



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA  
DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS  
BIOTECNOLÓGICOS**

**UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE**

**EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS EM UM SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS  
NUMA MICRO-COLUNA PULSADA**

**PATRÍCIA BERNARDI LEITE**

**Orientador: PROF. DR. ELIAS BASILE TAMBOURGI**

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

**MARÇO 2001**

965276



|              |                                     |
|--------------|-------------------------------------|
| UNIDADE      | De                                  |
| N.º CHAMADA: | T/ UNICAMP                          |
|              | L536e                               |
| W            | Ex.                                 |
| TOMBO BC/    | 44930                               |
| PROC         | 16-392101                           |
| C            | <input type="checkbox"/>            |
| D            | <input checked="" type="checkbox"/> |
| PREC         | R\$ 11,00                           |
| DATA         | 28/06/01                            |
| N.º CPO      |                                     |

CM00157841-1

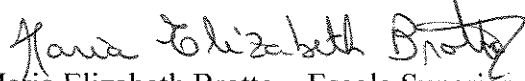
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

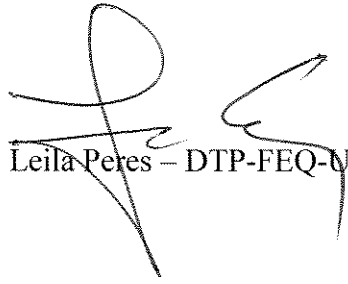
L536e Leite, Patrícia Bernardi  
Extração de proteínas em um sistema de duas fases  
aquosas numa micro-coluna pulsada / Patrícia Bernardi  
Leite. --Campinas, SP: [s.n.], 2001.

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

1. Extração por solventes. 2. Caju. 3. Separação  
(Tecnologia). 4. Biomoléculas. I. Tambourgi, Elias  
Basile. II. Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Dissertação de Mestrado , defendida por Patrícia Bernardi Leite ,em  
15 de março de 2001 , e aprovada pela banca julgadora constituídas pelos seguintes  
doutores:

  
Maria Elizabeth Brotto – Escola Superior de Química  
Oswaldo Cruz

  
Leila Peres – DTP-FEQ-UNICAMP

  
Elias Basile Tambourgi – DESQ-FEQ-UNICAMP

Esta versão corresponde à final da Dissertação de Mestrado ,  
defendida por Patrícia Bernardi Leite , e aprovada , em 15 de março de 2001

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized 'E' followed by a cursive 'L' and a horizontal stroke.

Prof Dr Elias Basile Tambourgi - orientador

Dedico:

As pessoas mais importantes da minha vida

**OSVALDO CEZÁRIO LEITE,  
MARIA NIDERCE B. LEITE e  
PAULO ROBERTO B. LEITE,**  
minha família

**MAURO AUGUSTO RODRIGUES,**  
meu noivo

## SUMÁRIO

|                                                                                        | página |
|----------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| <b>AGRADECIMENTOS</b>                                                                  | I      |
| <b>LISTA DE SÍMBOLOS</b>                                                               | II     |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>                                                           | III    |
| <b>LISTA DE FIGURAS</b>                                                                | IV     |
| <b>LISTA DE TABELAS</b>                                                                | VI     |
| <b>RESUMO</b>                                                                          | VIII   |
| <b>ABSTRACT</b>                                                                        | X      |
| <br>                                                                                   |        |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>                                                                   | 1      |
| <b>2. OBJETIVOS</b>                                                                    | 4      |
| <b>3. REVISÃO DA LITERATURA</b>                                                        | 5      |
| <b>3.1. EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO</b>                                                   | 5      |
| <b>3.2. SISTEMAS BIFÁSICOS AQUOSOS</b>                                                 | 5      |
| <b>3.2.1. Diagrama de Fases</b>                                                        | 7      |
| <b>3.2.2. Diagrama Termodinâmico de Fases</b>                                          | 8      |
| <b>3.2.3. Fatores que Influenciam o Comportamento das Fases</b>                        | 9      |
| <b>3.2.4. Propriedades Físico-Químicas das Fases</b>                                   | 13     |
| <b>3.3. PARTIÇÃO DE BIOMOLÉCULAS EM SISTEMAS BIFÁSICOS AQUOSOS</b>                     | 14     |
| <b>3.3.1. Fatores que Afetam a Partição de Biomoléculas</b>                            | 16     |
| <b>3.3.2. Termodinâmica da Partição</b>                                                | 21     |
| <b>3.4. APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS</b>                                                 | 22     |
| <b>3.4.1. Concentração</b>                                                             | 22     |
| <b>3.4.2. Purificação de Biomoléculas em Larga Escala</b>                              | 23     |
| <b>3.4.3. Bioconversão</b>                                                             | 24     |
| <b>3.5. SISTEMAS BIFÁSICOS AQUOSOS MAIS ESTUDADOS</b>                                  | 25     |
| <b>3.6. SISTEMAS BIFÁSICOS ALTERNATIVOS</b>                                            | 27     |
| <b>3.7. UTILIZAÇÃO DE GOMAS COMO POLÍMERO PARA SISTEMAS<br/>BIFÁSICOS ALTERNATIVOS</b> | 29     |

|                                                                   |        |
|-------------------------------------------------------------------|--------|
| <b>3.7.1. Goma do Cajueiro</b>                                    | 31     |
| <b>3.8. Polietileno Glicol</b>                                    | 32     |
| <b>3.9. EQUIPAMENTOS UTILIZADOS NA EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO</b>   | 33     |
| <b>3.10. PROCESSAMENTO CONTÍNUO</b>                               | 39     |
| <b>3.11. EXTRAÇÃO CONTÍNUA EM COLUNAS AGITADAS POR PULSAÇÃO</b>   | 40     |
| <b>3.11.1. CAMPÂNULAS</b>                                         | 41     |
| <b>3.12. TRANSFERÊNCIA DE MASSA EM SISTEMAS BIFÁSICOS AQUOSOS</b> | 42     |
| <b>3.13. RECUPERAÇÃO DOS PRODUTOS</b>                             | 45     |
| <b>3.14. RECICLAGEM DE POLÍMEROS</b>                              | 47     |
| <br><b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>                                 | <br>48 |
| <b>4.1. MATERIAIS</b>                                             | 48     |
| <b>4.1.1. Reagentes</b>                                           | 48     |
| <b>4.1.2. Equipamentos</b>                                        | 48     |
| <b>4.1.3. Coluna Agitada por Campânulas Pulsantes</b>             | 49     |
| <b>4.2. MÉTODOS</b>                                               | 50     |
| <b>4.2.1. Purificação da Goma do Cajueiro</b>                     | 50     |
| <b>4.2.2. Preparo das Soluções Tampão</b>                         | 51     |
| <b>4.2.3. Preparo das Soluções de Polímeros</b>                   | 52     |
| <b>4.2.4. Preparo da Solução de Tripsina</b>                      | 52     |
| <b>4.2.5. Preparo dos Sistemas Bifásicos Aquosos</b>              | 52     |
| <b>4.2.6. Determinação do Diagrama de Fases</b>                   | 53     |
| <b>4.2.7. Determinação do Polietileno Glicol</b>                  | 53     |
| <b>4.2.8. CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS BIFÁSICOS AQUOSOS</b>       | 53     |
| <b>4.2.8.1. Determinação das linhas de amarrações “tie-lines”</b> | 53     |
| <b>4.2.8.2. Tempo de Separação de Fases</b>                       | 54     |
| <b>4.2.8.3. Razões de Fases</b>                                   | 54     |
| <b>4.2.9. Determinação do Conteúdo Protéico</b>                   | 54     |
| <b>4.2.9.1. Preparação do Reagente de Bradford</b>                | 55     |
| <b>4.2.10. Cálculo do Coeficiente de Partição</b>                 | 55     |
| <b>4.2.11. EXTRAÇÃO CONTÍNUA UTILIZANDO COLUNA DE CAMPÂNULAS</b>  | 55     |

|                                                                                   |               |
|-----------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| <b>PULSANTES</b>                                                                  |               |
| <b>4.211.1. Preparação dos sistemas de trabalho</b>                               | <b>55</b>     |
| <b>4.2.11.2. Caracterização Hidrodinâmica do Equipamento .</b>                    | <b>56</b>     |
| <b>4.2.11.2.1. Condições Operacionais</b>                                         | <b>56</b>     |
| <b>4.2.11.2.2. Determinação da Fração Retida da Fase Dispersa (Hold up)</b>       | <b>57</b>     |
| <b>4.2.11.3. Experimentos de Transferência de Massa</b>                           | <b>57</b>     |
| <b>4.2.11.3.1. Determinação do Coeficiente de Transferência de Massa (Kda)</b>    | <b>57</b>     |
| <b>4.2.11.3.2. Cálculo do Índice de Recuperação do Solute</b>                     | <b>58</b>     |
| <br><b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>                                             | <br><b>59</b> |
| <b>5.1. DETERMINAÇÃO DOS DIAGRAMAS DE FASES</b>                                   | <b>59</b>     |
| <b>5.1.1. EFEITO DA MASSA MOLAR DO PEG NO DIAGRAMA DE FASES</b>                   | <b>59</b>     |
| <b>5.1.2. EFEITO DO pH NO DIAGRAMA DE FASES</b>                                   | <b>61</b>     |
| <b>5.2. ESTUDOS DE PARTIÇÃO</b>                                                   | <b>63</b>     |
| <b>5.2.1. INFLUÊNCIA DA MASSA MOLAR DO PEG NA PARTIÇÃO DA<br/>TRIPSINA</b>        | <b>67</b>     |
| <b>5.2.2. INFLUÊNCIA DO COMPRIMENTO DA “TIE-LINE” NA PARTIÇÃO DA<br/>TRIPSINA</b> | <b>70</b>     |
| <b>5.2.3. INFLUÊNCIA DO pH NA PARTIÇÃO DA TRIPSINA</b>                            | <b>72</b>     |
| <b>5.2.4. COLUNA AGITADA POR CAMPÂNULAS PULSADAS</b>                              | <b>72</b>     |
| <b>5.2.4.1. ESTUDOS PRELIMINARES NA MICRO-COLUNA PULSADA</b>                      | <b>73</b>     |
| <br><b>6. CONCLUSÕES</b>                                                          | <br><b>75</b> |
| <br><b>7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b>                                    | <br><b>76</b> |
| <br><b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>                                          | <br><b>77</b> |

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por ter me permitido concluir mais uma etapa em minha carreira profissional.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi, pela oportunidade única em desenvolver este trabalho na UNICAMP, por toda confiança depositada, pelo incentivo, pela atenção e sobretudo pela consideração e amizade.

À Luciana Alves de Oliveira, Leonie Asfora Sarubbo e Ana Paula Rabelo pela grande ajuda em todas as etapas deste trabalho, pelo incentivo e paciência.

Aos companheiros de laboratório: André, Arlan e Eliana.

Ao meu noivo, Mauro Augusto Rodrigues, pelo amor, incentivo, paciência e participação ao longo de toda esta caminhada.

Ao meu pai, Osvaldo Cezário Leite que, quando em vida, foi meu grande incentivador, minha eterna gratidão e admiração.

À minha família, Niderce, minha mãe, Paulo, meu irmão, por todo amor recebido.

Aos meus primos Ivani, Tadeu, Carolina e Tadeu Jr., por terem me acolhido durante o desenvolvimento do meu trabalho.

A FAPESP pelo apoio financeiro no decorrer deste curso.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## LISTA DE SÍMBOLOS

C: concentração da proteína na fase dispersa  
C\*: concentração da proteína na interface em equilíbrio com a fase contínua  
C<sub>i</sub>: Concentração de equilíbrio do compostos particionados na fase inferior  
C<sub>s</sub>: Concentração de equilíbrio do compostos particionados na fase superior  
Cent: concentração de soluto na corrente de entrada de fase dispersa  
C<sub>sai</sub>: concentração de soluto na corrente de saída de fase dispersa  
C<sub>fc</sub>: valor médio entre a concentração final da fase contínua e o valor inicial da mesma fase  
C<sub>f</sub>: fração mássica de soluto na alimentação  
C<sub>r</sub>: fração mássica de soluto no refinado  
d<sub>i</sub>: Densidade da fase inferior  
d<sub>s</sub>: Densidade da fase superior  
E<sub>k</sub>: índice de recuperação do soluto  
H: hold up  
K: Ponto crítico  
K: Coeficiente de partição  
K<sub>da</sub>: coeficiente de transferência de massa  
k: Constante de Boltzmann  
K<sub>el</sub>: Fator eletroquímico do coeficiente de partição  
K<sub>hfob</sub>: Fator hidrofóbico do coeficiente de partição  
K<sub>biosp</sub>: Fator bioespecífico do coeficiente de partição  
K<sub>tamanho</sub>: Fator do tamanho do coeficiente de partição  
K<sub>conf</sub>: Fator conformacional do coeficiente de partição  
K<sup>o</sup>: Outros fatores do coeficiente de partição, os quais não são os fatores eletroquímico, hidrofóbico, bioespecífico, do tamanho e conformacional  
K<sub>ambiente</sub>: Fator ambiental do coeficiente de partição  
K<sub>estrutura</sub>: Fator estrutural do coeficiente de partição  
M: Massa molar (mol/L)  
N: fluxo de proteína para a fase dispersa  
Q: velocidade de fluxo da fase dispersa  
t: Temperatura  
V: volume da fase contínua  
V<sub>i</sub>: Volume da fase inferior  
V<sub>s</sub>: Volume da fase superior  
λ: Parâmetro que caracteriza as fases do sistema e as interações com o composto de interesse  
ΔG<sub>m</sub>: Energia livre de Gibbs de mistura  
ΔH<sub>m</sub>: Entalpia de mistura  
ΔS<sub>m</sub>: Entropia de mistura  
ΔC<sub>lm</sub>: média logarítmica da diferença de concentrações entre a interface e a fase dispersa

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

BSA: Albumina do soro bovino

FDA: Food and Drug Administration

PEG: Polietileno glicol

pI: Ponto isoelétrico

pH: Ponte hidrogeniônica

POLICAJU, G: Polissacarídeo da goma do cajueiro

SBA: Sistema bifásico aquoso

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                             | página |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| FIGURA 01- Diagrama de fases Polímero Q/ Polímero P.                                                                                                                                                        | 7      |
| FIGURA 02- Efeito do peso molecular da dextrana no diagrama de fases PEG<br>6000/Dextrana 1D5 (PM=3.400); 2D17 (PM=30.000); 3D24 (PM=40.500);<br>4D37 (PM=179.000); 5D48 (PM=460.000); 6D68 (PM=2.200.000). | 10     |
| FIGURA 03- Exemplo de um extrator em estágios diversos.                                                                                                                                                     | 35     |
| FIGURA 04- Exemplos de colunas que atuam sob a força da gravidade. (a) coluna de<br>pratos fixos perfurados; (b) coluna recheada; (c) coluna Spray.                                                         | 36     |
| FIGURA 05- Exemplos de colunas que atuam sob a força da gravidade. (a) coluna de fluxo<br>pulsado; (b) coluna de pratos pulsados; (c) colunas de discos rotativos.                                          | 38     |
| FIGURA 06- Coluna agitada por campânulas pulsantes.                                                                                                                                                         | 50     |
| FIGURA 07- Etapas de purificação da goma do cajueiro de acordo com o método de<br>RINALDO-MILLAS (1991) modificado.                                                                                         | 51     |
| FIGURA 08- Diagrama de fases dos sistemas PEG 8000/POLICAJU, PEG<br>4000/POLICAJU e PEG 1500/POLICAJU no pH 6,0 a $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .                                              | 60     |
| FIGURA 09- Diagrama de fases dos sistemas PEG 8000/POLICAJU, PEG<br>4000/POLICAJU e PEG 1500/POLICAJU no pH 7,0 a $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .                                              | 60     |
| FIGURA 10- Diagrama de fases dos sistemas PEG 8000/POLICAJU, PEG<br>4000/POLICAJU e PEG 1500/POLICAJU no pH 8,0 a $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .                                              | 61     |
| FIGURA 11- Diagrama de fases dos sistemas PEG 1500/POLICAJU, nos pH's 6,0; 7,0 e<br>8,0 a $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .                                                                      | 62     |
| FIGURA 12- Diagrama de fases dos sistemas PEG 4000/POLICAJU, nos pH's 6,0; 7,0 e<br>8,0 a $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .                                                                      | 63     |
| FIGURA 13- Diagrama de fases dos sistemas PEG 8000/POLICAJU, nos pH's 6,0; 7,0 e<br>8,0 a $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .                                                                      | 64     |
| FIGURA 14- Influência do comprimento da "tie-line" e do pH no coeficiente de partição da<br>tripsina em sistema PEG1500-Policaju a $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .                             | 67     |
| FIGURA 15- Influência do comprimento da "tie-line" e do pH no coeficiente de partição da                                                                                                                    |        |

|                                                                                                                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| tripsina em sistema PEG4000-Policaju a $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ .                                                                                          | 67 |
| FIGURA 16- Influência do comprimento da "tie-line" e do pH no coeficiente de partição da tripsina em sistema PEG8000-Policaju a $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . | 68 |
| FIGURA 17- Transferência de tripsina da fase PEG para a fase rica em POLICAJU.<br>(Condições: número de campânulas: 2; pulsação 1:3; velocidade de pulsação: 2,0 mL/min)                     | 73 |
| FIGURA 18- Transferência de tripsina da fase PEG para a fase rica em POLICAJU.<br>(Condições: número de campânulas: 2; pulsação 1:5; velocidade de pulsação: 2,0 mL/min )                    | 74 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                         | página |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| TABELA 01- Sistemas bifásicos aquosos e seus componentes.                                                                               | 6      |
| TABELA 02- Bioconversão extrativa utilizando enzimas e microorganismos como catalisadores em sistemas bifásicos aquosos.                | 25     |
| TABELA 03- Classificação das gomas industriais quanto a fonte de onde são obtidas.                                                      | 30     |
| TABELA 04- Composição da goma de <i>Anacardium occidentale</i> L. de diferentes origens.                                                | 32     |
| TABELA 05- Classificação dos equipamentos de extração segundo HANSON (1971).                                                            | 37     |
| TABELA 06- Reagentes utilizados nas dosagens dos polímeros e proteína.                                                                  | 48     |
| TABELA 07- Equipamentos utilizados.                                                                                                     | 49     |
| TABELA 08- Soluções estoques de polímeros.                                                                                              | 52     |
| TABELA 09- Composição das "tie-lines" de trabalho dos sistemas de duas fases aquosas PEG-POLICAJU utilizados ao longo dos experimentos. | 54     |
| TABELA 10- Variáveis estudadas na extração contínua.                                                                                    | 56     |
| TABELA 11- Diagrama de fases e composição das fases do sistema PEG 1500-Policaju a $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , pH 6,0. | 64     |
| TABELA 12- Diagrama de fases e composição das fases do sistema PEG 4000-Policaju a $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , pH 6,0. | 64     |
| TABELA 13- Diagrama de fases e composição das fases do sistema PEG 8000-Policaju a $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , pH 6,0. | 64     |
| TABELA 14- Diagrama de fases e composição das fases do sistema PEG 1500-Policaju a $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , pH 7,0. | 65     |
| TABELA 15- Diagrama de fases e composição das fases do sistema PEG 4000-Policaju a $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , pH 7,0. | 65     |
| TABELA 16- Diagrama de fases e composição das fases do sistema PEG 8000-Policaju a $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , pH 7,0. | 65     |
| TABELA 17- Diagrama de fases e composição das fases do sistema PEG 1500-Policaju a $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , pH 8,   | 66     |

27 °C ± 2 °C, pH 8,

TABELA 18- Diagrama de fases e composição das fases do sistema PEG 4000-Policaju a  
27 °C ± 2 °C, pH 8,0.

66

TABELA 19- Diagrama de fases e composição das fases do sistema PEG 8000-Policaju a  
27 °C ± 2 °C, pH 8,0.

66

## RESUMO

Os sistemas bifásicos aquosos têm sido largamente utilizados na pesquisa bioquímica para a separação e purificação de macromoléculas, células e partículas de origem celular. Nos últimos anos, os sistemas bifásicos também têm encontrado aplicações em diferentes áreas da biotecnologia, especialmente no que se refere a utilização de sistemas alternativos de baixo custo, como o sistema constituído por polissacarídeo da goma do cajueiro (POLICAJU) e polietileno glicol (PEG). O exsudato de *Anacardium occidentale* L. consiste em um polissacarídeo ácido largamente encontrado no Nordeste brasileiro, onde é empregado como substituto da goma arábica para uso farmacêutico. A goma bruta foi coletada como exsudato natural de árvores cultivadas no estado de Pernambuco. Nódulos livres de cascas foram selecionados para o processo de isolamento da goma via precipitação por etanol. Foram estabelecidos diagramas de fases para o sistema polissacarídeo da goma do cajueiro e polietileno glicol 1500, 4000 e 8000 nos pH's 6,0, 7,0 e 8,0 para temperatura de 27 °C . Observou-se um deslocamento da binodal no sentido de maiores concentrações de polímeros com a diminuição do peso molecular do polietileno glicol. A faixa de pH estudada, não acarretou alterações significativas na binodal. Diferentes "tie-lines" foram analisadas para a determinação do coeficiente de partição de uma proteína modelo, a tripsina. A proteína se particionou predominantemente na fase inferior rica em POLICAJU nas condições experimentais testadas. O aumento do comprimento da "tie-line" e do massa molar do polietileno glicol provocou, de modo geral, a redução do coeficiente de partição da tripsina. O coeficiente de partição não apresentou um comportamento regular com a variação da faixa de pH estudada

Em processamento contínuo, estudou-se o comportamento do sistema bifásico PEG-POLICAJU em coluna de campânulas pulsantes. O sistema selecionado para a transferência da tripsina da fase dispersa para a fase contínua foi o sistema obtido no processo em batelada: PEG 4000-POLICAJU

Os estudos preliminares de transferência de tripsina numa coluna de campânulas pulsantes indicou que ocorreu uma recuperação de cerca de 40% de proteína na fase POLICAJU. (Condições: número de campânulas: 2; pulsação 1:3; velocidade de pulsação: 2,0 mL/min).

## ABSTRACT

Aqueous two-phase systems have found widespread use in biochemical research for separation and purification of macromolecules, cells and cell particles. In recent years the aqueous two-phase systems have also found applications in various areas of biotechnology, specially when utilising low-cost biphasic systems, as the new aqueous two-phase system based on cashew-nut tree gum (POLICAJU) and poly(ethylene glycol) (PEG). The exsudate gum from *Anacardium occidentale* L. is a branched acidic heteropolysaccharide found in Brazilian north-western. It's employed locally as a substitute for arabic gum in pharmaceutical uses. Crude gum was collected as natural exsudate from cultivated trees in Pernambuco state. Clear nodules free of bark were selected to be isolated via ethanol precipitation. Phase diagrams were provided for POLICAJU and PEG molecular weight of 1500, 4000 and 8000 at pH 6,0, 7,0 and 8,0, for 25°C. It was observed a displacement of the binodal for higher polymer concentrations when polyethylene glycol molecular weights decreased. The pH range studied, did not promote significant alterations on the binodal. Different tie-lines were analysed for partition coefficient determination of a model protein, trypsin. The protein partitioned almost in the bottom gum-rich phase for the experimental conditions tested. The increase of the tie-line length promoted and PEG molecular weight variation, in general, a decreased of the protein partition coefficient. The partition coefficient did not show a regular tendency with the pH range studied.

## 1- INTRODUÇÃO

Existe uma necessidade de técnicas efetivas, econômicas e eficientes de bioseparação em grande escala que alcancem altos níveis de pureza e recuperação, mantendo a atividade biológica da molécula. Uma técnica de purificação que reúne estes critérios envolvidos na partição de biomoléculas entre duas ou mais fases imiscíveis, pode ser alcançado com a utilização de um sistema bifásico aquoso (DIAMOND & HSU, 1992).

O sistema aquoso multifásico tem sido um tópico de bastante interesse nos últimos anos e foi primeiro reportado na literatura por BEIJERINCK em 1896, observando o fenômeno que surgia quando soluções de gelatina e ágar ou gelatina e amido eram misturadas, havia a formação de uma mistura turbida que se separava em duas camadas líquidas, sendo a camada inferior rica em ágar (ou amido) e a superior rica em gelatina (BEIJERINCK, 1896, 1910).

Nesta investigação sistemática, DOBRY & BOYER-KAWENOKI (1947) estudaram a miscibilidade de um grande número de pares de diferentes polímeros solúveis em solventes orgânicos. Experimentos com polímeros solúveis em água indicaram o mesmo fenômeno da separação de fases (DOBRY, 1948).

Nas décadas de 40 e 50, CRAIG & CRAIG (1956) foram os pioneiros no uso de um sistema bifásico aquoso/orgânico para purificação de proteína usando distribuição contra-corrente. Entretanto, foi em 1955 que Per-Åke Albertsson descobriu que polietileno glicol (PEG), fosfato de potássio e água e PEG, dextrana e água formavam duas fases (ALBERTSSON, 1985). Os sistemas PEG/Dextrana e PEG/sal tem sido, desde então, os sistemas bifásicos aquosos mais freqüentemente investigados e utilizados para purificação de biomoléculas.

Sistemas bifásicos aquosos oferecem diferentes ambientes, físico e quimicamente falando, que permitem a partição de solutos tais como proteínas, células, partículas de origem celular e ácidos nucleicos. As diferenças nas fases são pequenas, o que exclui o tratamento severo oferecido pelo sistema de extração tradicional. Por exemplo, as fases do sistema PEG/Dextrana contém entre 80% a 99% de água por peso, possuindo tensão interfacial extremamente baixa (da ordem de  $10^{-7}$  N/cm), e proporcionando um ambiente favorável para materiais biológicos (ALBERTSSON, 1986). Estes sistemas são muito mais apropriados do que os sistemas primeiramente utilizados (solvente/água, etanol/água) por

CRAIG & CRAIG (1956). Tais sistemas têm alta tensão interfacial (da ordem de  $10^{-4}$  N/cm) e fases orgânicas contendo somente 40 a 50% de água. Essas condições acarretam sérios problemas, incluindo precipitação, desnaturação de proteínas e concentração de materiais biológicos exclusivamente na fase aquosa. Esses efeitos deletérios podem ser evitados através do uso de sistema bifásico aquoso polímero/polímero ou polímero/sal (DIAMOND & HSU, 1992).

Sistemas bifásicos aquosos com polímeros são extremamente úteis para a separação e análise de biomoléculas. Nas últimas décadas, muitos pesquisadores têm aplicado esses sistemas para separação em escala laboratorial de proteínas, células, organelas celulares, vírus, fragmentos de membrana celular e outros materiais biológicos. Vários pesquisadores têm utilizado estes sistemas como um meio para determinar as propriedades superficiais das biomoléculas, tais como carga e hidrofobicidade (ZASLAVSKY, 1995).

A extração com sistemas bifásicos aquosos pode ser economicamente competitiva na separação de proteínas, células e componentes celulares. A grande vantagem destes sistemas reside nos tempos de processamento reduzidos, elevadas capacidades volumétricas, e facilidade de “scale-up” (KRONER et al., 1984).

Ultimamente, a ampliação da escala de laboratório para planta piloto (PAPAMICHAEL et al., 1992), a modelagem do processo de partição (KING et al., 1988; GROßMANN et al., 1998; EITMAN, 1994) e o desenvolvimento de novos sistemas bifásicos (CHRISTIAN et al., 1998; VENÂNCIO et al., 1993; 1995) têm sido enfatizados.

O exsudato do cajueiro, produzido pela *Anacardium occidentale* L., planta nativa do nordeste brasileiro, consiste num heteropolissacarídeo ramificado (arabinogalactana ácida) exsudado naturalmente ou através de incisões do tronco e ramos da árvore como uma goma ou resina (PAULA & RODRIGUES, 1995). Estudos preliminares indicam que o polissacarídeo apresenta características atrativas para aplicação como polímero constituinte de sistemas bifásicos aquosos.

Normalmente, os processos de extração de partículas biológicas têm sido realizados de modo descontínuo; recentemente, a utilização de processos contínuos tem recebido impulso com a extração contínua em colunas operando em contracorrente, uma vez que o processamento contínuo apresenta inúmeras vantagens como a automação do processo,

redução no tempo de processamento e menor espaço físico ocupado, uma vez que as unidades em contínuo são menos volumosas (KULA, 1990; BOLAND, 1990).

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

Definiu-se, como objetivo deste trabalho, o estudo da aplicação de um polímero regional de baixo custo à técnicas de separação bifásica aquosa. Pretendeu-se mostrar que os dados compilados ao longo das últimas três décadas, para sistemas bifásicos aquosos formados por polímeros como a Dextrana, podem ser transpostos para sistemas formados por polímeros alternativos.

Estudou-se ainda a implementação desses sistemas em um equipamento de extração que opera continuamente e com escoamento em contracorrente. Para esta finalidade, desenvolveu-se uma micro-coluna agitada por campânulas pulsantes. Visando promover uma agitação suave, para obtenção de um maior contato entre as fases no interior da coluna, evitando ao mesmo tempo a desnaturação e perda das principais propriedades das proteínas, devido a agitações muito fortes ou sistemas extratores muito agressivos. A avaliação do desempenho operacional deste equipamento, foi realizada com base na sua caracterização hidrodinâmica através do estudo da influência de variáveis geométricas e operacionais, tais como velocidade de pulsação, velocidade da fase dispersa e número de campânulas sobre a fração retida na fase dispersa, o coeficiente de transferência de massa e o índice de recuperação.

## 2. OBJETIVOS

### GERAL

Caracterizar e utilizar um novo sistema para partição bifásica aquosa de biomoléculas composto pelo sistema PEG4000/POLICAJU, pH:6,0.

### ESPECÍFICOS

- Determinar os diagramas de fases dos sistemas bifásicos formados por combinação do Polietileno glicol com o polissacarídeo do cajueiro (POLICAJU)
- Estudar a influência Da massa molar do Polietileno glicol e do pH nos diagramas de fases do sistema em estudo
- Determinar o coeficiente de partição de uma proteína modelo, a tripsina
- Estudar a influência da massa molar, do Polietileno glicol, comprimento da “tie-line” e pH na partição.
- Estudar o comportamento do sistema para processamento em contínuo através da utilização de uma micro-coluna com campânulas pulsantes e caracterizar hidrodinamicamente o equipamento por manipulação de variáveis geométricas e operacionais.

### **3. REVISÃO DA LITERATURA**

#### **3.1. EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO**

A maioria das técnicas de separação utilizadas no processo bioquímico industrial para a recuperação e isolamento de enzimas, tais como filtração e centrifugação, são altamente dependentes do tamanho da partícula. Os processos de separação sólido-líquido são, portanto, limitados quando células ou resíduos celulares são processadas. Por outro lado, a crescente importância das proteínas, da tecnologia do DNA recombinante de células procarióticas e eucarióticas, tem levado ao desenvolvimento de novos e mais eficientes métodos de separação e purificação. Técnicas de recuperação de proteínas têm sido desenvolvidas baseadas na partição líquido-líquido (KULA *et al.*, 1982; CASTRO & CABRAL, 1988). A extração líquido-líquido é um procedimento bem estabelecido em processos químicos industriais, incluindo algumas aplicações nas indústrias de fermentação tradicional, como por exemplo, a de antibióticos (HATTON, 1985). Entretanto, o uso de uma fase orgânica tem tido uma aplicação limitada no processamento de bioprodutos sensíveis, como proteínas, ácidos nucleicos e células, devido sua baixa solubilidade em solvente orgânico e o efeito desnaturante deste. Micelas reversas têm sido usadas na tentativa de superar este problema da solubilização em água e seu conteúdo na fase orgânica usando surfactantes. Entretanto, a separação de fases também pode ocorrer quando polímeros são adicionados em uma solução aquosa, como um resultado da incompatibilidade entre os mesmos (ALBERTSSON, 1986). Quando as concentrações dos polímeros excedem um certo valor, duas fases aquosas são formadas, as quais são biocompatíveis com as células e preservam a função biológica de proteínas e ácidos nucleicos com acentuada estabilidade.

#### **3.2. SISTEMAS BIFÁSICOS AQUOSOS**

Quando pares de polímeros solúveis em água ou um polímero solúvel e um sal são misturados com água acima de concentrações críticas, um sistema bifásico aquoso (SBA) é formado. Uma extensa lista destes sistemas foi desenvolvida por ALBERTSSON (1986) e pode ser analisada na TABELA 01. Os sistemas mais comumente usados são Polietileno glicol/Dextrana e Polietileno glicol/sais.

TABELA 01- Sistemas bifásicos aquosos e seus componentes

| Sistema Polímero/Polímero                       |                                |
|-------------------------------------------------|--------------------------------|
| Polímero                                        | Polímero                       |
| Polipropileno glicol                            | Metoxipolietileno glicol       |
|                                                 | Polietileno glicol             |
|                                                 | Álcool polivinílico            |
|                                                 | Polivinilpirrolidina           |
|                                                 | Hidroxipropil dextrana         |
| Polietino glicol                                | Álcool polivinílico            |
|                                                 | Polivinilpirrolidina           |
|                                                 | Dextrana                       |
|                                                 | Ficoll                         |
| Metilcelulose                                   | Hidroxipropil dextrana         |
|                                                 | Dextrana                       |
| Etilhidroxietilcelulose                         | Dextrana                       |
| Hidroxipropil dextrana                          | Dextrana                       |
| Ficoll                                          | Dextrana                       |
| Sistema Polímero/Soluto de Baixo Peso Molecular |                                |
| Polímero                                        | Soluto de Baixo Peso Molecular |
| Polipropileno glicol                            | Fosfato de potássio            |
|                                                 | Glicose                        |
|                                                 | Glicerol                       |
| Polietino glicol                                | Fosfato de potássio            |
| Metoxipolietileno glicol                        | Fosfato de potássio            |
| Polivinilpirrolidina                            | Fosfato de potássio            |

Cada SBA pode ser caracterizado por um único diagrama de fases, que contém a composição das fases em equilíbrio para o sistema. Os dados fundamentais para qualquer tipo de processo de extração líquido-líquido são as composições de equilíbrio das fases. No

caso do SBA, um diagrama de fases é necessário para auxiliar o desenvolvimento de modelos termodinâmicos para sua predição (DIAMOND & HSU, 1992).

### 3.2.1. Diagramas de Fases

Numa mistura de dois polímeros e água, um sistema de duas fases se formará somente quando os constituintes estão presentes em uma certa faixa de concentrações. A composição dos constituintes em cada fase separada pode ser representada por um diagrama de fases. A FIGURA 01 mostra um diagrama para um sistema polímero P/polímero Q. A concentração do polímero P é plotada na abscissa e a concentração do polímero Q na ordenada; as concentrações são expressas como porcentagem (massa/massa). A linha curva separando as duas áreas é chamada binodal. Todas as misturas que tem composições representadas pelos pontos acima da binodal são pontos de duas fases e os pontos abaixo representam uma solução homogênea (ZASLAVSKY, 1995).

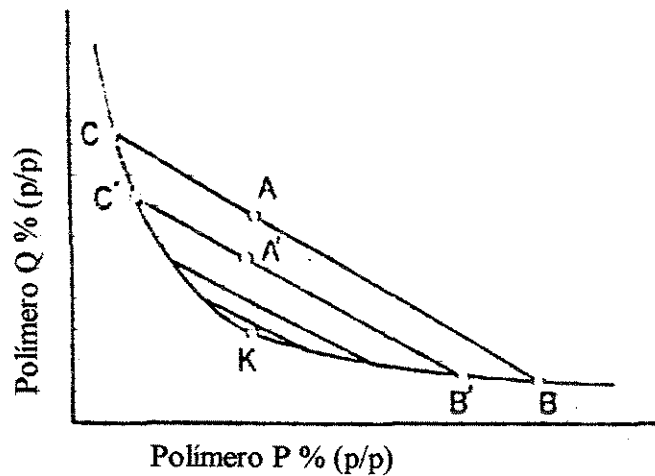


FIGURA 01- Diagrama de fases Polímero Q/Polímero P

Para descrever o SBA com mais detalhes, calculam-se as composições das duas fases que estão em equilíbrio. composições das fases inferior e superior obtidas neste sistema serão então representada pelos pontos B e C, respectivamente. Ao mesmo tempo, o ponto A representa a composição total do sistema B e C. Pares de pontos como B e C são chamados nós e a linha que os une é conhecida como linha de amarração ("tie-line"), sendo o ponto

crítico ( $K$ ), o ponto na binodal em que os volumes e as composições das duas fases teoricamente tornam-se iguais (ZASLAVSKY, 1995).

ALBERTSSON (1986) deduziu a expressão para a razão entre os volumes das fases superior (s) e inferior (i):

$$\frac{V_s}{V_i} = \frac{d_i}{d_s} \cdot \frac{AC}{AB}$$

No entanto, as densidades das duas fases não são muito diferentes da densidade da água, portanto, a razão de volumes entre as duas fases pode ser obtida aproximadamente a partir das distâncias AB e AC da "tie-line".

### 3.2.2. Diagrama Termodinâmico das Fases

Existem dois pontos de vista importantes na força motriz da separação de fases do sistema bifásico aquoso polímero/polímero. De um lado tem sido utilizada a teoria desenvolvida por FLORY (1941) e HUGGINS (1941) para descrever a termodinâmica que leva a separação das fases. O caminho mais simples para discutir suas hipóteses é primeiro apresentado na expressão geral da variação da energia livre de Gibbs de mistura à pressão e à temperatura constantes:

$$\Delta G_m = \Delta H_m - T\Delta S_m$$

onde  $\Delta G_m$ ,  $\Delta H_m$ ,  $\Delta S_m$  e  $T$  referem-se a variação da energia livre de Gibbs de mistura, à variação de entalpia de mistura, variação de entropia de mistura e temperatura, respectivamente. Se  $\Delta G_m$  é negativo, quando os dois polímeros são misturados com água, a solução será homogênea. Se  $\Delta G_m$  é positivo, a separação das fases ocorrerá. A teoria de Flory-Huggins sugere que se as concentrações das soluções de polímeros são baixas, existirá apenas um pequeno ganho na entropia na mistura dos polímeros em água. Entretanto, desde que a cadeia do polímero tem uma área superficial muito maior do que os compostos de

baixo peso molecular, as interações entre os segmentos das duas moléculas de polímeros, que são geralmente desfavoráveis, levará a um  $\Delta H_m$  positivo que dominará o  $\Delta G_m$  da expressão (FLORY, 1953). O  $\Delta G_m$  positivo resultará na separação das fases. Portanto, pode-se concluir que pelo uso da teoria de Flory-Huggins, a água não possui um papel importante na separação das fases, e sim apenas as interações dos polímeros.

Por outro lado, ZASLAVSKY e colaboradores (1989) têm defendido que a estrutura da água também deve ser considerada quando discutida a separação das fases. Suas razões são baseadas nas propriedades físico-químicas da água (tempo de relaxamento dielétrico, constante dielétrica, afinidade relativa da água para o grupo  $\text{CH}_2$  e polaridade total) nas fases dos sistemas, as quais foram diferentes. Além disso, eles basearam-se no fato de que alterando diferentes fatores (temperatura, solventes orgânicos, sais inorgânicos) efeitos similares são produzidos no comportamento do diagrama do SBA. O único ponto que esses fatores têm em comum é afetar a estrutura da água.

### **3.2.3. Fatores que Influenciam o Comportamento das Fases**

O diagrama de fases pode ser influenciado por muitos fatores incluindo massa molar do polímero, temperatura, força iônica e pH, embora os efeitos e mecanismos pelo qual estes influenciam a separação das fases não estejam completamente elucidados (DIAMOND & HSU, 1992).

#### **3.2.3.1. Massa Molar dos Polímeros**

Na FIGURA 02 o efeito do peso molecular da dextrana no diagrama de fases PEG/Dextrana é mostrado. Com o aumento do peso molecular da dextrana, necessita-se de uma menor concentração deste polímero para ocorrer a separação das fases. Em geral, o aumento do peso molecular diminui a concentração de polímero necessária para separação das fases, e quanto maior a diferença no peso molecular entre os dois polímeros mais assimétrica é a binodal (ZASLAVSKY, 1995).

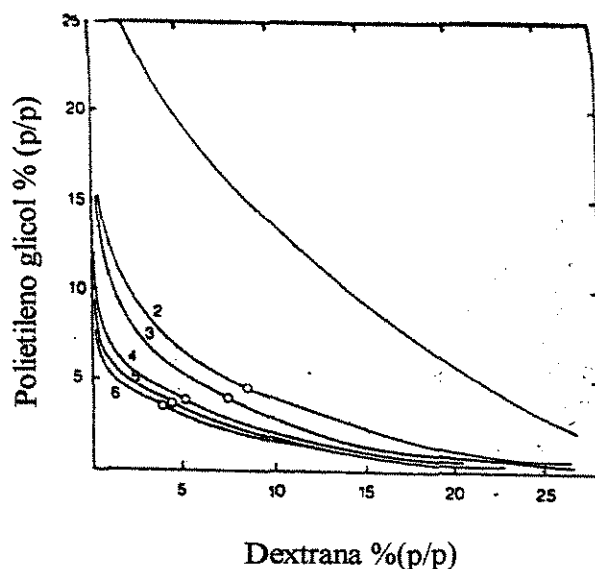


FIGURA 02- Efeito do peso molecular da dextrana no diagrama de fases PEG 6000/Dextrana 1 D5 (PM = 3.400); 2 D17 (PM = 30.000); 3 D24 (PM = 40.500); 4 D37 (PM = 179.000); 5 D48 (PM = 460.000); 6 D68 (PM = 2.200.000)

### 3.2.3.2. *Hidrofobicidade do Polímero*

Organizando-se as soluções de polímeros em uma escala de hidrofobicidade, ALBERTSSON (1986) obteve a seguinte sequência: sulfato de dextrana < carboximetildextrana < dextrana < hidroxipropildextrana < metilcelulose < álcool polivinílico < polietileno glicol < polipropileno glicol. Se todas essas soluções contêm principalmente água, elas deverão cair em uma faixa estreita desta escala. O ponto principal é que temos um número de líquidos imiscíveis que estão todos muito próximos uns dos outros. Isto significa que as fases dos sistemas formados por estes solventes devem ser seletivas em separar substâncias que estejam próximas a elas na escala, com o mesmo conteúdo de água como solvente, como por exemplo, biomoléculas.

Um sistema bastante analisado para a diferença da hidrofobicidade entre dois polímeros é o polietileno glicol/hidroxipropildextrana. Foram testadas três hidroxipropildextranas de diferentes graus de substituição, número de grupos hidroxipropil, com o peso molecular da mesma ordem de grandeza. O polietileno glicol forma duas fases

com dextrana ou com a hidroxipropildextrana com menor grau de substituição, mas não com as outras duas hidroxipropildextranas com maiores conteúdos de hidroxipropil. Assim, quanto maior o número de grupos hidrofóbicos na estrutura da dextrana, mais compatível será o polímero com o PEG. Usualmente pode-se correlacionar uma certa diferença na hidrofobicidade entre dois polímeros com suas tendências para separação das fases, ou seja, quanto maior é a diferença de hidrofobicidade entre dois polímeros, menor a concentração de polímeros necessária para separação das fases (ALBERTSSON, 1986).

#### 3.2.3.3. *Temperatura*

O diagrama de fases do sistema depende da temperatura. Entretanto, o efeito da temperatura é muito diferente dependendo do tipo de polímero usado. Por exemplo, um sistema PEG/fosfato de potássio (PEG/sal) formará duas fases mais facilmente em temperaturas mais altas, ou seja, nestas condições uma menor concentração de polímero ou sal será necessária para separação das fases. Pelo contrário, o sistema PEG/Dextrana (polímero/polímero) forma fases mais facilmente a temperaturas mais baixas, enquanto o sistema metilcelulose/Dextrana não é muito afetado pela temperatura (DIAMOND & HSU, 1992; ZASLAVSKY, 1995).

#### 3.2.3.4. *Tempo de Separação das Fases*

O tempo requerido para que as fases separem-se varia consideravelmente para diferentes sistemas. Isto depende da diferença na densidade entre as duas fases e suas viscosidades, mas também do tempo necessário para que, pequenas gotículas formadas durante a agitação, coalesçam em gotas maiores. Perto do ponto crítico a diferença da densidade é pequena e o tempo de separação é grande. Longe do ponto crítico, a concentração de polímeros e a viscosidade são altas, o que torna o tempo de separação também longo para estes sistemas. Assim, para composições intermediárias, o tempo de separação é menor (ALBERTSSON, 1986).

Em um dado sistema, o tempo de separação também depende da relação dos volumes das duas fases se estes têm viscosidades diferentes. Se a fase mais viscosa é maior em volume do que a outra fase, o tempo de separação é maior do que se a fase mais viscosa

tem um volume semelhante ou menor do que a outra fase. Os sistemas PEG/sal e PEG/Dextrana têm um tempo de separação pequeno (5-30 minutos) enquanto os sistemas Ficoll/Dextrana ou Metilcelulose/Dextrana usualmente têm um tempo de separação maior (1-6 horas). Esses tempos dados são os necessários para o volume principal das fases separar, ou seja, até que uma interface horizontal tenha sido formada. Usualmente pequenas gotas das fases permanecem por um longo tempo, mesmo depois que a interface horizontal é evidenciada (ALBERTSSON, 1986).

#### 3.2.3.5. *Adição de sais*

O efeito da adição de sais no diagrama de fases varia com o sal adicionado e com o sistema bifásico aquoso. Os sistemas contendo polímeros não iônicos como o Polietileno glicol e a Dextrana, praticamente não são afetados pela adição de baixas concentrações de sais univalentes (exemplo, o NaCl), que possuem coeficiente de partição próximo a 1. ZASLAVSKY e colaboradores (1986; 1987) demonstraram que o aumento da concentração de sais monovalentes (maiores que 0,1 M) em sistemas PEG-Dextrana altera a composição das fases sem provocar alterações significativas na binodal. Contudo, sais multivalentes como fosfato e sulfato possuem preferência para a fase inferior rica em Dextrana, alterando assim a composição das fases e deslocando a binodal para a origem do diagrama de fases. O efeito do tipo e concentração de sais nos sistemas PEG-Dextrana, no entanto, não pode ser generalizado para outros sistemas. Já a separação das fases em sistemas contendo polímeros carregados é bastante dependente da composição iônica. Quanto a adição de sais a sistemas constituídos por polímero-sal, quanto maior a carga do ânion, mais baixa a concentração de sal necessária para que ocorra a separação das fases. Relativamente aos cátions, a tendência para formar duas fases segue a ordem  $\text{Na}^+ > \text{Mg}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Li}^+$ . Contudo, a contribuição do ânion para a eficácia de um determinado sal em promover a separação das fases é muito mais importante do que a contribuição do cátion (ALBERTSSON, 1986; DIAMOND & HSU, 1992).

#### 3.2.3.6. *pH*

O efeito do pH na separação das fases foi estudado por HUDDLESTON e colaboradores (1991) para o sistema PEG-fosfato de potássio. Observou-se que o aumento do pH de 6,0 para 9,2 deslocou a binodal no sentido de menores concentrações de polímero e sal.

### 3.2.4- Propriedades Físico-Químicas das Fases

O comportamento do SBA depende das propriedades físico-químicas das fases.

#### 3.2.4.1. *Viscosidade*

O aumento do peso molecular dos polímeros aumenta a viscosidade, porém, menores concentrações de polímeros com peso molecular maiores são requeridas para separação das fases. Como a viscosidade da solução do polímero é fortemente dependente da concentração, a viscosidade de uma das fases pode ser reduzida pelo uso de uma fração de maior peso molecular. As fases formadas não são sempre líquidas. Dependendo do tipo do polímero usado, uma fase pode ser altamente viscosa ou formar um gel. Dextrana forma sistemas com fase líquida com PEG com peso molecular acima de 1000. Quando PEG's de peso molecular menores são utilizados, a dextrana forma uma fase sólida ou gel (ALBERTSSON, 1986).

#### 3.2.4.2. *Densidade das Fases*

Devido ao alto conteúdo em água, a densidade das fases é próxima a 1. A diferença de densidade entre as fases neste sistema é também pequena, sendo no entanto maior em sistemas PEG/fosfato (0,04 - 0,1) do que em sistemas PEG/Dextrana (0,02 - 0,07) (KULA, 1985).

#### 3.2.4.3. *Tensão Interfacial*

A tensão interfacial entre as duas fases é muito pequena. Na menor concentração dos polímeros, que é a composição próxima do ponto crítico, a tensão interfacial é menor. Esta baixa tensão interfacial minimiza a desnaturação de biomoléculas que ficam na interface, preservando a sua atividade biológica. A tensão interfacial é mais elevada em sistemas PEG/sal do que em sistema PEG/Dextrana (KULA, 1985).

#### 3.2.4.4. *Pressão Osmótica*

A pressão osmótica das fases é pequena devido aos elevados pesos moleculares dos polímeros formadores das fases. Quando as fases estão em equilíbrio, a pressão osmótica é a mesma para ambas. Em elevadas concentrações dos polímeros, a pressão osmótica é independente do peso molecular (ALBERTSSON, 1986).

### 3.3. PARTIÇÃO DE BIOMOLÉCULAS EM SISTEMAS BIFÁSICOS AQUOSOS

A distribuição das substâncias solúveis como proteínas e ácidos nucleicos entre as fases do sistema bifásico aquoso é caracterizada pelo coeficiente de partição, que é definido pela equação

$$K = \frac{C_s}{C_i}$$

Onde  $C_s$  e  $C_i$  são as concentrações de equilíbrio dos compostos particionados nas fases superior e inferior, respectivamente. O coeficiente de partição das enzimas é constante para um dado sistema em uma estreita faixa de concentração, não contemplando a associação ou dissociação de proteínas oligoméricas presentes em uma das fases (CABRAL & AIRES-BARROS, 1993).

Formalmente, pode-se escrever o logaritmo do coeficiente de partição em vários fatores separadamente:

$$\ln K = \ln K^{\circ} + \ln K_{el} + \ln K_{hfob} + \ln K_{biosp} + \ln K_{tamanho} + \ln K_{conf}$$

onde el, hfob, biosp, tamanho e conf significam as contribuições eletroquímica, hidrofóbica, bioespecífica, tamanho e conformacional para o coeficiente de partição, das propriedades estruturais e condições ambientais do sistema e  $\ln$  de  $K^{\circ}$  inclui outros fatores. Portanto, o coeficiente de partição da proteína pode também ser expresso como (DIAMOND & HSU, 1992):

$$\ln K = \ln K_{ambiente} + \ln K_{estrutura}$$

A reprodutibilidade do K é normalmente na faixa de  $\pm 5\%$  para qualquer volume analisado (KULA *et al.*, 1982).

Devido a capacidade da interface adsorver materiais biológicos, ela pode desempenhar um papel importante na partição entre as duas fases do sistema. No estudo da partição de partículas em suspensão, como células e organelas celulares, tem que ser consideradas três regiões de partição: a fase superior, a interface e a fase inferior, pois a interface adsorve quantidades significativas do biomaterial. O mesmo, normalmente, não ocorre para a partição de substâncias solúveis (ALBERTSSON, 1986).

A partição entre as duas fases depende de muitos fatores. Isto é esperado desde que as interações entre a substância particionada e os componentes de cada fase é um fenômeno complexo envolvendo pontes de hidrogênio, interação de carga, força de van der Waals, interações hidrofóbicas e efeitos estéreos. Deste modo, a partição depende do peso molecular e propriedades químicas das moléculas ou partículas particionadas. Para partículas, a partição é principalmente em função dos grupos expostos na superfície que ficam em contato com os componentes das fases. Qualquer molécula acumulará na fase onde o número máximo de interações é possível e um conteúdo mínimo de energia do sistema é alcançado (KULA *et al.*, 1982).

Os diferentes fatores que determinam a partição podem ser explorados separadamente ou em combinação para alcançar uma separação efetiva. Pode-se também

ampliar alguns desses fatores que dominam o comportamento da partição. Com respeito as substâncias particionadas vários tipos de fatores que interferem na partição podem ser distinguidos (ALBERTSSON, 1986):

1. Partição dependente do tamanho: tamanho da molécula ou da área da superfície das partículas é o fator dominante.
2. Eletroquímico: o potencial elétrico entre as fases é usado para separar moléculas ou partículas de acordo com suas cargas.
3. Afinidade hidrofóbica: propriedades hidrofóbicas das fases do sistema é usada para separação de acordo com a hidrofobicidade das moléculas ou partículas.
4. Afinidade bioespecífica: a afinidade entre sítios nas moléculas ou partículas e ligantes presentes nos polímeros das fases é usado para separação.
5. Dependência conformacional: conformação das moléculas e partículas é o fator determinante.
6. Quiral: formas enantioméricas são separadas.

Os fatores que determinam a partição podem ser estudados pela diferença na partição, ou seja, a partição pode ser comparada para dois sistemas bifásicos aquosos que difiram em apenas um parâmetro. O primeiro sistema (sistema de referência) dará um certo coeficiente de partição  $K_1$ . O segundo SBA é idêntico ao sistema de referência, exceto por um parâmetro, por exemplo, o potencial elétrico interfacial, número dos grupos hidrofóbicos ou ligantes bioespecíficos. O coeficiente de partição nesta fase será  $K_2$ . A diferença ( $\Delta \log K = \log K_2 - \log K_1$ ) deve refletir o efeito do parâmetro na partição. Assim, se a composição iônica é alterada, e então o potencial elétrico, o  $\Delta \log K$  dará a informação na carga superficial do biomaterial se a mudança no potencial for conhecida. Por este método pode-se compreender as propriedades da superfície das partículas ou moléculas (ALBERTSSON, 1986).

### **3.3.1- Fatores que Afetam a Partição de Biomoléculas**

#### *3.3.1.1- Concentração dos Polímeros*

Próximo ao ponto crítico do sistema, moléculas como proteínas se particionam quase igualmente entre as fases. Se a concentração do polímero é aumentada, ou seja, a composição das fases do sistema desvia mais do ponto crítico, a partição da proteína terá preferência por uma das fases. Existem exceções a esta regra, como por exemplo, o coeficiente de partição pode primeiro aumentar com o aumento da concentração do polímero, passar por um máximo, e então diminuir (DIAMOND & HSU, 1992).

No caso de partículas celulares, isto favorecerá completamente a fase superior ou inferior quando o sistema está próximo ao ponto crítico, ou seja, não existe adsorção na interface. Quando a concentração de polímero é aumentada as partículas tendem a ser mais absorvidas na interface. Assim, se as partículas estão na fase superior próximo ao ponto crítico, elas serão removidas desta fase para interface e as vezes da fase inferior quando a concentração do polímero é aumentada. Dependendo das propriedades da superfície das partículas elas serão removidas seletivamente para fase de cima. Quanto mais distante do ponto crítico, maior a concentração dos polímeros e maior a tensão interfacial (ALBERTSSON, 1986).

#### 3.3.1.2. *Massa Molar do Polímero*

A partição será favorecida pela fase contendo o polímero com menor peso molecular, ou seja, a substância particionada será mais atraída pelo polímero de menor molécula e mais repelida pelo polímero de maior massa molar, desde que todos os outros fatores como, concentração do polímero, composição dos sais, temperatura e assim por diante, sejam mantidos constantes. Pequenas moléculas tal como aminoácidos ou pequenas proteínas não são muito afetadas como moléculas de proteínas maiores (CABRAL & AIRES-BARROS, 1993).

#### 3.3.1.3. *Massa Molar da Substância Particionada*

Quanto maior o tamanho da molécula, maior é a superfície exposta que pode interagir com os componentes das fases. A equação de Brønsted descreve qualitativamente a

partição da molécula em função de sua massa molar e o fator  $\lambda$ , que é um valor desconhecido. (BRØNSTED, 1931; BRØNSTED & WARMING, 1931):

$$K = e^{(\lambda MkT)}$$

onde K é o coeficiente de partição;  $\lambda$  é um parâmetro que caracteriza as fases do sistema e as interações com o composto de interesse; M é a massa molar; k a constante de Boltzmann e T a temperatura absoluta.

Geralmente, para substâncias de baixa massa molar, tal como sais inorgânicos, açúcares, aminoácidos e nucleotídeos, a partição é quase igual entre as duas fases, ou seja, o valor do coeficiente de partição é aproximadamente 1. Entretanto, o valor do coeficiente de partição de algumas destas substâncias pode-se desviar consideravelmente de 1, como mostrado pelo estudo de JOHANSSON (1970).

Sulfatos e fosfatos possuem valores de K significativamente menores do que 1. Ácidos polibásicos, tais como, fosfórico, cítrico e oxálico, têm K maiores que 1, enquanto seus sais têm K menores do que 1. No caso do fosfato, o K diminui com o aumento da carga do íon fosfato. Entre os compostos aromáticos, a piridina tem um K em torno de 1, enquanto fenol e naftol tem K muito maior do que 1. É claro que, embora, a maioria das substâncias de baixa massa molar distribuam-se praticamente de forma igual entre as fases, existem muitas exceções que não obedecem esta regra (ALBERTSSON, 1986).

#### 3.3.1.4. *Adição de sais*

A adição de sais, mesmo em concentrações milimolares, influencia fortemente a partição de materiais carregados eletricamente. Embora os sais se distribuam quase que igualmente entre as fases, existem pequenas mas significantes diferenças nos coeficientes de partição de diferentes sais, o que significa que diferentes íons possuem diferentes afinidades pelas fases, criando uma diferença de potencial elétrico entre as fases, que por sua vez direciona a partição de materiais biológicos carregados. Mesmo em SBA formados por dois polímeros sem carga, caso do sistema PEG-Dextrana, alguns íons mostram diferentes afinidades para as fases. A influência de diferentes sais na partição de proteínas a baixas concentrações foi estudada no sistema PEG-Dextrana (ALBERTSSON, 1986). Para

proteínas carregadas negativamente, os cátions diminuem o coeficiente de partição na ordem  $\text{Li}^+ < \text{NH}_4^+ < \text{Na}^+ < \text{Cs}^+ < \text{K}^+$  e os ânions monovalentes na ordem  $\text{F}^- < \text{Cl}^- < \text{Br}^- < \text{I}^-$ . Os ânions bivalentes diminuem o coeficiente de partição na ordem  $\text{HPO}_4^{2-} < \text{SO}_4^{2-}$ . O efeito é oposto para proteínas carregadas positivamente. Assim, para se obter um elevado coeficiente de partição para proteínas carregadas negativamente, deve-se usar monohidrogeno fosfato de sódio ou lítio. Por outro lado, para se obter um menor coeficiente de partição, deve-se usar cloreto ou brometo de potássio. Uma vez que a carga na maioria dos materiais biológicos é dependente do pH, a escolha deste e de um sal pode constituir um modo efetivo de ajuste da partição (WALTER & JOHANSSON, 1986). A dependência do coeficiente de partição para concentrações elevadas de sais no sistema PEG-Dextrana também foi explorada por ALBERTSSON (1986) para o NaCl. A forças iônicas mais elevadas ( $> 1,0 \text{ M}$ ), a partição de proteínas é fortemente influenciada pela concentração do sal. O aumento do coeficiente de partição com o aumento da concentração de NaCl pode ser atribuído a um aumento das interações hidrofóbicas com o Polietileno glicol ou a efeitos do "salting-out". Apesar do Polietileno glicol ser hidrofílico, suas interações com os domínios hidrofóbicos das proteínas podem aumentar para concentrações elevadas de sal. Este efeito é muito comum em partição de proteínas, sendo observado principalmente em sistemas de PEG-Dextrana com NaCl.

Em sistemas polímero-sal, a partição de material biológico é fortemente influenciada pela concentração do sal, o que pode ser atribuído a efeitos de "salting-out" (KULA et al., 1982). Em sistemas de PEG-Sal, um aumento do comprimento da "tie-line" promove a transferência das proteínas da fase rica em sal para a fase rica em PEG ou, caso a solubilidade das proteínas nesta fase não seja suficientemente elevada, há a precipitação destas na interface.

#### 3.3.1.5. Interações Hidrofóbicas

O efeito elétrico pode ser anulado a partir da escolha de uma composição de sal desejável para o SBA, de modo que, a diferença do potencial elétrico entre as fases torne-se zero. Conseqüentemente, outros fatores determinantes da partição tornam-se mais importantes, tais como propriedades hidrofóbicas-hidrofílicas das superfícies das partículas (ZASLAVSKY, 1995).

O efeito hidrofóbico pode ser aumentado por ligações covalentes de grupos hidrofóbicos a um dos polímeros, dependendo do tamanho do grupo hidrofóbico ligado ao polímero e do número e força das ligações das regiões hidrofóbicas da molécula da proteína. (SHANBHAG & JOHANSSON, 1974; SHANBHAG & AXELSSON, 1975). Se a proteína, por exemplo, contém superfície ou regiões com grupos ligantes hidrofóbicos, seu coeficiente de partição será alterado. Assim, a chamada partição por afinidade hidrofóbica pode ser usada para caracterizar as propriedades das proteínas ou partículas de células e também para a separação de moléculas ou partículas de diferentes hidrofobicidade (ALBERTSSON, 1986).

#### 3.3.1.6. *Afinidade Bioespecífica*

A partição por afinidade bioespecífica foi introduzida por SHANBHAG & JOHANSSON (1974), que demonstraram que a albumina de soro humano pode ser seletivamente extraída do plasma pelo PEG-palmitato, no sistema PEG/Dextrana. Ligantes bioespecíficos acoplados a um dos polímeros podem influenciar fortemente a partição de moléculas ou partículas que tenham afinidade pelo ligante. Esta influência varia com o número de sítios presentes nas moléculas e partículas que possam ser ligados e do número de ligantes acoplados ao polímero.

#### 3.3.1.7. *Conformação da Biomolécula*

Sistemas bifásicos aquosos com potencial interfacial zero podem ser obtidos pela escolha de um sal desejável ou mistura de sais. A partição de proteínas em tais sistemas seria independente da carga líquida da proteína, ou seja, independente do pH. Algumas proteínas também apresentam um coeficiente de partição constante sob uma grande faixa de pH no SBA com potencial interfacial zero (JOHANSSON & HARTMAN, 1974). Outras proteínas apresentam mudanças em certos intervalos de pH. Em alguns casos, isto ocorre quando a proteína sofre uma alteração conformacional, tal como no caso da albumina sérica em pH baixo, ou quando moléculas de proteínas formam dímeros, como com a lisozima. Para tais proteínas, o  $K^o$  não é independente do pH e a partição em sistemas com potencial interfacial zero seria então usada para detectar mudanças na conformação, quando, por exemplo,

grupos previamente escondidos são expostos na superfície da proteína, ou no estudo do fenômeno associação-dissociação entre as proteínas (ALBERTSSON, 1986)

#### 3.3.1.8. *Quiralidade da molécula*

Formas enantioméricas de moléculas devem se particionar diferentemente em um SBA contendo componentes opticamente ativos. Os polímeros Dextrana, Ficoll, amido e celulose são todos opticamente ativos e devem distinguir as formas D e L das moléculas. Também, uma proteína ligada que possa selecionar as formas D ou L e ser enriquecida em uma das fases pode ser usada para partição quiral. D e L triptofano foram separados pelo SBA contendo albumina de soro (EKBERG *et al.*, 1985).

#### 3.3.1.9. *Temperatura*

A temperatura é um fator importante na partição. O diagrama de fases depende da temperatura, particularmente próximo do ponto crítico, onde uma pequena alteração na temperatura terá uma influência considerável na composição dos polímeros e também na partição da substância no SBA. A temperatura tem menor influência na partição a valores mais distantes do ponto crítico (CABRAL & AIRES-BARROS, 1993).

### 3.3.2. *Termodinâmica da partição*

O banco de dados para SBA é pobre no que se refere à seleção e concentração de sais adicionados, pH, temperatura e peso molecular dos polímeros adequados para se obter um fator de purificação satisfatório. Adicionalmente, estas condições devem ser ajustadas ao tipo de biomolécula a ser particionada. Assim é fundamental estabelecer métodos que possibilitem a predição do comportamento das variáveis do sistema, para tornar o processo de purificação comercialmente viável.

Vários modelos teóricos que descrevem as propriedades termodinâmicas de SBA e a partição de proteínas nestes sistemas têm sido propostos. DIAMOND & HSU (1989) utilizaram uma forma modificada da teoria de FLORY-HUGGINS (1941) para correlacionar a partição de proteínas em sistemas PEG-Dextrana. KING e colaboradores (1988)

modelaram com sucesso a partição de proteínas em sistemas PEG-Dextrana, na presença de sais, usando um modelo termodinâmico-molecular baseado na equação do virial. Além destes, vários outros modelos teóricos e experimentais têm sido desenvolvidos por pesquisadores em todo mundo (EITMANN & GAINER, 1992; GROßMANN & GAINER, 1988; GROßMANN *et al.*, 1998; LIN *et al.*, 1999; TINTINGER *et al.*, 1997).

De fato, estes modelos facilitam o desenvolvimento dos fundamentos termodinâmicos para SBA (KULA, 1990). No entanto, muitos deles são limitados não só devido à dificuldade em se determinar seus parâmetros, mas também pelo fato de que o grande número de parâmetros e sua variação com a composição do sistema requerem um elevado número de experimentos independentes (BASKIR *et al.*, 1989). Conseqüentemente, o banco de dados de métodos capazes de correlacionar e prever o comportamento de partição de materiais biológicos em SBA está longe de se tornar adequado para aplicações industriais.

### **3.4. APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS**

Uma das características atrativas da extração líquido-líquido é a facilidade de "scale-up". Isto deve-se ao fato de que o coeficiente de partição para substâncias solúveis em muitos casos é independente do volume total das fases do sistema, da razão de volume e da concentração da substância a ser particionada para uma larga faixa de concentração. O comportamento da partição em larga escala para o SBA pode então ser pré-definido com grande exatidão em experimentos laboratoriais conduzidos em pequenos tubos testes. Desta forma, a mistura e o rápido equilíbrio de fases são facilmente alcançados, requerendo relativamente pouca energia (ALBERTSSON, 1986).

#### **3.4.1. Concentração**

Muitas substâncias de interesse biotecnológico estão disponíveis em soluções diluídas ou em suspensões, como culturas líquidas de bactérias, algas ou vírus ou um extrato enzimático. O início do processo de isolamento e purificação, nestes casos, é realizado a partir de grandes volumes, sendo necessário um primeiro passo de concentração do material

que pode ser obtido a partir da utilização de um SBA. Um SBA pode levar a uma concentração efetiva desde que possa ser selecionado de tal maneira que a maioria das substâncias desejadas sejam transferidas para a fase com menor volume, quando comparada à solução original. No entanto, várias impurezas podem estar presentes juntamente com o produto desejado, o que não é adequado. Por outro lado, vários passos de purificação podem ser realizados a fim de se obter o produto desejado livre de contaminantes (CABRAL & AIRES-BARROS, 1993).

### **3.4.2. Purificação de Biomoléculas em Larga Escala**

A partição pelo sistema bifásico aquoso tem as seguintes vantagens para a purificação de biomoléculas em larga escala (ALBERTSON, 1986):

1. O "scale-up" pode seguramente ser alcançado a partir de experimentos de laboratório.
2. Rápida transferência de massa e equilíbrio são alcançados, através de uma pequena quantidade de energia na forma de mistura mecânica. Geralmente, o equilíbrio entre as fases é alcançado rapidamente, em segundos, pela agitação do SBA. Provavelmente devido a baixa tensão interfacial, que permite uma dispersão muito fina de uma fase na outra, mesmo com agitação suave.
3. Pode ser desenvolvido como um processo contínuo.
4. Os polímeros estabilizam as enzimas. Nenhum sinal de desnaturação ou perda na atividade biológica, tal como atividade enzimática, tem sido observado depois do experimento de partição em SBA polímero/polímero, quando a partição é realizada em pH e concentração de sal adequados. Os polímeros usados são polissacarídeos ou polióis que são conhecidos por estabilizar certas enzimas.
5. A separação pode ser seletiva e rápida.
6. A rápida separação permite a utilização da temperatura ambiente, ao invés de baixas temperaturas, tendo um menor custo de investimento.
7. É mais econômico do que outros métodos de purificação.

### 3.4.3. Bioconversão

Sistemas bifásicos aquosos podem ser usados para a produção e purificação simultânea de bioprodutos usando enzimas ou microrganismos. O biocatalisador (enzima ou suspensão celular) é confinado em uma das fases junto com o substrato enquanto o produto se particiona para a outra fase. O produto pode ser removido por repetidos passos de partição ou pelo procedimento de extração contínua (CABRAL & AIRES-BARROS, 1993). Além de sistemas utilizando células animais, como células de hibridoma de rato para produção de antibiótico em sistema PEG/Dextrana (ZIJLSTRA *et al.*, 1996), células vegetais, como de células de raízes de *Tagetes patula* também foram usadas para produção de metabólitos secundários (BUITELAAR *et al.*, 1992).

A extração pode ser usada para remover o produto da reação enzima-substrato, favorecendo a purificação, e também com o propósito de aumentar a velocidade de reação se a enzima for inibida pelo produto, como freqüentemente acontece (CABRAL & AIRES-BARROS, 1993). Na TABELA 02 encontram-se alguns exemplos de bioconversão utilizando enzimas e microrganismos.

TABELA 02- Bioconversão extrativa utilizando enzimas e microrganismos como catalisadores em sistemas bifásicos aquosos

| Enzima                                | Conversão                                      | Sistema                                                             | Referência                            |
|---------------------------------------|------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| Penicilina G acilase                  | D(-) PG metil éster → cefalexina (antibiótico) | PEG/Dextrana<br>PEG/(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | HERNANDEZ-JUSTIZ <i>et al.</i> , 1998 |
| α-amilase<br>e papaína                | Hidrólise do amido<br>e hemoglobina            | PEG/Dextrana                                                        | KONDO <i>et al.</i> , 1994            |
| α-quimotripsina e<br>tripsina         | Proteólise da caseína                          | PEG/Dextrana                                                        | MUKATAKA <i>et al.</i> , 1992         |
| β-galactosidases                      | Lactose → glicose                              | PEG/Reppal PES<br>PEG/sais                                          | CHEN & WANG, 1991                     |
| β-galactosidase                       | Lactose → glicose                              | PEG/pullulana                                                       | NGUYEN <i>et al.</i> , 1988           |
| Microrganismo                         | Produção                                       | Sistema                                                             | Referência                            |
| <i>Escherichia coli</i>               | Produção das proteínas<br>termoresistentes     | PEG/Dextrana                                                        | UMAKOSHI <i>et al.</i> , 1996         |
| <i>Serratia marcescens</i>            | Quitinase                                      | PEG/Dextrana                                                        | CHEN & LEE, 1995                      |
| <i>Bacillus<br/>amyloliquefaciens</i> | α-amilase                                      | PEG/Dextrana                                                        | PARK & WANG, 1991                     |
| <i>Bacillus licheniformis</i>         | Protease alcalina                              | PEG/Dextrana                                                        | LEE & CHANG, 1990                     |

### 3.5. SISTEMAS BIFÁSICOS AQUOSOS MAIS ESTUDADOS

Existe uma grande variedade de polímeros hidrofílicos, 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 SBA 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 SBA 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 razoáveis, 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 & YALPANI, 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 que exclusivamente a sistemas PEG-Sais. 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.

Sistemas bifásicos PEG-Sais apresentam, no entanto, alguns problemas que limitam sua aplicabilidade. Estes sistemas formam-se com elevadas concentrações de sal em ambas as fases, normalmente superiores a 1 molar, o que pode causar a desnaturação de estruturas biológicas (LIN et al., 1996; KULA et al., 1989). Estes sistemas apresentam ainda o

inconveniente de adicionarem elevadas concentrações de fosfatos e sulfatos aos efluentes industriais. Para superar este problema, estudos com o sistema PEG-Citrato têm sido efetuados para a substituição dos sistemas anteriores (VENÂNCIO, 1996).

Outro forma de evitar o inconveniente do elevado custo associado ao sistema PEG-Dextrana reside na utilização de polímeros alternativos. Nos últimos anos, devido a necessidade de desenvolvimento de novos sistemas, um elevado número de polímeros tem sido testado com vistas a aplicação em sistemas bifásicos aquosos.

### 3.6. SISTEMAS BIFÁSICOS ALTERNATIVOS

Um amplo espectro de polímeros tem sido testado para a obtenção de sistemas bifásicos aquosos. Para o campo da pesquisa, a maioria dos sistemas são aceitos, mas quando são extrapolados para a escala industrial, outros critérios devem ser avaliados. O custo do polímero, o tempo da separação das fases, a quantidade necessária para formação do sistema bifásico, e a possibilidade do reciclo do polímero, são fatores de grande importância (MATTIASSON & LING, 1987).

Apesar do sistema PEG/Dextrana ser clássico, a dextrana é extremamente cara para ser utilizada industrialmente devido ao seu elevado custo de purificação (NILSSON *et al.*, 1987), exceto para alguns casos raros, quando produzem-se compostos de alto valor agregado. Como alternativa tem-se proposto o uso da dextrana não purificada. Com este recurso pretende-se manter as propriedades de partição do sistema reduzindo substancialmente o custo associado a aplicação em grande escala. No entanto, estes sistemas possuem alta viscosidade e conseqüentemente uma lenta separação (KRONER *et al.*, 1982).

Em muitos casos, a eficiência do uso de sais como componentes da fase inferior tem sido testada. O sistema PEG/sulfato de potássio foi usado para o isolamento de enzimas em larga escala (HUSTEDT *et al.*, 1983). Os sistemas PEG/sais possuem a vantagem dos componentes serem relativamente baratos, embora não sejam adequados para a partição por afinidade, devido a sua elevada força iônica e pela possibilidade de desnaturação de materiais com atividade biológica. Além destes sistemas apresentarem o inconveniente de adicionarem elevadas concentrações de sais, como fosfatos e sulfatos, nos efluentes industriais.

De acordo com a análise econômica da primeira etapa da separação de células mortas, por exemplo, o custo desta etapa de extração com SBA foi estimado por ser três quartos do preço dos componentes das fases: PEG e sal (DATAR, 1986). O custo total foi, na melhor das hipóteses, semelhante ao da microfiltração de fluxo tangencial. Esta análise mostra que o preço do polímero é aproximadamente o parâmetro que determina a viabilidade econômica do método de extração. Um outro exemplo foi a avaliação do custo de extração de enzimas intracelulares, em torno de metade a dois terços do custo da primeira etapa da recuperação (MATTIASSON & LING, 1987).

Diferentes polímeros, tais como a dextrana bruta (KRONER *et al.*, 1982) derivados de amido (TJERNELD *et al.*, 1986 e VENÂNCIO & TEIXEIRA, 1993), álcool polivinílico (TJERNELD, 1989), maltodextrina (SZLAG & GUILIANO, 1988), derivados de celulose (SKUSE *et al.*, 1992), derivados de goma de guar (VENÂNCIO *et al.*, 1995) e arabinogalactana (CHRISTIAN *et al.*, 1998), têm sido testados indicando que estes devem ser considerados como alternativas a Dextrana fracionada.

A utilização do hidroxipropilamido, denominado comercialmente como Aquaphase PPT, foi reportado por TJERNELD (1986) como alternativa à dextrana, já que apresenta um décimo do preço. Sua utilização comparada ao sistema tradicional reduziu em sete vezes o custo do SBA. O Reppal PES, nome comercial de um derivado do hidroxipropilamido semelhante ao Aquaphase PPT, tem sido aplicado com sucesso como substituto da dextrana em bioconversões extrativas (JOHANSSON & JOELSSON, 1985). Estes derivados do amido foram especialmente desenvolvidos para separações em duas fases aquosas, porém ainda são economicamente inviáveis, embora sejam mais baratos que a dextrana fracionada.

SKUSE e colaboradores (1992), estudaram um sistema formado por Pluronic P105, um copolímero constituído por blocos intercalados de óxido de polipropileno e óxido de polietileno, e por Klucel L, um hidroxipropil celulose. Este sistema possui diagramas de fases similares aos obtidos para o sistema PEG/Dextrana, mas com o inconveniente da elevada viscosidade resultante da presença de polímero de celulose. VENÂNCIO & TEIXEIRA (1993) reportaram o uso de um derivado do hidroxipropilamido, com o preço de um décimo do Reppal PES, porém este polímero comercial possui uma grande quantidade de material insolúvel, que pode ser responsável pelo valor elevado da viscosidade da fase inferior, que foi de cinco a seis vezes maior do que o sistema PEG/Dextrana correspondente e dez vezes maior do que o PEG/Aquaphase PPT.

O sistema PEG/Derivado de goma de guar (VENÂNCIO *et al.*, 1995), possui a vantagem de necessitar baixas concentrações de polímeros para formação das fases. O custo deste sistema testado foi semelhante aos de outros sistemas usando um polímero bruto e significativamente mais barato do que outros sistemas referidos na literatura. A utilização de uma arabinogalactana, extraída do tronco de plantas do gênero *Larix*, disponível comercialmente em grau ultra-filtrado (AG-UF) e alimentar (AG-FG), forma com PEG um SBA que possui baixa viscosidade e exibiu comportamento para a separação de proteínas semelhante a dextrana fracionado, possuindo um grande potencial como alternativa a dextrana (CHRISTIAN *et al.*, 1998).

### **3.7. UTILIZAÇÃO DE GOMAS COMO POLÍMERO PARA SISTEMAS BIFÁSICOS ALTERNATIVOS**

As gomas podem ser definidas genericamente como substâncias poliméricas que, em solvente ou agente de intumescimento apropriado e mesmo a baixas concentrações, são capazes de formar dispersões ou soluções altamente viscosas ou até mesmo géis. Com esta definição, o termo aplica-se a uma vasta variedade de substâncias, incluindo hidrocarbonetos de alto peso molecular, borrachas, proteínas, polissacarídeos e seus derivados, além de alguns polímeros sintéticos (MILLER, 1987)

TABELA 03- Classificação das gomas industriais quanto a fonte de onde são obtidas

| Gomas Naturais             | Gomas Modificadas            |
|----------------------------|------------------------------|
| Exsudado de Plantas        | Carboximetilcelulose         |
| Goma arábica               | Hidroximetilcelulose         |
| Goma caraia                | Hidroxietilcelulose          |
| Goma tragacanto            | Carboximetilamido            |
| Goma do cajueiro           | Acetado de amido             |
| Extraídas de Algas         | Hidroxipropilamido           |
| Ágar                       | Carboximetilguar             |
| Alginato                   | Alginato de propileno glicol |
| Carragenana                |                              |
| Extraídas de Sementes      |                              |
| Goma guar                  |                              |
| Goma do marmeleiro         |                              |
| Fermentação microbiológica |                              |
| Dextrana                   |                              |
| Xantana                    |                              |

Industrialmente, no entanto, o termo goma é mais específico e está associado a polissacarídeos e seus derivados. O solvente ou agente de umectação é, neste caso, a água. As gomas industriais podem ser classificadas em naturais e modificadas. As naturais podem ser obtidas de exsudados de árvore, de sementes, de algas ou por fermentação microbiológica. As modificações são as derivadas de polissacarídeos insolúveis, como por exemplo, a celulose. A TABELA 03 apresenta exemplos de gomas industriais classificadas pela fonte e onde são obtidas (MILLER, 1987).

### 3.7.1. Goma do Cajueiro

As gomas vegetais oriundas de árvores (ou exsudados vegetais), são constituídas principalmente por heteropolissacarídeos, sendo produzidas espontaneamente, após injúria mecânica ou invasão microbiana através dos troncos, galhos ou fruto, constituindo-se então como parte do metabolismo normal da planta. Sua produção parece estar relacionada com algum mecanismo protetor do vegetal (MARQUES & XAVIER-FILHO, 1991).

O exsudado do cajueiro, produzido pela *Anacardium occidentale* L., pertencente a família *Anacardiaceae*, é constituída principalmente por um heteropolissacarídeo ramificado (arabinogalactana ácida), que apresenta propriedades adesivas e atividade de inseticida, bem como propriedades emulsificantes (PONTES, 1971). O cajueiro produz 178 - 2000 g/ano de goma, com um valor médio de 700 g/ano (BANDEIRA, 1991). A produção de castanha em árvores mais velhas do que 25 anos aumenta com a extração de goma. Dado a importância da cultura de cajueiros de algumas regiões de países como o Brasil (400.000-450.000 ha de planta) (LIMA, 1988), Índia, Moçambique, Tanzânia e Kenya, um estudo da utilização da goma é de grande importância. Existem estudos da goma do cajueiro de árvores provenientes da Índia (Madras) e Nova Guiné (Papua) (ANDERSSON *et al.*, 1974; ANDERSSON & BELL, 1975) e também com árvores brasileiras (Pacajus – CE) (RODRIGUES *et al.*, 1993; PAULA & RODRIGUES, 1995). A goma do cajueiro é constituída principalmente por unidades de galactose, arabinose, glicose, ácido urônico, manose e xilose. Entretanto, tem sido verificado que a porcentagem dos monossacarídeos varia de acordo com a região geográfica. A TABELA 04 mostra a composição da goma de *Anacardium occidentale* de diferentes origens (ANDERSSON *et al.*, 1974; PAULA & RODRIGUES, 1995).

Estudos recentes (PAULA & RODRIGUES, 1995) sobre propriedades reológicas da goma do cajueiro mostraram que está é uma goma de baixa viscosidade e é comparável em muitos aspectos com a goma arábica. As viscosidades absolutas em soluções de 1% dessas gomas foram 1,0 mPa (goma do cajueiro) e 1,8 mPa (goma arábica). Outros polissacarídeos utilizados na indústria, como metilcelulose, carboximetilcelulose, gomas de caraiá e de tragacanto apresentam viscosidades que variam de 1100 – 3400 Pa, em soluções a mesma concentração.

TABELA 04- Composição da goma de *Anacardium occidentale L* de diferentes origens

| Monossacarídeo    | Quantidade em % |            |        |
|-------------------|-----------------|------------|--------|
|                   | Índia           | Nova Guiné | Brasil |
| Galactose         | 61              | 63         | 73     |
| Arabinose         | 14              | 15         | 5      |
| Glucose           | 8               | 9          | 11     |
| Ramnose           | 7               | 7          | 4      |
| Manose            | 2               | 1          | 1      |
| Xilose            | 2               | -          | -      |
| Ácido glucurônico | 6               | 5          | 6      |

### 3.8. POLIETILENO GLICOL

O polietileno glicol (PEG),  $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ , é um poliéter sintético neutro, linear ou de cadeia ramificada, obtido por polimerização do óxido de etileno e disponível em uma variedade de pesos moleculares, de poucas centenas de milhares de daltons. Os dois grupos terminais (hidroxilas) são normalmente usados para ligação de ligantes por afinidade e outros grupos. Solubiliza-se em água e em solventes orgânicos. É também conhecido pelos nomes comerciais de poliglicol E®, carbowax® e pluracol E®, dependendo da empresa que o fabrica. Estão disponíveis em baixo preço. Para pesos moleculares acima de 20.000 daltons são denominados óxidos de polietileno, PEO. São fornecidos na forma de soluções incolores estáveis ou pastas, se possuem pesos moleculares menores que 1.000. Os de pesos moleculares elevados, acima de 1.000, são encontrados na forma de pó ou de flocos brancos. Podem ser estocados à temperatura ambiente, embora a 4 °C a ocorrência de oxidação em soluções, seja retardada (HARRIS, 1992).

Sendo não antigênico nem imunogênico, foi aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration). Sua utilização é de interesse na biotecnologia e biomedicina, principalmente por excluir, em ambiente aquoso, outros polímeros de sua vizinhança, não se solubilizando

com eles. Está sujeito a modificações químicas rápidas controlando a solubilidade e aumentando o tamanho de moléculas as quais se liga. Não provoca a diminuição da atividade de células e proteínas, sendo biodegradável e atóxico (HARRIS, 1992).

### **3.9. 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 comparação à destilação;
- possibilidade de evitar a degradação de compostos, devido ao efeito da temperatura, que pode ser causada por processos que fazem uso de energia térmica;
- desenvolvimento de equipamentos mais eficientes e 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 à 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 misturados foram desenvolvidos, 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 tornado este 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 fatores como (STEINER, 1988):

- 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 transferência de massa. Os mais conhecidos são definidos abaixo:

- “Hold up”: é a fração retida da fase dispersa, que é a razão do volume da fase dispersa pelo volume total do equipamento
- Inundação: quando as condições de operação na coluna, fazem com que seja impossível as correntes escoarem em contracorrente e uma fase se dispersar 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 na coluna, diminua, prejudicando a taxa de transferência de massa e a eficiência de 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 desempenho 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 a esses equipamentos ocuparem pequena área, 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 03).

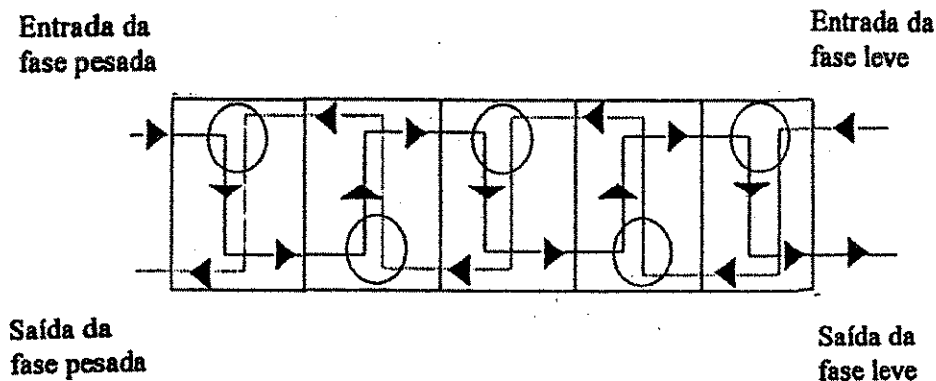


FIGURA 03- Exemplo de um extrator em estágios discretos

- 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.

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 04). 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 dos 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.

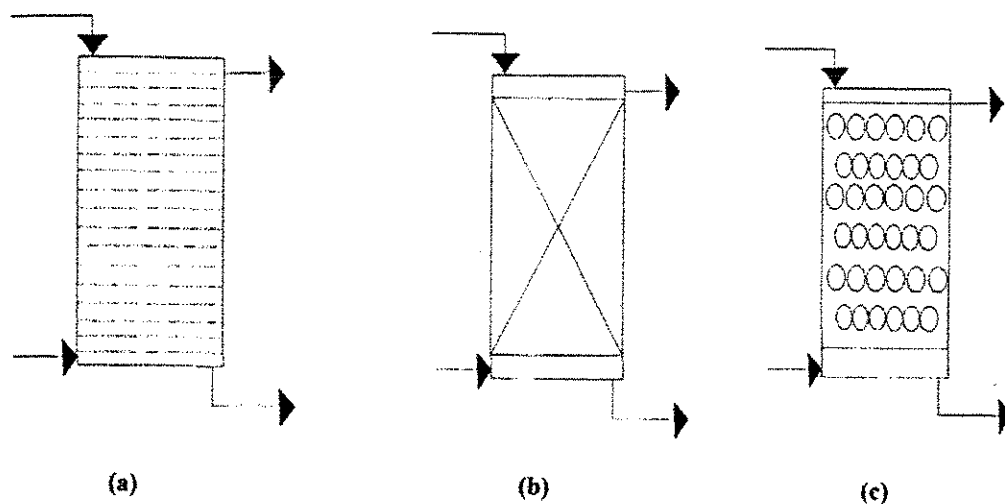


FIGURA 04- Exemplos de colunas que atuam sob a força da gravidade. (a) coluna de pratos fixos perfurados; (b) coluna recheada; (c) coluna Spray

- 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 (FIGURA 05). 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 a 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 05.

TABELA 05- Classificação dos equipamentos de extração segundo HANSON (1971)

| TIPO DE AGITAÇÃO                   | CONTATO COM                           |                                                   |
|------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------------------|
|                                    | SEPARAÇÃO DE FASES                    | CONTATO CONTÍNUO                                  |
| SEM AGITAÇÃO                       |                                       | -coluna Spray                                     |
|                                    |                                       | -coluna de chicanas                               |
|                                    |                                       | -coluna recheada                                  |
|                                    |                                       | -coluna de pratos perfurados                      |
| APARELHO<br>AGITADO POR<br>ROTAÇÃO | -Holley-Mott                          | -coluna Sheibel                                   |
|                                    | -misturador-decantador simples        | -coluna Oldshue-Rushton                           |
|                                    | -misturador-decantador com<br>bomba   | -contador de discos rotativos                     |
|                                    | -centrífuga de estágio individual     | -coluna misturadora multi-estágio                 |
|                                    | -misturador-decantador com<br>pulsção |                                                   |
| COM PULSAÇÃO                       | -misturador-decantador com<br>pulsção | -coluna recheada com pulsção                      |
|                                    |                                       | -coluna de pratos perfurados<br>pulsados          |
|                                    |                                       | -coluna de fluxo pulsado com<br>pratos perfurados |

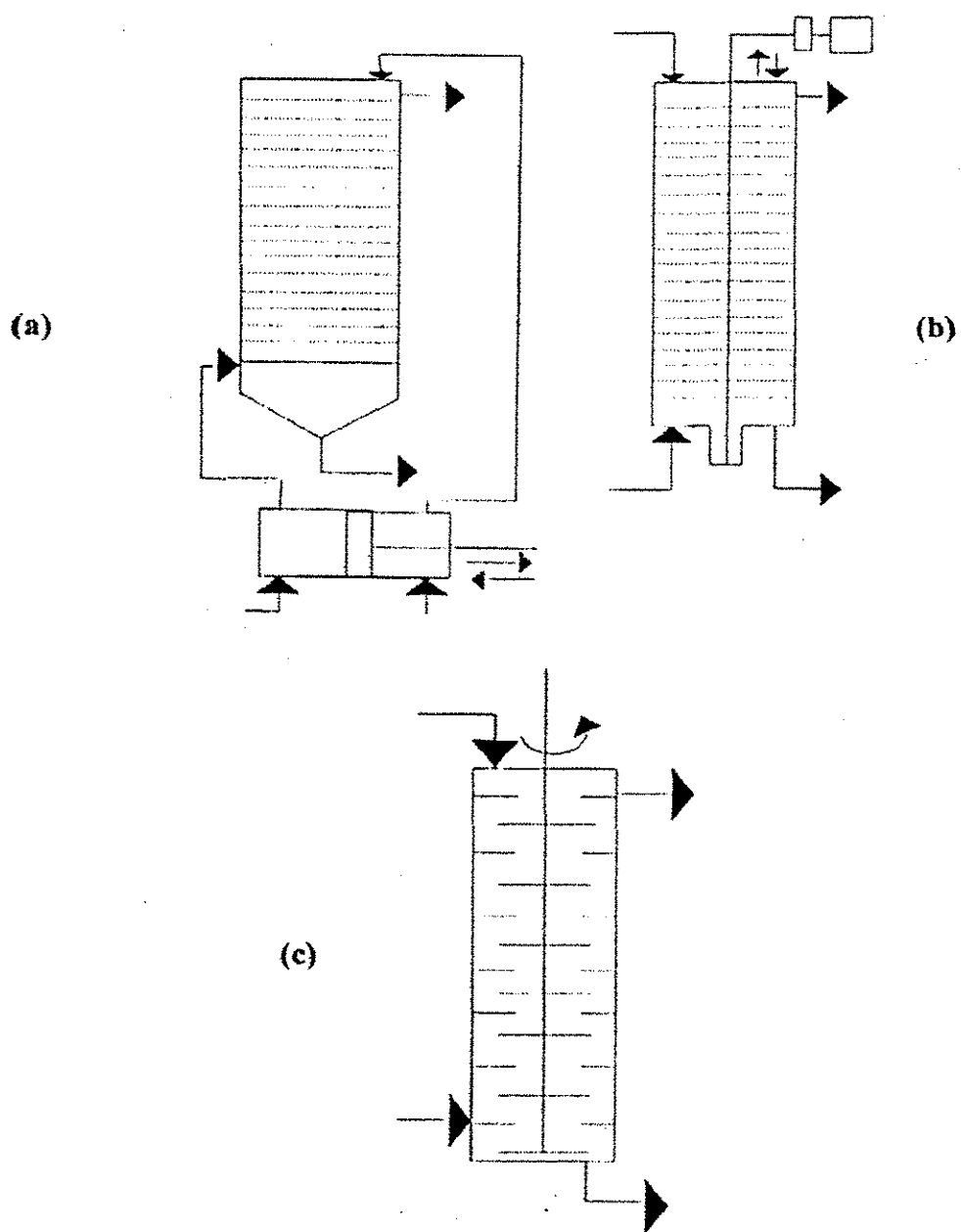


FIGURA 05- Exemplos de colunas que atuam sob a força da gravidade. (a) coluna de fluxo pulsado; (b) coluna de pratos pulsados; (c) coluna de discos rotativos.

### 3.10. PROCESSAMENTO CONTÍNUO

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

- Redução no 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 a quantidade de material que está sendo processada, resultando numa economia de capital e energia.
- automação do processo, o que significa baixa mão-de-obra a ser empregada;
- obtenção de produtos mais homogêneos: a combinação entre o processo contínuo e a 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 para a purificação em contínuo de proteínas 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 e colaboradores (1982) pesquisaram a extração de formiato desidrogenase com sistemas PEG-Sal. HUSTEDT e colaboradores (1988) analisaram o processo contínuo em uma coluna Kuhni, em um extrator Graesser, em uma coluna Podbielniak e em uma unidade misturadora-decantadora usando SBA.

Em operação semicontínua, SAWANT e colaboradores (1990), PATIL e colaboradores (1991) e JAFARABAD e colaboradores (1992a; 1992b) avaliaram a transferência de massa e a fração retida da fase dispersa ("hold up") 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 sistemas PEG-sulfato de sódio nas colunas York-scheibel e Empacotada. COIMBRA e colaboradores (1994) utilizaram um extrator Graesser para a separação das proteínas  $\alpha$ -lactoalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina do soro do leite com sistemas bifásicos PEG-fosfato e avaliaram a performance do extrator com relação a eficiência de separação e a transferência de massa (COIMBRA et al.,1995). PAWAR e colaboradores (1997) analisaram a fração retida da fase dispersa e o coeficiente de transferência de massa em uma coluna Spray modificada utilizando o sistema bifásico PEG-sulfato para a extração de amiloglicosidase e  $\beta$ -galactosidase. Mais recentemente, PORTO e colaboradores (1997; 1999) avaliaram a transferência de massa e a fração retida da fase dispersa (“hold up”) para o citocromo b5 e albumina de soro bovino em coluna de discos perfurados da fase dispersa (“hold up”) para o albumina de soro bovino em PRDC com sistemas PEG-fosfatos de potássio.

### **3.11. EXTRAÇÃO CONTÍNUA EM COLUNAS AGITADAS POR PULSAÇÃO**

As colunas agitadas por pulsação, apesar de utilizarem mais energia em sua operação, oferecem a grande vantagem de proporcionarem taxas de transferência de massa e eficiências bem mais elevadas do que outros tipos de equipamentos. Isto acontece porque neste tipo de extrator, a forma de agitação (pulsação) é introduzida no sistema na mesma direção de escoamento das correntes no interior da coluna, o que favorece um contato mais intenso entre as fases, sem prejudicar o escoamento em ambas as fases.

O primeiro trabalho apresentado sobre colunas agitadas por pulsação foi proposto por Van Dijck (1935). Neste trabalho, o autor propôs um novo tipo de equipamento para extração líquido-líquido, com a principal finalidade de se obter o máximo contato entre duas correntes líquidas. O princípio de funcionamento desta coluna consta basicamente do seguinte: as correntes líquidas são introduzidas na coluna em contracorrente, formando porções de cada uma delas nos vários compartimentos da coluna. Assim, em cada estágio (cada seção da coluna formada por um prato) são formadas duas camadas líquidas distintas, a superior de líquido leve (de menor densidade) e a inferior de líquido pesado (de maior

densidade). Com o movimento alternativo dos pratos, quando estes se movem para cima, o líquido pesado atravessa os furos dos pratos na forma de jatos, sendo disperso como gotas na camada de líquido leve do estágio anterior. De forma análoga, quando os pratos se movem para baixo, o líquido leve é injetado nos furos do prato superior, se dispersando na camada de líquido pesado.

Van Dijck (1935) propôs também um outro tipo de coluna, em que os pratos são fixos e os fluidos pulsados através do emprego de bombas alternativas. Este equipamento, conhecido como coluna de fluxo pulsado, também apresenta boas taxas de eficiência, segundo os autores. Já que estes extratores não têm partes móveis, encontram extenso uso no processamento de soluções radioativas em trabalhos com energia atômica, onde podem ser colocados sob pesados campos de radiação sem requerer manutenção (Treybal, 1968).

Vários autores, entre eles Smoot e Babb (1962), Duarte et al (1992), Khemangkorn et al (1978) e Góis (1995), já apresentaram estudos sobre colunas agitadas por pulsações, porém, a maioria se refere às colunas com fluxo pulsado. Todos os trabalhos mostram que este tipo de equipamento é bastante eficiente. Os sistemas líquidos estudados nestes trabalhos foram formados por água/solventes orgânicos.

Com a finalidade de obter-se um equipamento para a realização de processos de extração líquido-líquido, visando a separação e purificação de biomoléculas, é proposta e desenvolvida neste trabalho uma micro-coluna agitada por campânulas pulsantes, para a extração em contínuo.

Nos experimentos foram usados sistemas de duas fases aquosas formados por PEG-Goma de caju e água deionizada, para extração de proteínas.

Neste equipamento foram realizados estudos relativos ao comportamento hidrodinâmico e de transferência de massa.

### **3.11.1. Campânulas**

O uso de campânulas em colunas pulsadas é proposto visando obter-se uma agitação eficiente, mas suave, para aplicação em processos de separação de compostos lábeis, como as proteínas. Sendo a agitação suave, pretende-se evitar a desnaturação de biomoléculas, que ocorre quando é introduzida ao sistema excessiva energia mecânica e agitação extremamente vigorosa.

Além disso, as campânulas aumentam o tempo de contato entre as fases na coluna e fazem com que ocorra uma dispersão uniforme das gotas, o que favorece a transferência de massa, fazendo com que o sistema aproxime do equilíbrio.

O sistema de agitação composto por campânulas pulsantes ocorre da seguinte maneira: A fase leve entra na micro-coluna pelo fundo e fica retida na campânula. A peneira, da qual a campânula é constituída, não deixa a maior parte da fase leve passar espontaneamente. A campânula retém a fase leve por um tempo maior do que outros dispositivos comumente usados para promover a agitação. Deste modo, ocorre um aumento do tempo de contato entre as fases.

Durante o pulso, quando a campânula desce, o líquido mais leve (de menor densidade) que fica concentrado no interior da campânula, é forçado a passar pelos furos da peneira. A fase leve é “quebrada” em gotas bem pequenas. Uma importante característica da agitação obtida através do uso de campânulas pulsantes é a formação de uma dispersão, bastante uniforme e de gotas pequenas, da fase leve na fase contínua. Essas características são favoráveis à transferência de massa. Quando a campânula sobe, o movimento ascendente faz com que as fases misturem-se ainda mais.

As campânulas devem ser construídas de material inerte que não reaja com as soluções usadas na extração.

Não foi encontrada na literatura nenhuma referência sobre o uso de campânulas como dispositivo promotor de agitação em equipamentos de extração.

### **3.12. 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 com o tempo. O transporte de um constituinte de uma região de maior concentração para outra de menor concentração é chamado “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 no interior 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 da 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 é 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

$$N = K_d a (C^* - C) V$$

onde  $N$ ,  $Kda$ ,  $C^*$ ,  $C$  e  $V$  representam, respectivamente, o fluxo de proteína para a fase dispersa, o coeficiente global de transferência de proteína, a concentração de proteína na interface em equilíbrio com a fase contínua, a concentração de proteína na fase dispersa e o 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, originando:

$$N = Kda \Delta C_{lm} V$$

onde  $\Delta C_{lm}$  representa a média logarítmica da diferença de concentrações entre a interface e a fase dispersa. O balanço material global do soluto na coluna origina

$$Q(Cent - C_{sai}) = Kda \Delta C_{lm} V$$

em que  $Q$ ,  $Cent$  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 esta expressão, obtém-se a expressão:

$$Kda = Q/V \cdot \ln (Cent - KC_{fc} / C_{sai} - KC_{fc})$$

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 têm 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.

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

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.

### 3.13. RECUPERAÇÃO DOS PRODUTOS

O aspecto final a se considerar quando se pretende aplicar a partição bifásica aquosa à purificação de moléculas biológicas, consiste na separação da molécula biológica (produto desejado) dos polímeros constituintes do sistema bifásico aquoso.

Os primeiros trabalhos encontrados na literatura (ALBERTSSON, 1986) reportavam que a remoção dos polímeros do sistema era um obstáculo para a aplicação de SBA em larga escala. No entanto, observa-se, por exemplo, que a ultrafiltração pelo uso de membranas semi-permeáveis com poros seletivos é uma forma rápida e eficiente de se remover os polímeros. Considerando o sistema tradicional PEG-Dextrana, como o peso molecular do PEG é bem menor e o peso molecular da Dextrana bem maior do que o peso molecular da maioria das proteínas, este método torna-se bastante viável, permitindo que a membrana retenha a proteína, promovendo simultaneamente a remoção do PEG. Esta técnica ainda permite ganhos na purificação, já que outras proteínas menores ou partículas contaminantes podem ficar retidas na membrana. Um dos métodos mais comuns baseia-se na transferência da molécula biológica para uma fase com baixa concentração de polímero. Assim, quando a proteína se encontra acumulada na fase PEG, pode-se recorrer a adição de

um sal que leve à formação de um novo SBA. Utilizando-se condições apropriadas, a proteína pode ser re-extraída e se concentrar na fase rica em sal (HUSTEDT *et al.*, 1978; CABRAL & AIRES-BARROS, 1993). O sal, por sua vez, poderá ser removido por filtração em membrana utilizando osmose inversa ou diálise. As proteínas também podem ser removidas por adsorção em trocadores iônicos (ALBERTSSON, 1986; HUSTEDT *et al.*, 1978). Para sistemas PEG-Dextrana, uma vez que ambos os polímeros são neutros, eles não se ligarão aos trocadores e podem ser removidos por lavagem, deixando a proteína ligada a matriz. Para polímeros carregados, bastaria ajustar o pH e a força iônica. O inconveniente é a possibilidade de ocorrer uma alta pressão das gotas quando soluções poliméricas viscosas são processadas em coluna. Outras possibilidades incluem a centrifugação para moléculas ou partículas de elevado peso molecular (ALBERTSSON, 1986). ALBERTSSON (1986) também descreve um método específico para a recuperação de moléculas biológicas da fase inferior de sistemas PEG-Dextrana. Por adição de sulfato de amônia ou fosfato de potássio ao sistema PEG-Dextrana, a concentração de PEG na fase inferior vai diminuindo gradualmente até ser completamente excluída desta fase. A partir deste ponto, a molécula biológica pode ser precipitada da fase inferior por adição de sulfato de amônia.

Entre as metodologias mencionadas, a ultrafiltração em membrana parece ser a mais vantajosa no processo de separação e concentração de proteínas purificadas na remoção do polímero (CABRAL & AIRES-BARROS, 1993), podendo ser facilmente integrada aos processos contínuos sem maiores dificuldades (KULA *et al.*, 1982).

Um recente desenvolvimento no campo da separação bifásica aquosa é combinar SBA's com a separação induzida pela temperatura. Vários trabalhos sobre este processo alternativo de purificação estão disponíveis na literatura (ALRED *et al.*, 1993; FARKAS *et al.*, 1996; LI *et al.*, 1997; PERSSON *et al.*, 1999; SVENSSON *et al.*, 1999). São exemplos de polímeros "termoseparadores" o PEG, Álcool polivinílico e Etilhidroxietilcelulose. A separação de fases por indução pela temperatura torna possível separar o polímero da substância biológica isolada, permitindo recuperar o polímero "termoseparador". O processo de purificação é composto por dois passos. No primeiro, um sistema bifásico composto pelo polímero "termoseparador" como polímero predominante da fase superior e Dextrana ou Hidroxipropilamido como polímero predominante da fase inferior, é utilizado na partição da biomolécula, de modo que esta se concentre na fase superior. No segundo passo, a fase superior é isolada e o aquecimento acima de uma temperatura crítica, característica para

cada sistema, levará a uma nova formação de fases, de modo que o polímero termoseparador fica concentrado na fase inferior, enquanto que a fase superior é uma fase aquosa praticamente livre de polímero, que concentra a molécula biológica, a qual pode ser recuperada por ultrafiltração ou diálise (JOHANSSON et al., 1996).

### **3.14. RECICLAGEM DE POLÍMEROS**

A possibilidade de reutilização dos constituintes das fases deve ser considerada ao se efetuar o “scale-up” pois os custos dos componentes das fases aumentam linearmente com a escala de produção (KRONER et al., 1984). A recirculação de reagentes tem sido fundamentalmente estudada em sistemas PEG-Sais (PAPAMICHAEL et al., 1992; RITO-PALOMARES et al., 1994) e pode ser obtida na prática por recirculação direta da fase PEG ou da fase rica em sal após osmose inversa.

RITO-PALOMARES e colaboradores (1994) estudaram a reciclagem da fase rica em PEG de sistemas PEG-fosfatos na recuperação de proteínas de levedura de cerveja. Estes autores determinaram uma redução no custo de reagentes de 25% para operação em contínuo e verificaram que a eficiência do processo, isto é, recuperação e pureza da proteína, se mantém inalterada até 5 ciclos de recirculação.

## 4. MATERIAS E MÉTODOS

### 4.1. MATERIAIS

#### 4.1.1. Reagentes

Na TABELA 06 encontram-se os reagentes utilizados ao longo deste trabalho.

TABELA 06- Reagentes utilizados nas dosagens dos polímeros e proteína

| Utilização                          | Reagente                        | Pureza | Fornecedor        |
|-------------------------------------|---------------------------------|--------|-------------------|
| Formação do sistema bifásico aquoso | Goma do Cajueiro Amarelo        | -----  | Cajueiro amarelo  |
|                                     | Polietileno Glicol 1500         | -----  | Allkimia          |
|                                     | Polietileno Glicol 4000         | -----  | Chemco            |
|                                     | Polietileno Glicol 8000         | -----  | Sigma             |
|                                     | Hidrogenofosfato de potássio    | 99 %   | Nuclear           |
|                                     | Di-hidrogenofosfato de potássio | 99 %   | Kanto Chemical Co |
| Dosagem do Polietileno glicol       | Ácido perclórico                | 60 %   | Kanto Chemical Co |
|                                     | Cloreto de bário                | 99,9 % | Reagen Quimibrás  |
|                                     | Iodo                            | 99,9 % | Kanto Chemical Co |
| Proteína                            | Tripsina                        | ---    | Difco             |
| Dosagem da proteína                 | Comassie e Brilhante Blue       | ---    | Eastman Kodak     |
|                                     | Ácido ortofosfórico             | 85 %   | Vetec             |
|                                     | Etanol                          | 98 %   | Merck             |

#### 4.1.2. Equipamentos

Na TABELA 07 encontram-se os equipamentos utilizados para realização deste trabalho.

TABELA 07- Equipamentos utilizados

| Equipamento                           | Fornecedor                       |
|---------------------------------------|----------------------------------|
| Aagitador magnético modelo 752A       | FISATOM                          |
| Aagitador de toque (Vortex) tipo 1005 | BIOMATIC                         |
| Balança analítica modelo AL200        | MARTE                            |
| Banho-maria                           | FISATOM                          |
| Centrífuga de bancada modelo Z252MK   | HERMLE, Labor technik - Alemanha |
| Espectrofotômetro 21D                 | Milton Roy                       |

#### 4.1.3. Coluna Agitada por Campânulas Pulsantes

Nos ensaios de extração com alimentação contínua de ambas as fases foi utilizada um micro-coluna agitada por campânulas pulsadas como representada na FIGURA 06 . A micro-coluna é constituída de um tubo de vidro de 19 cm de altura; 2,84 cm de diâmetro externo e 2,54 cm de diâmetro interno. No centro desta micro-coluna está localizada uma haste de aço inox na qual estão soldadas as campânulas, que também são de aço inox. Duas configurações serão usadas, uma com duas campânulas, que estão distanciadas 4 cm uma da outra e outra com três campânulas, que estão distanciadas 6 cm uma da outra. O diâmetro da base da campânula é 2,49 cm. A peneira da qual a campânula é construída fornece uma área livre de 38%.

Os bocais de alimentação e saída são de aço inox e possuem um diâmetro interno de 3,65 mm e 6,85 mm de diâmetro externo.

Os pulsos são fornecidos por um dispositivo e controlados por um dimmer.

A alimentação da fase contínua, na qual possui maior densidade, é feita utilizando-se a gravidade e a sua vazão será controlada por um rotâmetro. A alimentação da fase dispersa, na qual possui menor densidade, é feita por meio de uma bomba peristáltica, previamente calibrada. As válvulas para controle das vazões são válvulas agulha.

Os tubos para conduzir as alimentações e saídas são de viton, que é um material resistente à ação do iso-octano.

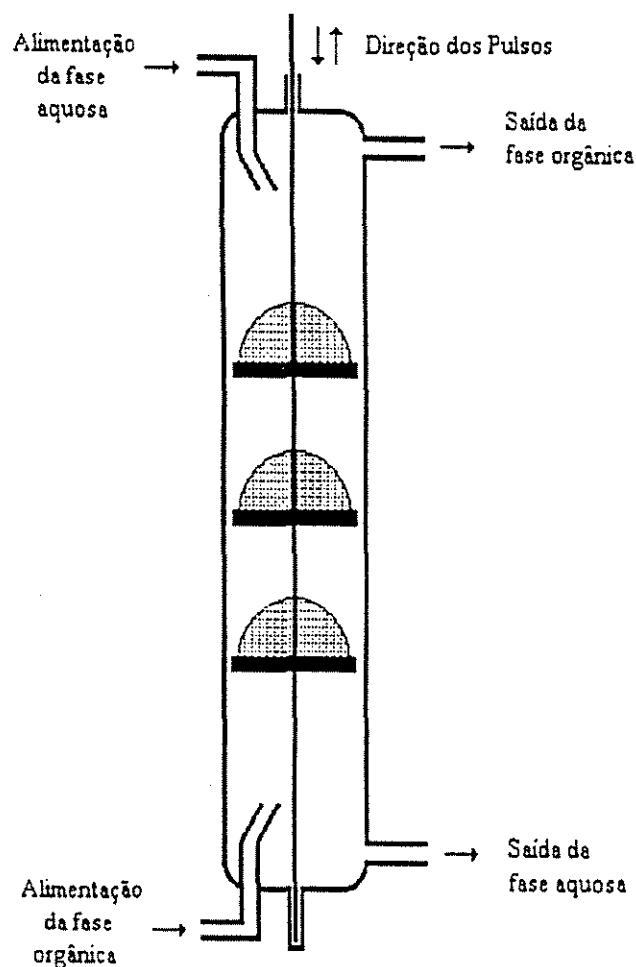


FIGURA 06 : Coluna agitada por campânulas pulsantes

## 4.2. MÉTODOS

### 4.2.1. Purificação da Goma do Cajueiro.

A goma do cajueiro amarelo, isenta de casca de árvore, foi purificada de acordo com o método de MILLAS & RINAUDO (1991) modificado, como mostra o FIGURA 07. A trituração da goma foi feita utilizando gral e pistilo. A precipitação utilizou 3 vezes o volume de etanol, em relação ao volume da solução, permanecendo os oligossacarídeos em solução.

#### 4.2.2. Preparo das Soluções Tampão

Foi utilizado o tampão fosfato de potássio 15mM nos pH's 6,0, 7,0 e 8,0, preparado de acordo com o MORITA & ASSUMPÇÃO (1986).

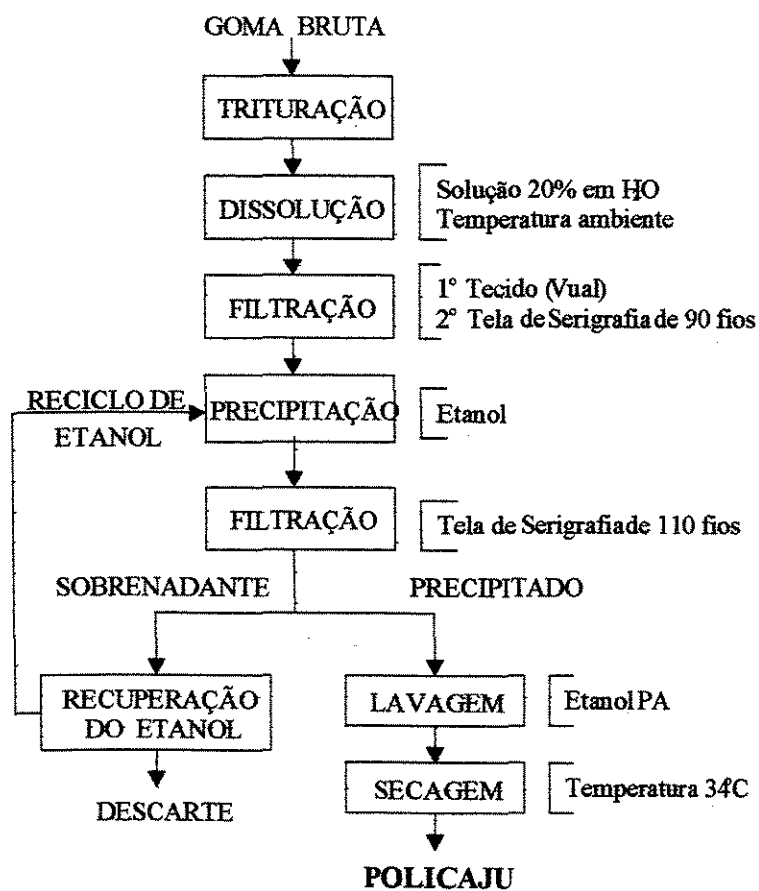


FIGURA 07- Etapas de purificação da goma do cajueiro de acordo com o método de RINAUDO-MILLAS (1991) modificado

#### 4.2.3. Preparo das Soluções de Polímeros

As soluções de polímeros foram preparadas no tampão fosfato de potássio 15 mM (pH's 6,0; 7,0 e 8,0), nas concentrações dadas na TABELA 08.

TABELA 08- Soluções estoques de polímeros

| Solução                                   | % (p/p) |
|-------------------------------------------|---------|
| Polissacarídeo da Goma do Cajueiro 110000 | 30      |
| Polietileno Glicol 1500                   | 70      |
| Polietileno Glicol 4000                   | 50      |
| Polietileno Glicol 8000                   | 50      |

#### 4.2.4. Preparo da Solução de Tripsina

A solução de tripsina foi preparada em água na concentração de 2 mg/mL.

#### 4.2.5. Preparo dos Sistemas Bifásicos Aquosos

Para os experimentos de determinação do diagrama de fases, foram preparados sistemas de 8 g utilizando-se as soluções de polímeros do item 4.2.3 e tampão fosfato de potássio 15 mM para a construção dos diagramas de fases e análises das "tie-lines". Após a pesagem, os sistemas foram agitados em Vortex durante 2 minutos e, em seguida, centrifugados por 5 minutos a 500 rpm. Os sistemas utilizados para os estudos de partição da proteína modelo, foram sistemas de 4 g, utilizando as soluções de polímeros do item 4.2.3 e tampão fosfato de potássio 15 mM. Após a pesagem os sistemas foram agitados em Vortex durante 2 minutos e adicionados 400  $\mu$ L da solução de tripsina (item 4.2.4). Os sistemas foram novamente agitados por 2 minutos e centrifugados por 5 minutos a 500 rpm.

#### **4.2.6. Determinação do Diagrama de Fases**

A binodal foi determinada segundo método descrito por ALBERTSSON (1986), que consiste em determinar as composições das fases dos sistemas. Para concentração em cada fase de PEG e polissacarídeo da goma do cajueiro foram feitas as análises de PEG e ácido 3,5-dinitrossalicílico respectivamente, e, a binodal foi traçada através dos pontos representativos dessas duas fases.

#### **4.2.7. Determinação do Polietileno Glicol**

A determinação do polietileno glicol foi feita segundo o método de SKOOG (1979). Para quantificação do PEG, pesou-se 0,2 g da fase inferior e 1,0 g da fase superior e aferiu-se a 50 mL com água destilada. A 1 mL da solução anterior adicionou-se 4 mL de ácido perclórico 0,5 M e homogeneizou-se; a 2 mL desta solução adicionou-se 0,5 mL de cloreto de bário 5%, 0,5 mL de solução de iodo 0,01 M e 0,5 mL de ácido perclórico 0,5 M. Após 15 minutos de reação, a absorbância foi lida a 535 nm. A quantificação de PEG foi feita a partir da curva de calibração, para os PEG's de diferentes massas moleculares (1500, 4000 e 8000) na concentração até 0,08 mg/mL.

#### **4.2.8. CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS BIFÁSICOS AQUOSOS**

##### **4.2.8.1. Determinação das “tie-lines”**

Sistemas obtidos experimentalmente pela mistura de diferentes concentrações de Polietileno glicol e Policaju foram submetidos à análise de PEG do polissacarídeo em ambas as fases, a fim de se determinar as “tie-lines” de trabalho, para todos os pH's, conforme descrito na TABELA 09 abaixo .

TABELA 09- Composição das “tie-lines”de trabalho dos sistemas de duas fases aquosas PEG/POLICAJU utilizados ao longo dos experimentos

| SISTEMAS          | POLICAJU (% p/p)/ PEG (%p/p) |            |            |
|-------------------|------------------------------|------------|------------|
|                   | TIE-LINE 1                   | TIE-LINE 2 | TIE-LINE 3 |
| PEG 1500-POLICAJU | 21/13                        | 22,5/13,8  | -----      |
| PEG 4000-POLICAJU | 18/9                         | 20/11      | 22/13      |
| PEG 8000-POLICAJU | 16/9                         | 18/11      | 20/13      |

#### 4.2.8.2. Tempo de separação das fases

O tempo requerido para a separação das fases foi determinado para sistemas de 10 g. Após agitação para misturas das fases, os sistemas foram deixados em repouso sob ação da gravidade até formação de uma interface visível.

#### 4.2.8.3. Razões de fases

Os volumes das fases dos sistemas (10 g) em estudo, preparados em tubos de centrífuga graduados, foram usados para se determinar a razão das fases,  $V_s$  (volume da fase superior)/  $V_i$  (volume da fase inferior).

#### 4.2.9. Determinação do Conteúdo Protéico

A determinação da tripsina na fase superior foi feita de acordo com o método de BRADFORD (1976) modificado. Devido a viscosidade da fase inferior, a concentração da proteína nesta fase foi calculada através do balanço de massa. O princípio do método de Bradford é baseado no fato que o corante “Coomassie Brilliant Blue” coexiste em duas formas de cores diferentes: a cor vermelha e a azul. A forma de cor vermelha é rapidamente convertida na outra forma, por ligação da parte cromófora do corante a proteína. A 400  $\mu\text{L}$  da fase superior adicionou-se 2 mL do reagente de Bradford e a absorbância foi lida a 595

nm antes de 15 minutos. O aparelho foi zerado com a fase superior de um sistema com a mesma composição do sistema sem proteína, nas mesmas condições descritas para as amostras. A quantificação da tripsina foi feita a partir da curva de calibração, na concentração até 200 µg de tripsina/mL.

#### **4.2.9.1. Preparação do Reagente de Bradford**

O reagente de Bradford é preparado pela dissolução de 100 mg de “Coomassie Brilliant Blue” em 50 mL de etanol 95%, 100 mL de ácido ortofosfórico e aferido a 1 litro com água destilada. A solução é agitada por 1 hora e então filtrada. A solução é preparada na ausência de luz.

#### **4.2.10- Cálculo do coeficiente de partição**

O cálculo do coeficiente de partição foi feito utilizando-se a fórmula descrita abaixo:

$$K = \frac{\text{Concentração de Tripsina na Fase Superior}}{\text{Concentração de Tripsina na Fase Inferior}}$$

#### **4.2.11. EXTRAÇÃO CONTÍNUA UTILIZANDO COLUNA DE CAMPÂNULAS PULSANTES**

##### **4.2.11.1. Preparação dos sistemas de trabalho**

Para os ensaios em contínuo, a partir das observações realizadas para os experimentos em batelada, foi selecionada uma “tie-line”(18%PEG 4000- 9% Policaju, pH 6.0) de modo que foi preparado sistema de 600 g, de acordo com a razão de fases, da mesma forma que para o processo em batelada, ou seja, a partir de soluções estoque de PEG e Policaju. Os sistemas assim preparados foram agitados por 1 hora e deixados em repouso “overnight” (para que o sistema não fungue). Posteriormente, as fases inferior e superior foram separadas para utilização na coluna.

Para os experimentos com transferência de massa, a proteína foi diretamente dissolvida na fase dispersa (PEG) de modo a obter uma solução com concentração final de 2 mg/mL. A solução foi então agitada por cerca de 1 hora até completa solubilização da proteína.

#### 4.2.11.2. Caracterização hidrodinâmica do equipamento

##### 4.2.11.2.1. Condições operacionais

Para a operação da coluna, com a finalidade da obtenção de dados para a caracterização hidrodinâmica do extrator, seguiu-se o procedimento abaixo:

1. Alimentou-se a coluna inicialmente com 80 mL da fase contínua (fase rica em Policaaju), com a drenagem da fase contínua e alimentação da fase dispersa fechadas até enchê-la.
2. Adicionou-se o mecanismo de pulsação dos discos e, depois de ajustada a vazão de entrada com a de saída da fase contínua, procedeu-se então a alimentação da fase dispersa (fase rica em PEG) nas vazões desejadas. Para este procedimento foram utilizadas 4 bombas peristáltica e 1 canal, a fim de se garantir a velocidade de fluxo requerida para cada fase.

Neste trabalho foram analisadas algumas variáveis operacionais e geométricas sobre a fração retida na fase dispersa (Hold up), transferência de massa e índice de recuperação na coluna de campânulas pulsantes ( TABELA 10).

TABELA 10- Variáveis estudadas na extração contínua

| Variáveis Operacionais/ Geométricas | Valores |
|-------------------------------------|---------|
| Pulsação                            | 1:3 1:5 |
| Velocidade de Pulsação (mL/min)     | 2,0     |
| Número de campânulas                | 2       |

#### **4.2.11.2.2. Determinação da fração retida na fase dispersa (Hold up)**

Nos ensaios de extração em contínuo, após se atingir o estado estacionário, em condições de agitação e velocidade de fase dispersa pré-determinadas, foi determinado o “Hold up” (H) da fase rica em PEG pelo método do estancamento. Neste procedimento são interrompidas simultaneamente a agitação e todas as correntes de entrada e saída da coluna. A coluna foi descarregada, as fases levadas à decantação e os volumes das fases lidos em proveta graduada. Esta técnica leva a medida de “Hold up” médio e calculado de acordo com a seguinte expressão:

$$H = \text{volume da fase dispersa} / \text{volume total do sistema}$$

#### **4.2.11.3. Experimentos de transferência de massa**

##### **4.2.11.3.1. Determinação do coeficiente de transferência de massa (Kda)**

Para a determinação do coeficiente de transferência de massa da proteína, a proteína foi inicialmente dissolvida na fase PEG e esta foi alimentada através da fase contínua, de modo a se obter a transferência da proteína para a fase extrato. Amostras das fases contínua e dispersa foram recolhidas em correntes de saída em intervalos de tempo de 10, 20, 30, 40, 50 e 55 minutos de operação, em condições pré-estabelecidas de velocidade de pulsação, velocidades das fases dispersa e contínua e número de campânulas, seguidas pelas determinações das quantidades de proteína de acordo com o método de BRADFORD (1976).

O coeficiente de transferência de massa foi determinado em termos da concentração de proteína nas fases dispersa e contínua de acordo com a seguinte expressão:

$$Kda = Q/V \cdot \ln (Cent - KCfc / Csa - KCfc)$$

Onde Kda, Q, V, Cent, Csa e K representam respectivamente, o coeficiente de transferência de massa, a velocidade de fluxo da fase dispersa, o volume da fase contínua, a concentração

de proteína na corrente de entrada da fase dispersa, a concentração de proteína na corrente de saída da fase dispersa, coeficiente de partição. Toma-se para valor de  $C_{fc}$ , o valor médio entre a concentração final da fase contínua e o valor inicial da mesma fase, isto é, toma-se para o valor de  $C_{fc}$  metade do valor de concentração de soluto determinado para a fase contínua, pois o valor inicial da fase contínua será zero (SAWANT et al., 1990).

#### **4.2.11.3.2. Cálculo do índice de recuperação do soluto**

A eficiência de extração para diferentes condições operacionais pré-estabelecidas foi obtida através da expressão proposta por KAWASE (1990), a qual se baseia nas concentrações da fase onde se encontra o soluto:

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

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

$C_r$  é a fração mássica de soluto no refinado

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A recuperação e purificação de produtos biológicos é uma das áreas da biotecnologia que tem despertado maior interesse. Entre as técnicas empregadas para a recuperação de produtos biológicos, a extração com sistemas bifásicos aquosos é uma das mais atrativas, dadas as condições suaves que oferece a moléculas e partículas biológicas (ALBERTSSON *et al.*, 1990; CHRISTIAN *et al.*, 1998).

Neste sentido, procurou-se estudar a aplicação de um polímero regional de baixo custo a técnicas de separação bifásica aquosa, possibilitando a redução dos custos no desenvolvimento de sistemas bifásicos aquosos como técnica alternativa aos processos tradicionais de recuperação. Pretendeu-se mostrar que os dados compilados ao longo das últimas três décadas para sistemas bifásicos aquosos formados por polímeros como a Dextrana podem ser transpostos para sistemas formados por polímeros alternativos

### **5.1. DETERMINAÇÃO DOS DIAGRAMAS DE FASES**

#### **5.1.1. EFEITO DA MASSA MOLAR DO PEG NO DIAGRAMA DE FASES**

Analisando-se os diagramas de fases para os três PEG's (1500, 4000, 8000), para cada valor de pH estudado (FIGURAS 08, 09 e 10), observou-se um deslocamento das binodais no sentido do PEG 8000 para o 1500, ou seja, quanto menor a massa molar do polímero, maior a concentração necessária para a formação de fases, estando este comportamento de acordo com outros estudos previamente realizados (ALBERTSSON, 1986; VENÂNCIO *et al.*, 1995; SZLAG & GIULIANO, 1988; ZASLAVSKY, 1995).

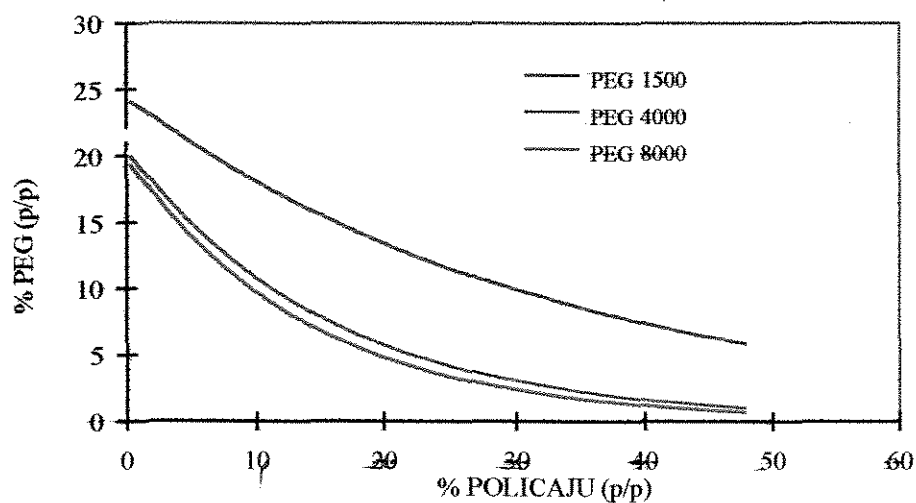


FIGURA 08- Diagramas de fases dos sistemas PEG 8000/POLICAJU, PEG 4000/POLICAJU e PEG 1500/POLICAJU no pH 6,0 a  $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

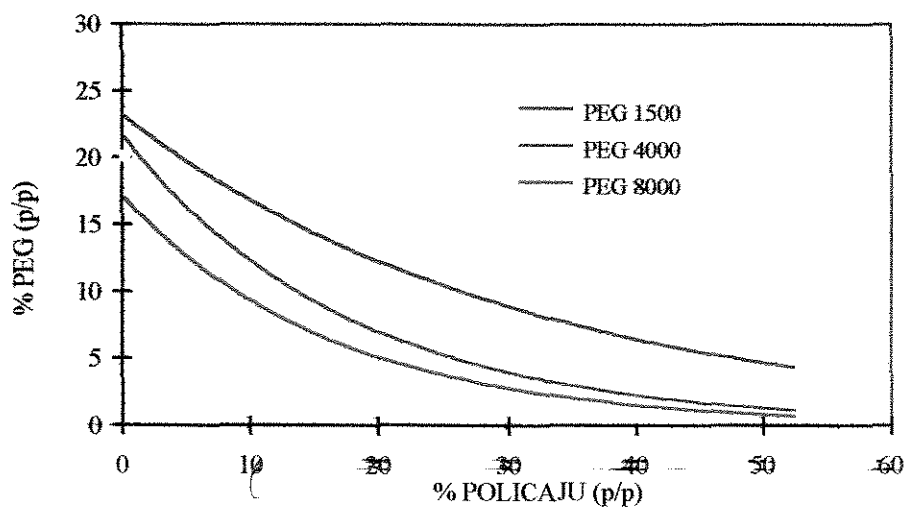


FIGURA 09- Diagramas de fases dos sistemas PEG 8000/POLICAJU, PEG 4000/POLICAJU e PEG 1500/POLICAJU no pH 7,0 a  $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

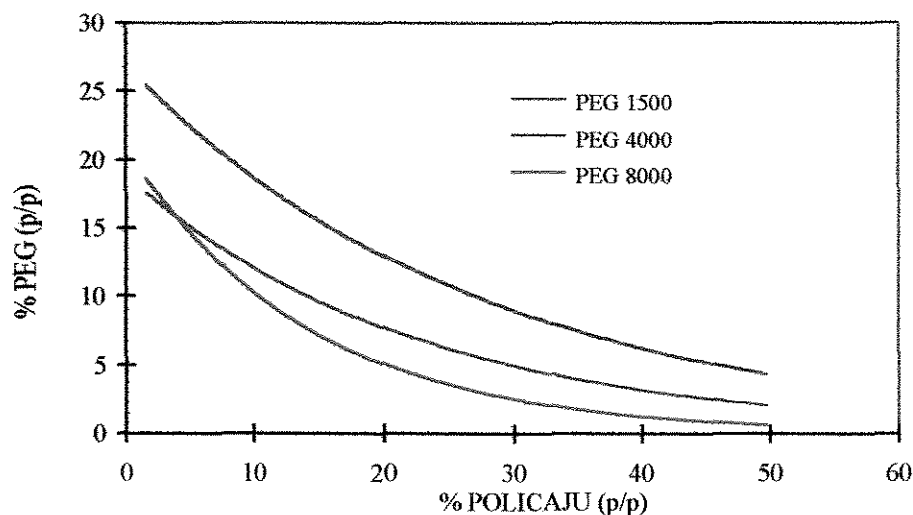
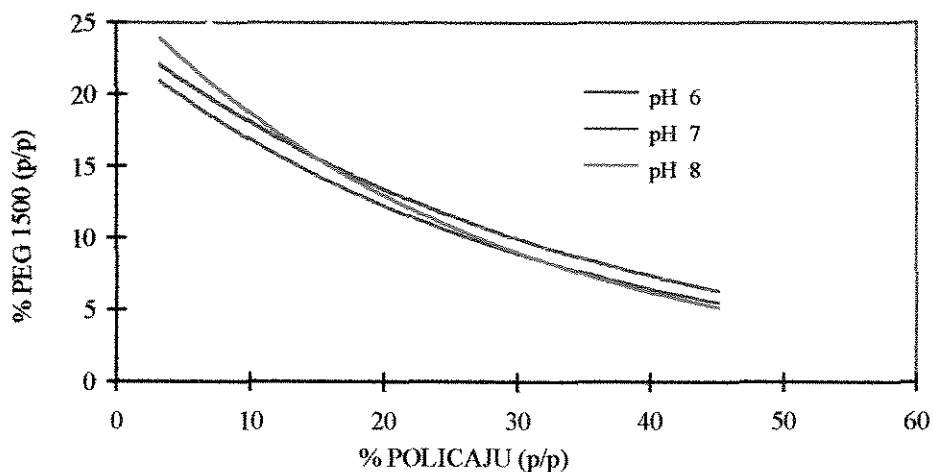


FIGURA 10- Diagramas de fases dos sistemas PEG 8000/POLICAJU, PEG 4000/POLICAJU e PEG 1500/POLICAJU no pH 8,0 a  $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

### 5.3. EFEITO DO pH NO DIAGRAMA DE FASES

Analisando-se o comportamento de cada sistema, não houve um deslocamento significativo das binodais na faixa de pH estudada (FIGURAS 11, 12 e 13). Não foram encontrados dados relevantes a cerca da influência deste parâmetro sobre a binodal em sistemas polímero/polímero descritos na literatura.

FIGURA 11- Diagrama de fases do sistema PEG 1500/POLICAJU nos pH's 6,0, 7,0 e 8,0 a  $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$



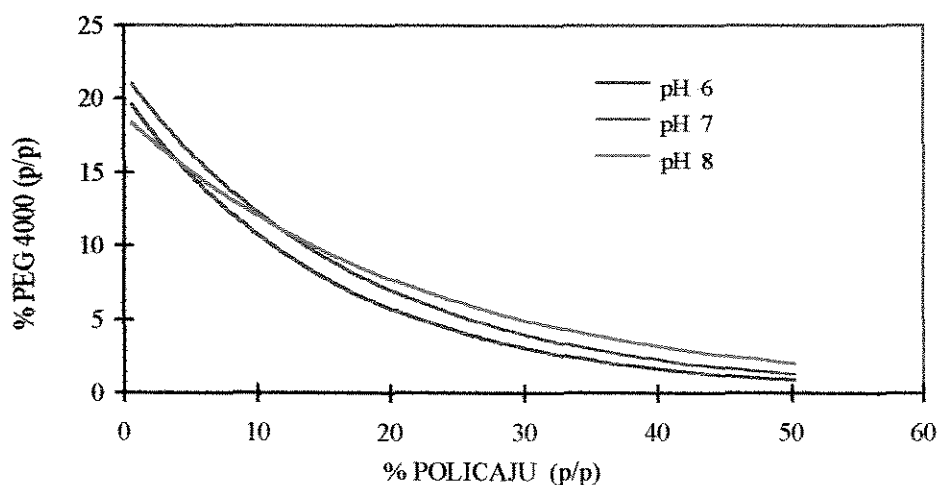


FIGURA 12- Diagrama de fases do sistema PEG 4000/POLICAJU nos pH's 6,0, 7,0 e 8,0 a  $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

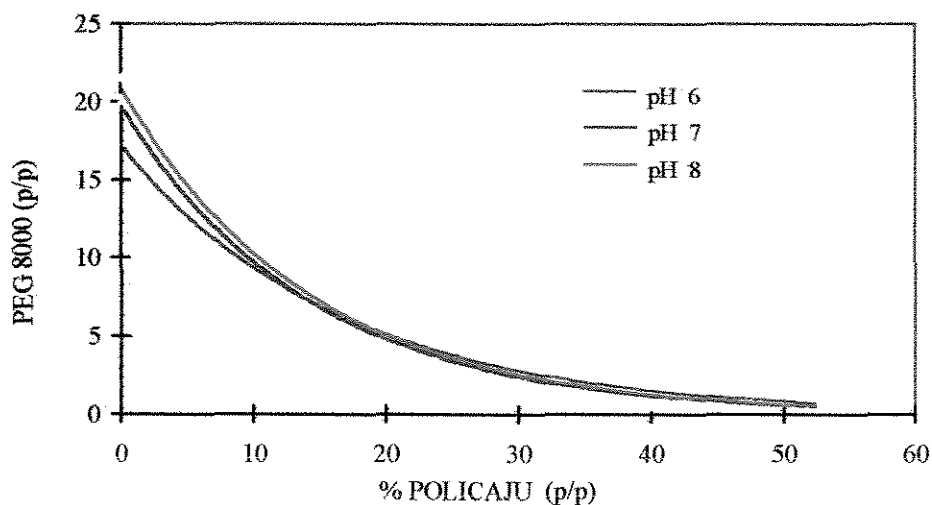


FIGURA 13- Diagrama de fases do sistema PEG 8000/POLICAJU nos pH's 6,0, 7,0 e 8,0 a  $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

Por outro lado, para sistemas PEG/sal, a variação do pH provoca o deslocamento da binodal no sentido da maior concentração dos constituintes das fases com a diminuição do pH (FRANCO, 1992; HUDDLESTON *et al.*, 1991). Para os sistemas bifásicos PEG/ Sais de fosfato estudados por VIDEIRA & AIRES-BARROS (1994), quando o pH diminui de 8 para 7 a proporção de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$  aumenta e, devido a rejeição do PEG por grupos

(ânions) multivalentes, uma maior concentração de sal e/ou polímero será necessária para obter um sistema bifásico. Estes resultados são corroborados por SARMENTO e colaboradores (1994).

## 5.2. ESTUDOS DE PARTIÇÃO

A purificação de proteínas usando sistemas bifásicos aquosos é influenciado por vários parâmetros, tais como pH do sistema, tipo e concentração de sais presentes no sistema, a massa molar do polímero e concentração e propriedades da proteína, como estrutura, hidrofobicidade e massa molar (ALMEIDA *et al.*, 1998).

A partição de moléculas entre duas fases é um fenômeno complexo devido ao envolvimento de vários fatores nas interações entre o soluto e os componentes constituintes das fases como as pontes de hidrogênio, interações entre cargas, forças de van der Waals, interações hidrofóbicas e efeitos estéreos. Isto torna a massa molar e as propriedades químicas do polímero, o tamanho e propriedades químicas do soluto particionado de extrema importância. Uma vez que, a superfície da proteína é constituída por diversos tipos de aminoácidos, as propriedades químicas do polímero tem papel importante na partição das proteínas em SBA (HACHEM *et al.*, 1996).

Devido a complexidade dos fenômenos de partição, é difícil prever o comportamento da proteína e selecionar as condições de separação para se planejar um experimento (HACHEM *et al.*, 1996).

Neste trabalho caracterizou-se o sistema Polietileno glicol/POLICAJU e estudou-se sua aplicação através da partição de uma proteína modelo, a tripsina. A influência de diversos parâmetros como pH, massa molar do PEG, comprimento da "tie-line" na partição da proteína foram estudados. A composição total dos sistemas assim como a composição das "tie-lines" estudadas nos experimentos de partição estão apresentadas nas tabelas a seguir:

TABELA 11- Diagrama de fases e composição das fases do sistema PEG 1500/POLICAJU  
a 27 °C ± 2 °C, pH 6,0

| PEG 1500   | Composição Total do Sistema (% p/p) |      |                  | Composição da Fase Superior (% p/p) |       |                  | Composição da Fase Inferior (% p/p) |      |                  |
|------------|-------------------------------------|------|------------------|-------------------------------------|-------|------------------|-------------------------------------|------|------------------|
|            | Goma                                | PEG  | H <sub>2</sub> O | Goma                                | PEG   | H <sub>2</sub> O | Goma                                | PEG  | H <sub>2</sub> O |
| "Tie-line" |                                     |      |                  |                                     |       |                  |                                     |      |                  |
| 1          | 21                                  | 13   | 66               | 6,22                                | 18,45 | 75,33            | 36,97                               | 7,15 | 55,88            |
| 2          | 22,5                                | 13,8 | 63,7             | 3,31                                | 19,82 | 76,87            | 40,42                               | 7,97 | 51,61            |

TABELA 12 -Diagrama de fases e composição das fases do sistema PEG 4000/POLICAJU  
a 27 °C ± 2 °C, pH 6,0

| PEG 4000   | Composição Total do Sistema (% p/p) |     |                  | Composição da Fase Superior (%p/p) |       |                  | Composição da Fase Inferior (%p/p) |      |                  |
|------------|-------------------------------------|-----|------------------|------------------------------------|-------|------------------|------------------------------------|------|------------------|
|            | Goma                                | PEG | H <sub>2</sub> O | Goma                               | PEG   | H <sub>2</sub> O | Goma                               | PEG  | H <sub>2</sub> O |
| "Tie-line" |                                     |     |                  |                                    |       |                  |                                    |      |                  |
| 1          | 18                                  | 9   | 73               | 5,52                               | 13,54 | 80,94            | 36,35                              | 2,37 | 61,28            |
| 2          | 20                                  | 11  | 69               | 1,66                               | 19,23 | 79,11            | 43,22                              | 0,63 | 56,15            |
| 3          | 22                                  | 13  | 65               | 0,59                               | 20,24 | 79,17            | 47,84                              | 1,68 | 50,48            |

TABELA 13- Diagrama de fases e composição das fases do sistema PEG 8000/POLICAJU  
a 27 °C ± 2 °C, pH 6,0

| PEG 8000   | Composição Total do Sistema (% p/p) |     |                  | Composição da Fase Superior(%p/p) |       |                  | Composição da Fase Inferior (% p/p) |      |                  |
|------------|-------------------------------------|-----|------------------|-----------------------------------|-------|------------------|-------------------------------------|------|------------------|
|            | Goma                                | PEG | H <sub>2</sub> O | Goma                              | PEG   | H <sub>2</sub> O | Goma                                | PEG  | H <sub>2</sub> O |
| "Tie-line" |                                     |     |                  |                                   |       |                  |                                     |      |                  |
| 1          | 16                                  | 9   | 75               | 3,64                              | 13,33 | 83,03            | 39,15                               | 0,86 | 59,99            |
| 2          | 18                                  | 11  | 71               | 1,33                              | 19,39 | 79,28            | 43,88                               | 0,85 | 55,27            |
| 3          | 20                                  | 13  | 67               | 0,35                              | 21,56 | 78,09            | 47,37                               | 0,99 | 51,64            |

TABELA 14- Diagrama de fases e composição das fases do sistema PEG 1500/POLICAJU  
a  $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , pH 7,0

| PEG 1500   | Composição Total do Sistema (% p/p) |      |                  | Composição da Fase Superior (% p/p) |       |                  | Composição da Fase Inferior (% p/p) |      |                  |
|------------|-------------------------------------|------|------------------|-------------------------------------|-------|------------------|-------------------------------------|------|------------------|
|            | Goma                                | PEG  | H <sub>2</sub> O | Goma                                | PEG   | H <sub>2</sub> O | Goma                                | PEG  | H <sub>2</sub> O |
| "Tie-line" |                                     |      |                  |                                     |       |                  |                                     |      |                  |
| 1          | 21                                  | 13   | 66               | 8,73                                | 16,91 | 74,36            | 39,20                               | 7,00 | 53,80            |
| 2          | 22,5                                | 13,8 | 63,7             | 5,75                                | 19,89 | 74,36            | 45,15                               | 5,73 | 49,12            |

TABELA 15- Diagrama de fases e composição das fases do sistema PEG 4000/POLICAJU  
a  $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , pH 7,0

| PEG 4000   | Composição Total do Sistema (% p/p) |     |                  | Composição da Fase Superior (%p/p) |       |                  | Composição da Fase Inferior (%p/p) |      |                  |
|------------|-------------------------------------|-----|------------------|------------------------------------|-------|------------------|------------------------------------|------|------------------|
|            | Goma                                | PEG | H <sub>2</sub> O | Goma                               | PEG   | H <sub>2</sub> O | Goma                               | PEG  | H <sub>2</sub> O |
| "Tie-line" |                                     |     |                  |                                    |       |                  |                                    |      |                  |
| 1          | 18                                  | 9   | 73               | 10,93                              | 10,25 | 78,82            | 31,47                              | 4,64 | 63,89            |
| 2          | 20                                  | 11  | 69               | 4,12                               | 16,58 | 79,30            | 48,43                              | 0,98 | 50,59            |
| 3          | 22                                  | 13  | 65               | 1,29                               | 21,32 | 77,39            | 50,27                              | 1,54 | 48,19            |

TABELA 16- Diagrama de fases e composição das fases do sistema PEG 8000/POLICAJU  
a  $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , pH 7,0

| PEG 8000   | Composição Total do Sistema (% p/p) |     |                  | Composição da Fase Superior(%p/p) |       |                  | Composição da Fase Inferior (% p/p) |      |                  |
|------------|-------------------------------------|-----|------------------|-----------------------------------|-------|------------------|-------------------------------------|------|------------------|
|            | Goma                                | PEG | H <sub>2</sub> O | Goma                              | PEG   | H <sub>2</sub> O | Goma                                | PEG  | H <sub>2</sub> O |
| "Tie-line" |                                     |     |                  |                                   |       |                  |                                     |      |                  |
| 1          | 16                                  | 9   | 75               | 2,69                              | 13,69 | 83,62            | 40,37                               | 0,59 | 59,04            |
| 2          | 18                                  | 11  | 71               | 0,80                              | 17,85 | 81,35            | 48,78                               | 1,03 | 50,19            |
| 3          | 20                                  | 13  | 67               | 0,24                              | 20,13 | 79,63            | 52,43                               | 1,25 | 46,32            |

TABELA 17- Diagrama de fases e composição das fases do sistema PEG 1500/POLICAJU  
a 27 °C ± 2 °C, pH 8,0

| PEG 1500   | Composição Total do Sistema (% p/p) |      |                  | Composição da Fase Superior (% p/p) |       |                  | Composição da Fase Inferior (% p/p) |      |                  |
|------------|-------------------------------------|------|------------------|-------------------------------------|-------|------------------|-------------------------------------|------|------------------|
|            | Goma                                | PEG  | H <sub>2</sub> O | Goma                                | PEG   | H <sub>2</sub> O | Goma                                | PEG  | H <sub>2</sub> O |
| "Tie-line" |                                     |      |                  |                                     |       |                  |                                     |      |                  |
| 1          | 21                                  | 13   | 66               | 11,91                               | 16,86 | 71,23            | 35,08                               | 7,45 | 57,47            |
| 2          | 22,5                                | 13,8 | 63,7             | 8,60                                | 19,80 | 71,60            | 38,72                               | 6,69 | 54,59            |

TABELA 18- Diagrama de fases e composição das fases do sistema PEG 4000/POLICAJU  
a 27 °C ± 2 °C, pH 8,0

| PEG 4000   | Composição Total do Sistema (% p/p) |     |                  | Composição da Fase Superior (%p/p) |       |                  | Composição da Fase Inferior (%p/p) |      |                  |
|------------|-------------------------------------|-----|------------------|------------------------------------|-------|------------------|------------------------------------|------|------------------|
|            | Goma                                | PEG | H <sub>2</sub> O | Goma                               | PEG   | H <sub>2</sub> O | Goma                               | PEG  | H <sub>2</sub> O |
| "Tie-line" |                                     |     |                  |                                    |       |                  |                                    |      |                  |
| 1          | 18                                  | 9   | 73               | 11,75                              | 11,56 | 76,69            | 34,49                              | 2,36 | 63,15            |
| 2          | 20                                  | 11  | 69               | 4,00                               | 17,59 | 78,41            | 42,55                              | 1,74 | 55,51            |
| 3          | 22                                  | 13  | 65               | 2,03                               | 19,14 | 78,83            | 49,71                              | 4,37 | 45,92            |

TABELA 19- Diagrama de fases e composição das fases do sistema PEG 8000/POLICAJU  
a 27 °C ± 2 °C, pH 8,0

| PEG 8000   | Composição Total do Sistema (% p/p) |     |                  | Composição da Fase Superior(%p/p) |       |                  | Composição da Fase Inferior (% p/p) |      |                  |
|------------|-------------------------------------|-----|------------------|-----------------------------------|-------|------------------|-------------------------------------|------|------------------|
|            | Goma                                | PEG | H <sub>2</sub> O | Goma                              | PEG   | H <sub>2</sub> O | Goma                                | PEG  | H <sub>2</sub> O |
| "Tie-line" |                                     |     |                  |                                   |       |                  |                                     |      |                  |
| 1          | 16                                  | 9   | 75               | 5,59                              | 12,64 | 81,77            | 38,99                               | 0,97 | 60,04            |
| 2          | 18                                  | 11  | 71               | 2,32                              | 16,86 | 80,82            | 43,76                               | 1,41 | 54,83            |
| 3          | 20                                  | 13  | 67               | 1,63                              | 22,18 | 76,19            | 44,37                               | 0,81 | 54,82            |

### 5.2.1. INFLUÊNCIA DA MASSA MOLAR DO PEG NA PARTIÇÃO DA TRIPSINA

As FIGURAS 14, 15 e 16 demonstram a influência da massa molar do PEG no coeficiente de partição da proteína. De modo geral, com o aumento da massa molar do polímero houve uma diminuição do coeficiente de partição (K) em todas as condições testadas. Ao se adicionar a proteína no sistema PEG 1500/POLICAJU 21%, pH 8,0, não houve a formação de fases.

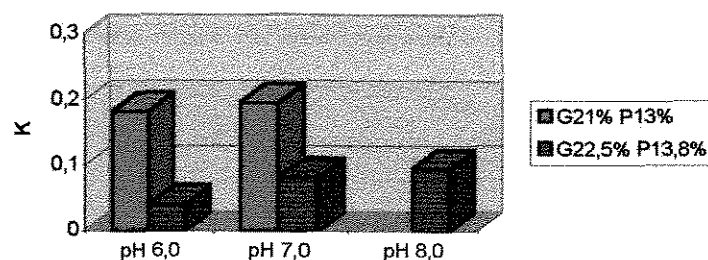


FIGURA 14- Influência do comprimento da "tie-line" e do pH no coeficiente de partição da tripsina em sistema PEG 1500/ POLICAJU a  $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

\*G- POLICAJU, P- PEG

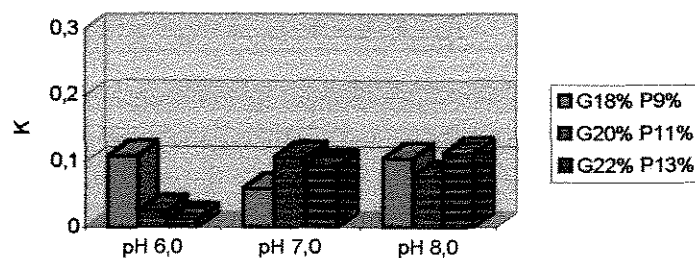


FIGURA 15- Influência do comprimento da "tie-line" e do pH no coeficiente de partição da tripsina em sistema PEG 4000/ POLICAJU a  $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

\*G- POLICAJU, P- PEG

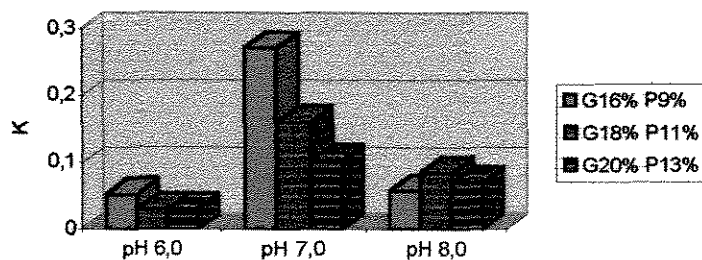


FIGURA 16- Influência do comprimento da "tie-line" e do pH no coeficiente de partição da tripsina em sistema PEG 8000/ POLICAJU a 27 °C ± 2 °C

\*G- POLICAJU, P- PEG

O PEG é um polímero composto por grupos  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$  ligados entre si por uma ligação éter. A solubilidade das proteínas em solução deste polímero tem sido interpretada por vários autores em termos dos efeitos do volume excluído do polímero (ATHA *et al.*, 1981; POLSON *et al.*, 1964). Segundo a teoria desenvolvida por estes autores, as proteínas são excluídas estereamente de zonas do solvente ocupadas pelo polímero, sendo as solubilidades proporcionais ao volume de solvente disponível (solvente sem PEG). Assim, quanto maior for o volume excluído do polietileno glicol, menor é o volume de solvente disponível, o que implica em uma diminuição de solubilidade das proteínas na fase rica em polímero e conseqüentemente uma diminuição do coeficiente de partição (ALBERTSSON, 1986). Sendo o PEG um polímero que possui um grupo hidroxila ( $-\text{OH}$ ) ligado a cada um dos grupos  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$  terminais, é de se esperar que, para cada uma determinada concentração, a sua hidrofobicidade diminua com a diminuição da massa molar, uma vez que aumenta a representação daqueles grupos hidrofílicos terminais (KULA, 1985).

Estudos realizados para a partição de cutinase em sistemas PEG/Hidroxipropilamido com polietileno glicol de massas molares 1000, 4000 e 8000 indicaram que partição foi pouco influenciada pela massa molar do PEG, uma vez que os coeficientes de partição não demonstraram uma tendência regular. Devido ao efeito do volume excluído, a tendência geralmente esperada seria um aumento nos coeficientes de partição com a diminuição do peso molecular do PEG. Contudo, é importante considerar que a alteração da massa molar

do polímero torna necessário alterar a concentração do mesmo, o que influencia o coeficiente de partição no sentido contrário (ALMEIDA *et al.*, 1998).

A importância da massa molar da proteína também deve ser considerada, uma vez que o efeito da massa molar do polímero está muito relacionado com a massa molar do biomaterial. De fato, a partição de aminoácidos ou proteínas de baixa massa molar não é muito influenciada por variações da massa molar dos polímeros, não acontecendo o mesmo com proteínas de maior massa molar (ALBERTSSON, 1986). Pode-se ter, como exemplo, o coeficiente de partição do citocromo C e  $\beta$ -galactosidase no sistema Dextrana 40 (0,18 e 0,24, respectivamente) com o correspondente valor no sistema Dextrana 500 (0,17 e 1,59, respectivamente) (ALBERTSSON, 1986).

Em estudos realizados para a purificação de cutinase em sistemas PEG/Hidroxipopilamido (ALMEIDA *et al.*, 1998) já descrito acima, os autores também observaram a importância do peso molecular da proteína e do polímero, uma vez que a cutinase apresenta baixa massa molar (22.000 Daltons) e que a partição torna-se mais sensível à massa molar do polímero para proteínas com massa molar maior do que 50.000 Daltons (TJERNELD, 1992). Este comportamento da cutinase poderia ser comparado ao comportamento da tripsina nos sistemas estudados, pois sua massa molar é de 25.000 Daltons.

Estudos de partição do citocromo b5 (13.600 Da) em sistemas PEG/fosfatos demonstraram um aumento no coeficiente de partição com a diminuição da massa molar do PEG (8000, 3350, 1000 e 400) (SARMENTO *et al.*, 1994). HUDDLESTON e colaboradores (1991) estudaram o coeficiente de partição de proteínas de *Saccharomyces cerevisiae* (levedura do pão) em sistemas PEG/fosfatos, observando para PEG 400 e 1000 uma preferência das proteínas pela fase superior. Para o PEG 3350, no entanto, a maioria das proteínas se concentrou na fase inferior, mostrando o efeito pronunciado da massa molar do PEG no coeficiente de partição. Estudos de partição de albumina de soro bovina (BSA, 66.500 Da) realizados por CHRISTIAN e colaboradores (1998), demonstraram que a alteração da massa molar do PEG não teve um efeito significativo na variação do coeficiente de partição para o sistema PEG/Arabinogalactana.

A partição de ácido clavulânico no sistema PEG/fosfato de potássio é muito influenciada pela variação na massa molar do PEG. Para PEG's de baixa massa molar, partições semelhantes foram observadas para PEG 400 e 1000 numa mesma "tie-line", para

pH 7 e 8. Para PEG de maior massa molar, 6000 e 4000, uma diminuição no coeficiente de partição com o aumento da massa molar foi observado. O efeito da massa molar do polímero pode ser atribuído ao aumento do número dos grupos hidrofílicos terminais em PEG de cadeia pequena, o qual diminui a hidrofobicidade total, e também ao efeito do volume excluído, que aumenta com o aumento da massa molar do polímero. Como o ácido clavulânico é uma molécula pequena, ela é provavelmente menos influenciada pelos efeitos do volume excluído (VIDEIRA & AIRES-BARROS, 1994).

Estudos realizados por SCHIMIDT e colaboradores (1994) sobre a correlação entre o efeito da concentração de proteína total e o comportamento da partição das proteínas (amiloglucosidase, subtilisina e inibidor de tripsina em sistemas PEG 4000/ sais de fosfato demonstraram que a solubilidade das proteínas em solução de PEG é governada pelo efeito de exclusão estérico e pela interação hidrofóbica entre proteína e o grupo etileno do PEG, o qual é provavelmente responsável pela alta solubilidade na fase rica em PEG de muitas proteínas hidrofóbicas. O PEG, sendo de natureza hidrofóbica, tende a interagir fortemente com as regiões não-polares das proteínas (boa afinidade por resíduos de aminoácidos apolares).

### **5.2.2. INFLUÊNCIA DO COMPRIMENTO DA "TIE-LINE" NA PARTIÇÃO DA TRIPSINA**

Analisando-se a influência do comprimento da "tie-line" no coeficiente de partição da tripsina, observou-se de modo geral, que a partição diminui com o aumento da "tie-line" para os três valores de pH's testados (FIGURAS 13, 14 e 15). A proteína se concentrou na fase inferior em todas as condições experimentais testadas.

Estudos realizados com a cutinase em sistema PEG 8000/hidroxipropilamido bruto demonstraram um leve decréscimo do coeficiente de partição com o aumento da "tie-line". Esta diminuição da partição se deve ao aumento da concentração de PEG que causa a exclusão molecular da proteína da fase superior, conforme discutido anteriormente (ALMEIDA *et al.*, 1998). O estudo da partição da  $\alpha$ -lactoalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina em sistemas PEG/hidroxipropilamido demonstrou que o aumento da "tie-line" provocou uma maior afinidade das proteínas para fase inferior diminuindo o K (ORTIN *et al.*, 1991). STURESSON e colaboradores (1990) estudaram o efeito da concentração do polímero na

partição da glicose 6-P-desidrogenase e lactatodesidrogenase em sistemas PEG8000/Aquaphase PPT. Os resultados obtidos demonstraram que as enzimas se concentraram preferencialmente na fase inferior com o aumento da "tie-line", semelhante ao sistema PEG/Dextrana. Estudos recentes realizados por CHRISTIAN e colaboradores (1998), também demonstraram a diminuição do K com o aumento de "tie-line" em um novo sistema PEG/Arabinogalactana.

Analisando os sistemas polímero/sais observa-se, um efeito contrário frente aos sistemas polímero/polímero. Estudos de partição do citocromo b5 em sistemas PEG/sais fosfato demonstraram um aumento da partição com o aumento do comprimento da "tie-line" (SARMENTO, 1994). VIDEIRA & AIRES-BARROS (1994) estudando a partição de ácido clavulânico em sistemas PEG/sais de fosfato também observaram o aumento do coeficiente de partição com o aumento do comprimento da "tie-line" para todos os PEG's testados.

O efeito do comprimento da "tie-line" no volume livre em sistemas de PEG/Sais de fosfato foi investigado por HUDDLESTON e colaboradores (1991). Abaixo do ponto crítico o volume livre da mistura PEG/Fosfatos é aproximadamente igual à soma dos volumes livres das soluções individuais daqueles componentes. Acima do ponto crítico, o volume livre da fase de cima, rica em polietileno glicol, permanece relativamente constante, enquanto que o volume livre da fase de baixo, rica em fosfatos, diminui rapidamente em resposta ao aumento da concentração dos componentes do sistema. Comparando estes resultados com os obtidos para as soluções individuais de polietileno glicol e de fosfatos pode se concluir que o aumento do comprimento da "tie-line" promove um aumento da concentração de fosfatos na fase rica em sal, enquanto que na fase rica em polietileno glicol esta permanece relativamente constante e igual ao seu limite de solubilidade em soluções daquele polímero. Na prática, isto resulta no "salting-out" das proteínas da fase rica em sal para a fase rica em polietileno glicol e conseqüentemente num aumento do coeficiente de partição até que os limites de solubilidade das proteínas na fase rica em sal, motivada pelo aumento da concentração de fosfatos, dá origem à transferência daquelas da fase rica em sal para a fase rica em polímero, aumentando o coeficiente de partição. O coeficiente de partição de proteínas é pois um parâmetro que depende das suas solubilidades relativas em cada uma das fases.

### **5.2.3. INFLUÊNCIA DO pH NA PARTIÇÃO DA TRIPSINA**

O pH é um fator importante no comportamento da partição de uma dada proteína e deve estar sempre relacionado com o ponto isoeletrico da mesma.

Analizando-se os diferentes pH's (6,0, 7,0 e 8,0), não foi possível estabelecer uma correlação da partição da tripsina com o aumento do pH em todos os sistemas estudados (1500, 4000, 8000). Para todos os pH's testados a tripsina particionou-se na fase inferior, rica em goma (FIGURAS 13, 14 e 15).

VENÂNCIO e colaboradores (1995) realizaram estudos de partição de BSA ( $pI = 5,1$ ) em sistemas PEG/Goma de guar, em condições semelhantes às descritas neste trabalho, para dois PEG's (4000 e 8000) nos pH's 6,0, 6,8 e 8,0. Os resultados demonstraram um leve aumento no coeficiente de partição com o aumento do pH em todos os sistemas testados.

Para o sistema PEG/Hidroxipropilamido bruto estudado por ALMEIDA e colaboradores (1998), em diferentes pH's (4,0, 6,0, 8,0, 9,0), o coeficiente de partição da cutinase ( $pI=7,8$ ) demonstrou pouca alteração com a variação do pH, embora um leve aumento deste parâmetro foi detectado com o aumento do pH de 4,0 para 8,0, porém em pH 9,0 o K foi menor do que em pH 8,0. Isto pode ser explicado com base nas propriedades hidrofóbicas do PEG, que pode se ligar aos resíduos hidrofóbicos da proteína. FORCINITI e colaboradores (1992), reportaram que as interações hidrofóbicas são maiores no pH perto do ponto isoeletrico da proteína e no nosso caso a faixa de pH estudada encontra-se afastada do ponto isoeletrico da tripsina ( $pI = 9,2$ ), explicando assim o perfil de partição semelhante desta proteína nos diferentes pH's.

### **5.2.4. COLUNA AGITADA POR CAMPÂNULAS PULSADAS**

Com a finalidade de obter-se um equipamento para a realização de processos de extração líquido-líquido, visando a separação e purificação de biomoléculas, é proposta e desenvolvida neste trabalho uma micro-coluna agitada por campânulas pulsantes, para a extração em contínuo.

#### 5.2.4.1. ESTUDOS PRELIMINARES NA MICRO-COLUNA PULSADA

Em face dos estudos preliminares realizados em batelada verificou-se que a “tie-line 1” é que a melhor apresentava resultados de transferência de tripsina da fase PEG (fase dispersa) para a fase rica em Policaju (fase contínua). Assim sendo, alimentou-se ambas as fases na coluna e, na fase dispersa, dissolveu-se a proteína testada (tripsina), cuja concentração inicial foi de 0,459 mg/mL.

Analizando-se a FIGURA 17 verifica-se que após 10 minutos de operação ocorreu uma transferência de cerca de 44% de proteína da fase PEG para a fase Policaju, e este valor manteve-se praticamente constante até 30 minutos de operação da coluna.

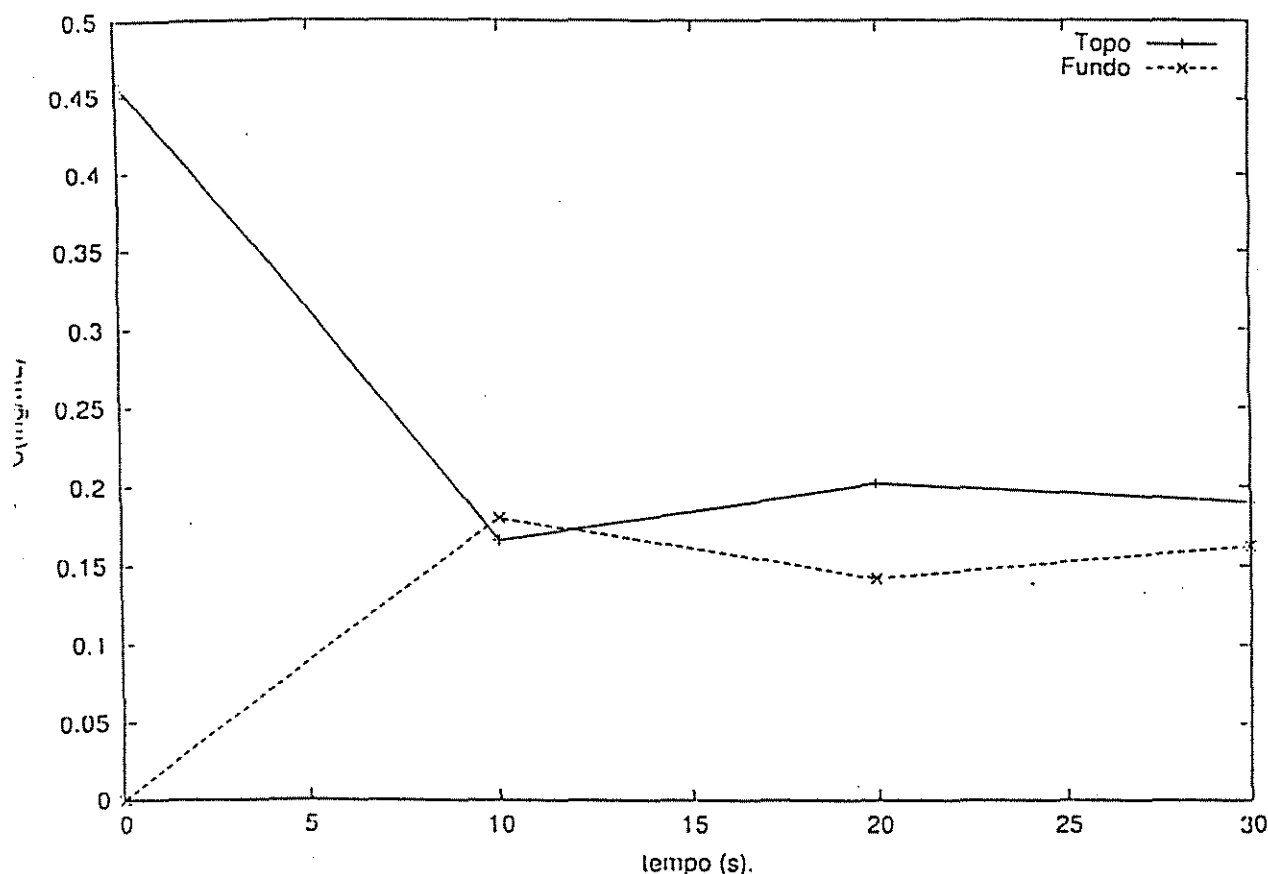


FIGURA 17- Transferência de tripsina da fase PEG para a fase rica em POLICAJU.  
(Condições: número de campânulas:2; pulsação 1:3; velocidade de pulsação:  
2.0 mL/min).

A FIGURA 18 colocada a seguir mostra o resultado de outro teste preliminar ( condições: número de campânulas:2; pulsação 1:5; velocidade de pulsação: 2.0 mL/min) e verificamos que nestas condições não ocorreu significativa transferência de proteína entre as fases.

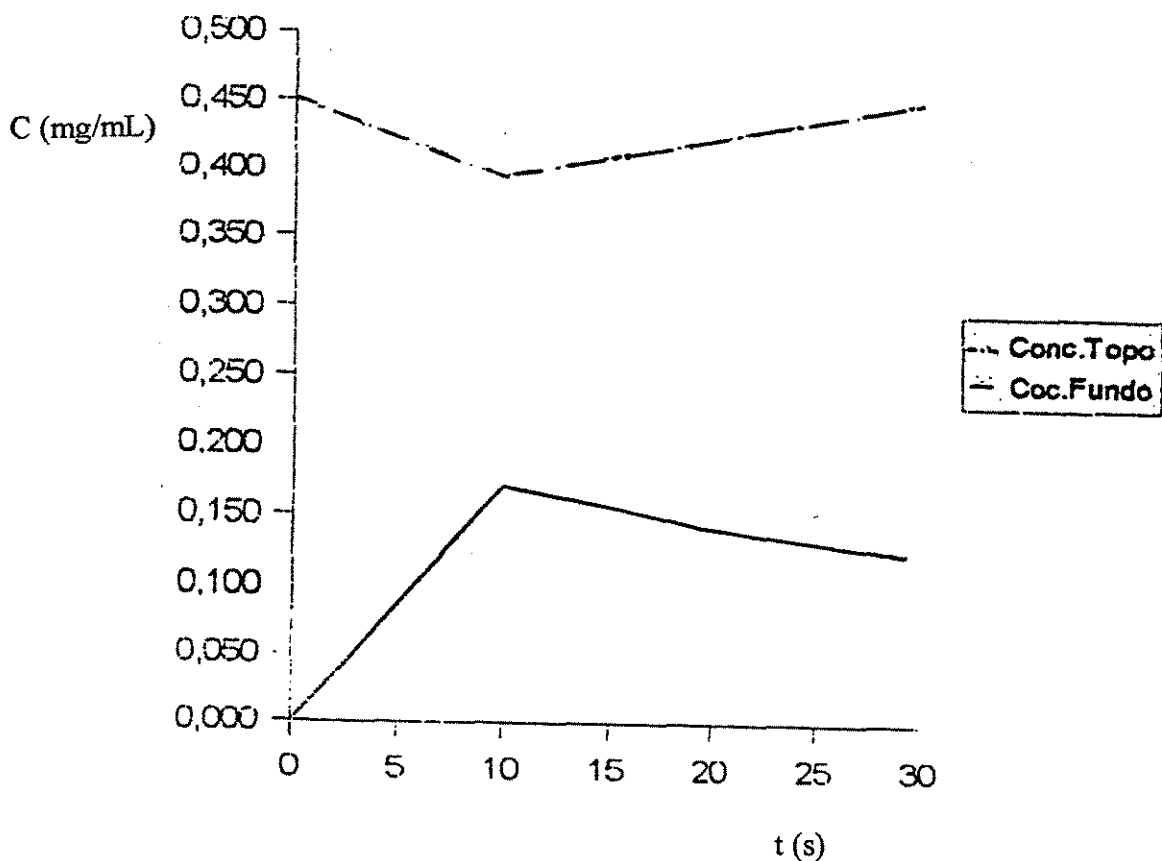


FIGURA 18- Transferência de tripsina da fase PEG para a fase rica em POLICAJU (Condições: número de campânulas:2; pulsação 1:5; velocidade de pulsação: 2.0 mL/min).

## 6 – CONCLUSÕES

- O aumento da massa molar do PEG acarretou um deslocamento da binodal, sendo necessária uma menor concentração dos polímeros.
- Na faixa de pH estudada, não ocorreu um deslocamento significativo das binodais dos sistemas.
- A micro-coluna de campânulas pulsantes apresentou excelente desempenho e a operação foi estável, em todas as condições estudadas.
- Os estudos preliminares de transferência de tripsina numa coluna de campânulas pulsantes indicou que ocorreu uma recuperação de cerca de 40% (concentração de proteína) de tripsina na fase Policaju. (Condições: número de campânulas:2; pulsação 1:3; velocidade de pulsação: 2.0 mL/min).

## **7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

Algumas sugestões para trabalhos futuros:

- Estudar a partição de outros bioprodutos no sistema caracterizado
- Realizar experimentos variando a razão entre as vazões das fases leve e pesada.
- Avaliar novas variáveis operacionais e geométricas de modo a expandir o conhecimento do extrator
- Desenvolver correlações para a predição do comportamento do sistema. Obter correlações para a Eficiência de Separação, Índice de Recuperação do soluto, Coeficiente de Transferência de massa e Fração de Retenção da fase dispersa.
- Analisar economicamente o custo do processo e estudar a reciclagem dos produtos formadores das fases

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTSSON, P- A. **Partition of cell particles and macromolecules**. New York, Wiley, 3 ed, 1986.

BOLAND, J.M. Extraction of proteins from animal tissue using multiphase aqueous systems. **Bioseparation**, v.1,p. 293-304, 1990.

BOLAND, J.M.; HESSELINK P. G. M.; PAPAMICHAEL, N.; HUSTEDT, H. Extractive purification of enzymes from animal using aqueous two-phase systems: Pilot scale studies. **Journal of Biotechnology**, v.19, p. 19-34, 1991.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, vol. 72, p. 248-254, 1976.

CHRISTIAN, T. J. MANLEY-HARRIS, M., RICHARDS, G. N. A preliminary study of the use of larch arabinogalactan in aqueous two-phase systems, **Carbohydrate Polymers**, v. 35, p. 7-12, 1998.

DIAMOND, A. D., HSU, J. T. Aqueous two phase systems for biomolecule separation. **Advances in Biochemistry Engineering**, v. 47, p. 89-135, 1992.

EITMAN, M. A. Prediction partition coefficients of multi-charged solutes in aqueous two-phase systems, **Journal of Chromatography**, v. 668, p. 21-30, 1994.

GROßMANN, C., TINTINGER, R., ZHU, J. MAURER, G. Partitioning of low molecular combination peptides in aqueous two-phase systems of poly(ethylene glycol) and dextran in the presence of small amounts of K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer at 293 K; experimental results and prediction, **Biotechnology and Bioengineering**, v. 60, p. 699-711, 1998.

KAWASE, Y. Dispersed-phase hold up and mass transfer in a rotating disc contactor with perforated disks. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 48, p. 247-260, 1990.

KING, R., BLANCH, H. W., PRAUSNITZ, J. M. Molecular thermodynamics of aqueous two-phase systems for the phase separations, **Analytical I. Engineering Chemical Journal**, v.34, p. 1585-1594, 1988.

KRONER, K. H., HUSTEDT, H., KULA, M-R. Extractive enzyme recovery: economic considerations, **Process Biochemistry**, v. 19, p. 179-189, 1984.

KULA, M-R. Trends and future prospects of aqueous two-phase extraction. **Bioseparation**, v.1, p. 181-189, 1990.

KULA, M-R., KRONER, K. H.; HUSTED, T. H. Purification of enzymes by liquid-liquid extraction. **Advances in Biochemical Engineering**, v. 24, p. 73-118, 1982.

KULA, M-R., KRONER, K. H.; HUSTED, T. H. Large scale protein recovery using aqueous phase systems. In: FISHER, D. E.; SUTHERLAND, I. A. (eds) **Separations using aqueous phase systems**. London; Plenum press, p. 295-298, 1989.

LIN, D-Q., ZHU, Z-Q., MEI, L-H. Affinity extraction of lactate dehydrogenase by aqueous polymer two phase systems. **11<sup>th</sup> International Conference on Partitioning in Aqueous Two-phase Systems**, Gulf Shores, Alabama, USA, June 27- July 2, 1999.

MENESTRINA, J. M., IACOMINI, M., JONES, C., Gorin, P. A. j. Similarity of monosaccharide, oligosaccharide and polysaccharide structures in gum exudate of *Anacardium occidentale*, **Phytochemistry**, v. 47, p. 715-721, 1998.

PAPAMICHAEL, N., BORNER, B., HUSTEDT, A. Continuous aqueous-phase extraction of proteins – automated processing and recycling of process chemicals. **Journal of Chemistry Technology and Biotechnology**, v. 54, p. 47-55, 1992.

PAULA, R. C. M., RODRIGUES, J. F. Composition and rheological properties of cashew tree gum, the exudate polysaccharide from of *Anacardium occidentale* L. **Carbohydrate polymers**, v. 26, p. 177-181, 1995.

RINAUDO, M., MILLAS, M. “**Polieletrólitos**”, ed R.A.M.C. Groote e A.A.S. Curvelo, USP, São Carlos, 1991.

SAWANT, S. B., SIKDAR, 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.

SKOOG, B. Determination of polyethylene glycols 4000 and 6000 in plasma protein preparations. **Journal of Blood Transfusion and Immunopathology**, v. 37, n. 6, p. 345-349, 1979.

STURESSON, S.; TJERNELD, F.; JOHANSSON, G. Partition of macromolecules and cell particles in aqueous two-phase systems based on hydroxypropyl starch and poly(ethylene glycol), **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 3, p. 281-295, 1990.

TJERNELD, F., BERNER, S., CAJARVILLE, A.E., JOHANSSON, G. New aqueous two-phase system based on hydroxypropyl starch useful in enzyme purification. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 8, p. 417-423, 1986.

VENÂNCIO, A. A. D., TEIXEIRA, J. A. Protein mass transfer studies on Spray column using the PEG-Reppal PES 100 aqueous two-phase systems, **Bioprocess Engineering**, v. 13, p. 251-255, 1995.

VENÂNCIO, A. A. D., TEIXEIRA, J. A., MOTA, M. Evaluation of crude hydroxypropyl starch as a bioseparation aqueous two-phase-forming polymer. **Biotechnology Progress**, v. 9, p. 635-639, 1993.

WALTER, H., JOHANSSON, G. Partitioning in aqueous two-phase systems; na overview. **Analytical Biochemistry**, v. 155, p. 215-242, 1986.