a perforated rotating disc contactor*, Bioprocess Engineering (no prelo), 1999.

RABELO, A.P.B., Estudo e Desenvolvimento de uma Micro-Coluna de Câmpanulas Pulsantes para Purificação de Proteínas, Campinas, 1999, 188p., Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas.

RABELO, A.P.B., Estudo da eficiência de separação numa coluna de extração líquido-líquido mecanicamente agitada por palhetas rotativas, Campinas, 1995, 166p., Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas

ROWAN, A.D.; BUTTLE, D.J. and BARRETT, A.J. The cysteine proteinases of the pineapple plant. Biochemical Journal, v.266, n.3, p.869-75, 1990.

SANTOS, S.A. Efeito do tempo na composição físico-química, química e na atividade da bromelina do caule do abacaxizeiro Ananas comosus (L.) Merr. CV. Pérola armazenado em condições com e sem refrigeração. Lavras: ESAL, 1995. 47 p. (Dissertação - Mestrado em Ciência dos Alimentos).

SARUBBO, L.A., Caracterização de um novo sistema bifásico aquoso e aplicação em extração de proteínas com coluna de discos perfurados rotativos, Campinas, 2000. Tese de Doutorado, 174p. Universidade Estadual de Campinas, SP, 2000.

SARMENTO, M.J., PIRES, M.J., CABRAL, J.M.S., *Liquid-liquid extration of a recombinant protein, cytochrome b5, with aqueous two-phase systems*

- of polyethylene glycol and potassium phosphate salts. Journal of Chromatography A*, v.668, p. 117-120, 1994.
- SAWANT, S.B., SKIDAR, S.K., JOSHI, J.B. *Hydrodynamics and mass transfer in two-phase aqueous extraction using spray column. Biotechnology and Bioengineering*, v. 36, p. 109-115, 1990
- SCHMIDT, A.S.; ANDREWS, B.A.; ASENJO, J.A., *Correlations for the partition behavior of proteins in aqueous two-phase systems: effect of overall protein concentration. Biotechnology and Bioengineering*, v. 50, p. 617-626, 1996.
- SCOPES, R.K. *Protein Purification: principles and practice*. 2. ed. New York, Springer Verlag, 1994, 329 p.
- SCHLUCK, A., MAURER, G., KULA, M.R., *Influence of eletrostatic interactions on partitioning in aqueous polyethylene glycol/dextran biphasic systems. Biotechnology and Bioengineering*, v.46, p.443-451, 1995.
- SEBASTIÃO, M. J. , CABRAL, M.S., AIRES-BARROS, R., *Partitionning of recombinant FUSARIUM SOLANI PISI cutinase in polyethylene glycol-aqueous salt solution two-phase systems. Journal of Chromatography A*, v. 668, p. 139-144, 1994.
- SOUZA, R.R..*Estudo e desenvolvimento de um extrator de palhetas rotativas.* Tese de Doutorado, Faculdade de engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.
- STEINER, L. *Rechennerische Erfassung der Arbeitsweise vom Fluessig-fluessig extraktionskolonnen*, Reihe 3 : Verfahrenstechnik, Nr 154, VDI Verlag, Dusseldorf, 1988.

- STRAND, C.P., OLNEY, R.B., ACKERMAN, G.H. *Fundamental aspects of rotating disk contactor performance*, Analytical I. Engineering Chemical Journal, v. 08, p. 252-261, 1962.
- SUH, H.J.; LEE, H.; CHO, H.Y. and YANG, H.C. Purification and characterization of bromelain isolated from pineapple. Journal of the Korean Agricultural Chemical Society, v.35, n.4, p.300-7, 1992
- VIDEIRA, M. ; AIRES-BARROS, M.R. Liquid-liquid extraction of clavulanic acid using an aqueous two-phase system of polyethylene glycol and potassium phosphate. Journal of Chromatography A, v.668, p.237-240, 1994.
- WALTER, H., JOHANSSON, G., *Partitioning in aqueous two-phase systems; an overview*. Analytical Biochemistry, v.155 p.215-242, 1986.
- WALTER, H., JOHANSSON, G., BROOKS, D.E., *Partitioning in aqueous two-phase systems: recent results*. Analytical Biochemistry, v.197, p.1-18, 1991.
- WALTER, H., JOHANSSON, G. Aqueous two-phase systems. Academic Press, New York, 1994.
- WU, Y.T., LIN, D.Q., ZHU, Z.Q., MEI, L.H. , *Prediction of liquid-liquid equilibria of polymer-salt aqueous two-phase systems by a modified Pitzer's virial equation*. Fluid Phase Equilibria, v. 124, p.67-79, 1996
- YANG, W.Y., LIN, C.D., CHU, I. LEE, C.J., *Extraction of cephalosporin C from whole broth and separation of desacetyl cephalosporin C by aqueous two-phase partition*. Biotechnology and Bioengineering, v. 43, p. 439-445, 1994.