

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: SISTEMAS DE  
PROCESSOS QUÍMICOS E INFORMÁTICA

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

**Estudo da Extração de Tripsina em Sistemas  
de Duas Fases Aquosas numa Micro Coluna**

Autor: André Luis Sakaguchi Hirose

Orientador: Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi

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

Março / 2001

Campinas – São Paulo



UNIDADE	BC
L. CHAMADA	T/ UNICAMP
	H615e
Ex.	
COMBO BC	46132
PROC.	16-392/01
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREC.	R\$ 11,00
DATA	17-08-01
N.º CPU	

CM00158849-2

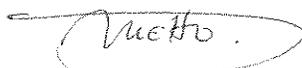
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

H615e Hirose, André Luis Sakaguchi  
Estudo da extração de tripsina em sistemas de duas  
fases aquosas numa micro coluna / André Luis  
Sakaguchi Hirose. --Campinas, SP: [s.n.], 2001.

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

1. Biotecnologia. 2. Extração por solventes. I.  
Tambourgi, Elias Basile. II. Universidade Estadual de  
Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III.  
Título.

Dissertação de Mestrado , defendida por André Luis Sakaguchi Hirose , em 30 de março de 2001 e aprovada pela banca julgadora constituída pelos professores doutores



Maria Marta Neto – UNIBAN-SP



Ana Paula Brescancini Rabelo-PUC-Poços de Caldas



Elias Basile Tambourgi - UNICAMP

Esta versão corresponde à final da Dissertação de Mestrado , defendida por André Luis Sakaguchi Hirose , em 30 de março de 2001



Prof Dr Elias Basile Tambourgi-orientador

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi, pela orientação, amizade, incentivo e apoio para realização deste trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Aos meus amigos Candice, Amarildo, Vinicius, Fernanda, Juliana (Uberlândia), Júlio, Juliana (Rio), Rodrigo, Arlan, Arnaldo, Giselle, Tatiana, Elaine, Eliana, Ana Cláudia, Rafael, Marta, Jones, Alexandre (Teixeira), Alexandre (Simões), Gilsinei, Lurdinha, Patrícia e Victor pelo companheirismo e amizade durante o desenvolvimento do trabalho.

À amiga Ana Paula, pela amizade e pela preciosa ajuda e sugestões dadas no decorrer do trabalho.

À secretária Rosa, às analistas de sistemas Andréia e Joseane pela paciência, amizade, apoio e incentivos prestados na execução deste trabalho.

Ao meu amigo Sérgio, pela amizade e colaboração no tratamento estatístico dos dados.

Aos professores, funcionários e amigos da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp pela amizade, apoio e incentivo.

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

*"Há grandes homens que fazem com que todos se sintam pequenos. Mas o verdadeiro grande homem é aquele que faz com que todos se sintam grandes."*

*Gilbert Keith Chesterton, escritor inglês*

## RESUMO

A viabilidade da produção e comercialização de substâncias obtidas por meio de processos biotecnológicos depende de técnicas de separação empregadas na purificação dos compostos desejados. Algumas características das misturas envolvidas nesses processos, tais como baixa concentração inicial, necessidade de produtos de alto grau de pureza, sensibilidade térmica e necessidade de preservar as propriedades dos compostos, fazem com que esta etapa de purificação exija um processo econômico e que seja biologicamente compatível com os produtos envolvidos. Neste sentido, a extração líquido-líquido por sistemas aquosos bifásicos se apresenta como uma técnica de separação extremamente interessante.

Tendo-se em vista o desenvolvimento de extratores mais eficientes, é fundamental o estudo da hidrodinâmica e dos mecanismos de transferência de massa no interior dos extratores.

Este trabalho teve como objetivo principal o estudo de uma micro-coluna agitada por campânulas perfuradas pulsantes que foi usada para extração da proteína. O sistema de agitação formado por campânulas pulsadas tem como objetivo promover uma melhor mistura dos líquidos no interior da coluna e assim, aumentar a transferência de massa. Os estudos foram realizados com sistemas de duas fases aquosas formadas por PEG (polietileno glicol) e sal (fosfato de potássio mono e bibásico). Realizou-se o estudo da extração em descontínuo, a fim de encontrar-se as concentrações de equilíbrio e os melhores sistemas de extração (concentrações de PEG e de sal e massa molecular de PEG). A melhor condição obtida foi usada na operação contínua da micro-coluna.

Pôde-se concluir que a coluna de extração testada teve um rendimento superior de proteína extraída que os encontrados nos tubos de ensaio, e é adequada para utilização em sistemas biotecnológicos.

## ABSTRACT

The production and commercialization suitability of substance obtained by means of biotechnological processes depend on the separation techniques used for the purification of the desired compounds. Some features of the mixtures involved in these processes, such as low initial concentration, high purity level products desired, thermal sensitivity and the need of preserving the compounds properties, require a purification step that must be economical and biologically compatible with the chemicals involved. As a matter of fact, liquid-liquid extraction by aqueous two-phase systems is presented as an outstanding separation technique.

The hydrodynamics and the mass transfer mechanism in the interior of the extractors are fundamental for the development of more efficient equipment.

The more goal of this work was the study of a micro-column stirred by bell-shaped meshes for the extraction of a protein. The stirring system composed by the bell-shaped meshes promotes a better mixture of the fluids in the inner side of the column and, as a result, increase the mass transfer. The aqueous two-phase systems studied were formed by PEG (polyethylene glycol) and salts (Potassium Phosphate monobasic and dibasic). It was done bath experiments, for finding the equilibrium concentrations and the better system for the extraction (PEG and salt concentrations and polymer molecular weight). The better condition obtained was used in the continuous extraction in the micro-column.

As a conclusion, the extraction apparatus tested here had a much better yield of protein recovery than the observed in the batch system, what makes it suitable for use in biotechnological systems.

# ÍNDICE

<b>Índice de Figuras</b>	<b>XIII</b>
<b>Índice de Tabelas</b>	<b>XVI</b>
<b>Nomenclatura</b>	<b>XVIII</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>XIX</b>
<b>1 – Introdução</b>	<b>3</b>
<b>2 – Revisão da Literatura</b>	<b>9</b>
<b>2.1 – ASPECTOS GERAIS DE PROTEÍNAS</b>	<b>9</b>
<b>2.1.1 – Proteínas</b>	<b>9</b>
<b>2.1.2 – Composição das Proteínas</b>	<b>9</b>
<b>2.1.3 – A Conformação das Proteínas</b>	<b>12</b>
<b>2.1.4 – Estruturas das Proteínas</b>	<b>13</b>
<b>2.1.5 – Desnaturação</b>	<b>14</b>
<b>2.1.6 – Enzimas</b>	<b>15</b>
<b>2.1.7 – Propriedades Gerais das Enzimas</b>	<b>16</b>
<b>2.1.8 – Classificação e Nomenclatura</b>	<b>17</b>
<b>2.1.9 – Especificidade Enzimática</b>	<b>18</b>
<b>2.1.10 – Eficiência Catalítica</b>	<b>21</b>
<b>2.1.11 – Tripsina</b>	<b>22</b>
<b>2.2 – SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS</b>	<b>23</b>

-----

<b>2.2.1 – Diálise</b>	<b>24</b>
<b>2.2.1 – Filtração em Gel</b>	<b>25</b>
<b>2.2.3 – Eletroforese</b>	<b>26</b>
<b>2.2.4 – Cromatografia de Afinidade</b>	<b>27</b>
<b>2.2.5 – Extração Líquido-Líquido</b>	<b>28</b>
<b>2.2.6 – Conceitos Básicos</b>	<b>31</b>
<b>2.2.7 – Equipamentos Usados nos Processos de Extração</b>	<b>33</b>
<b>2.2.8 – Colunas Pulsadas</b>	<b>39</b>
<b>2.2.9 – Transferência de Massa em um Processo de Extração Líquido-Líquido</b>	<b>41</b>
<b>2.2.10 – Princípios de Transferência de Massa</b>	<b>42</b>
<b>2.2.11 – O Coeficiente de Transferência de Massa</b>	<b>43</b>
<b>2.2.12 – Eficiência de Extração</b>	<b>47</b>
<b>2.2.13 – Características de Transferência de Massa em Processos de Extração Líquido-Líquido</b>	<b>49</b>
<b>2.2.14 – Fração de Retenção da Fase Dispersa (“Hold-up”)</b>	<b>51</b>
<b>2.2.15 – As Regiões de Operação</b>	<b>51</b>
<b>2.3 – SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS</b>	<b>53</b>
<b>2.3.1 – Tipos de Sistemas de Duas Fases Aquosas</b>	<b>56</b>
<b>2.3.2 – Polietilenoglicol</b>	<b>58</b>
<b>2.3.3 – Sistemas PEG/Sal</b>	<b>56</b>
<b>2.3.4 – Partição de Proteínas em Sistemas de Duas Fases Aquosas</b>	<b>61</b>

---

<b>2.4 – MODELOS PARA A PARTIÇÃO DE PROTEÍNAS ENTRE AS FASES</b>	<b>64</b>
2.4.1 – Teoria de Brönsted	64
2.4.2 – Modelo de Albertsson	66
2.4.3 – Teorias Termodinâmicas	67
<b>2.5 – PLANEJAMENTO E ANÁLISE DE EXPERIMENTOS</b>	<b>68</b>
2.5.1 – Conceitos Estatísticos Básicos	69
2.5.2 – Seleção de Variáveis	71
2.5.3 – O Planejamento Fatorial	74
2.5.4 – Modelos Empíricos	77
<b>3 – Equipamento e Procedimento Experimental</b>	<b>85</b>
3.1 – Introdução	85
3.2 – Campânulas	85
3.3 – Descrição do Equipamento	87
3.4 – Procedimento Experimental – Operação da Micro-Coluna	91
3.5 – Procedimento Experimental para Obtenção da Fração de Retenção da Fase Dispersa	93
3.6 – Procedimento Experimental Usado no Estudo da Transferência de Massa	94
3.7 – Variáveis Estudadas	94
<b>4 – Materiais e Métodos</b>	<b>98</b>
4.1 – REAGENTES	98

<b>4.2 – PROTEÍNA</b>	<b>98</b>
<b>4.3 – PREPARAÇÃO DOS SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS</b>	<b>99</b>
<b>4.3.1 – Extração em Descontínuo</b>	<b>99</b>
<b>4.3.2 – Extração Contínua de Tripsina em Sistemas de Duas Fases Aquosas</b>	<b>101</b>
<b>4.4 – MÉTODO ANALÍTICO</b>	<b>102</b>
<b>4.4.1 – Preparação do Reagente Bradford</b>	<b>102</b>
<b>4.4.2 – Determinação do Conteúdo Protéico</b>	<b>102</b>
<b>4.5 – CÁLCULO DO ÍNDICE DE RECUPERAÇÃO DO SOLUTO</b>	<b>103</b>
<b>4.6 – CÁLCULO DO COEFICIENTE DE PARTIÇÃO</b>	<b>103</b>
<b>4.7 – CÁLCULO DO “HOLD-UP”</b>	<b>104</b>
<b>5 – Resultados e Discussões</b>	<b>107</b>
<b>5.1 – EXTRAÇÃO DESCONTÍNUA</b>	<b>107</b>
<b>5.1.1 – Parâmetros Experimentais</b>	<b>107</b>
<b>5.1.2 – Efeito do PEG</b>	<b>112</b>
<b>5.1.3 – Efeito do pH</b>	<b>114</b>
<b>5.1.4 – Coeficiente de Partição</b>	<b>115</b>
<b>5.2 – EXTRAÇÃO CONTÍNUA</b>	<b>117</b>
<b>5.2.1 – Seleção das Variáveis</b>	<b>117</b>
<b>5.2.2 – Cálculo do “Hol-up”</b>	<b>118</b>
<b>5.2.3 – Extração Contínua de Tripsina na Micro-Coluna de Campânulas Pulsantes</b>	<b>119</b>

<b>5.2.4 – Cálculo do Índice de Recuperação do Sóluto para os Ensaios Realizados</b>	<b>123</b>
<b>5.3 – PLANEJAMENTO FATORIAL</b>	<b>124</b>
<b>5.3.1 - Resultados dos Efeitos</b>	<b>124</b>
<b>5.3.2 – Modelo Empírico</b>	<b>127</b>
<b>5.3.3 – Análise da Superfície de Resposta para o Sistema</b>	<b>130</b>
<b>6 – Conclusões e Sugestões</b>	<b>134</b>
<b>6.1 – SUGESTÕES</b>	<b>134</b>
<b>7 – Referências Bibliográficas</b>	<b>138</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 2.1 – Estrutura Geral dos Aminoácidos</b>	<b>11</b>
<b>Figura 2.2 – O Centro Ativo da Enzima tem Estrutura Espacial Específica</b>	<b>20</b>
<b>Figura 2.3 – Diálise</b>	<b>25</b>
<b>Figura 2.4 – Filtração em Gel</b>	<b>26</b>
<b>Figura 2.5 – Eletroforese</b>	<b>27</b>
<b>Figura 2.6 – Cromatografia de Afinidade</b>	<b>28</b>
<b>Figura 2.7 – Esquema de um Sistema de Contato e Separação em Estágios</b>	<b>35</b>
<b>Figura 2.8 – Esquemas de Colunas Recheadas e “Spray”</b>	<b>37</b>
<b>Figura 2.9 – Esquema de Colunas de Fluxo Pulsado e de Pratos Pulsados</b>	<b>38</b>
<b>Figura 2.10 – Um Experimento com 2 Fatores, com as Respostas y Mostradas nos vértices</b>	<b>75</b>
<b>Figura 3.1 – Agitação Através de Campânulas Pulsantes Numa Coluna de Extração Líquido-Líquido Pulsada</b>	<b>86</b>
<b>Figura 3.2 – Esquema da Micro-Coluna de Campânulas Pulsantes</b>	<b>88</b>
<b>Figura 3.3 – Campânulas Soldadas à Haste</b>	<b>89</b>
<b>Figura 3.4 – Micro-Coluna de Campânulas Pulsantes</b>	<b>90</b>
<b>Figura 3.5 – Montagem do Sistema de Extração Líquido-Líquido</b>	<b>92</b>
<b>Figura 4.1 – Extração Descontínuo da Tripsina</b>	<b>100</b>
<b>Figura 5.1 – Gráfico da Extração Descontínua de Tripsina</b>	<b>108</b>

para PEG 1500 pH=6,0	
Figura 5.2 – Gráfico da Extração Descontinua de Tripsina para PEG 1500 pH=7,0	109
Figura 5.3 – Gráfico da Extração Descontinua de Tripsina para PEG 4000 pH=6,0	110
Figura 5.4 – Gráfico da Extração Descontinua de Tripsina para PEG 4000 pH=7,0	111
Figura 5.5 – Gráfico da Extração Descontinua de Tripsina para pH=6,0	112
Figura 5.6 – Gráfico da Extração Descontinua de Tripsina para Ph=7,0	113
Figura 5.7 – Gráfico da Extração Descontinua de Tripsina para PEG 1500	114
Figura 5.8 – Gráfico da Extração Descontinua de Tripsina para PEG 4000	115
Figura 5.9 – Gráfico do Coeficiente de Partição da Tripsina para PEG 4000	116
Figura 5.10 – Gráfico do Coeficiente de Partição da Tripsina para PEG 1500	116
Figura 5.11 – Gráfico do Hold-up x Extração (%)	119
Figura 5.12 – Gráfico da Concentração de Tripsina x Tempo de Operação da Coluna para Ensaio 1	120
Figura 5.13 – Gráfico da Concentração de Tripsina x Tempo de Operação da Coluna para Ensaio 2	120
Figura 5.14 – Gráfico da Concentração de Tripsina x Tempo de Operação da Coluna para Ensaio 3	121
Figura 5.15 – Gráfico da Concentração de Tripsina x Tempo	122

de Operação da Coluna para Ensaio 4	
Figura 5.16 – Gráfico da Concentração de Tripsina x Tempo de Operação da Coluna para Ensaio 5	122
Figura 5.17 – Gráfico do Índice de Recuperação do Sóluto em Relação aos Ensaios Realizados na Micro-Coluna	123
Figura 5.18 – Gráfico Pareto dos Efeitos	125
Figura 5.19 – Superfície de Resposta do Sistema	130
Figura 5.20 – Curva de Nível da Superfície de Resposta	131

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Abreviações dos Aminoácidos	10
Tabela 2.2 – Reações Catalisadas por Diferentes Classes de Enzimas	18
Tabela 2.3 – Pesos Moleculares Aproximados de Enzimas e de seus Substratos	19
Tabela 2.4 – pH Ótimo de Enzimas	22
Tabela 2.5 – Ponto Isoelétrico de Algumas Proteínas	24
Tabela 2.6 – Exemplos de Sistemas de Duas Fases Aquosas	57
Tabela 2.7 – Matriz de Planejamento Fatorial 2 <sup>4</sup>	74
Tabela 2.8 – Rendimento de uma Reação em Função da Temperatura, para o Catalisador A	76
Tabela 2.9 – Análise da Variância para o Ajuste de um Modelo Linear com 2 Parâmetros	79
Tabela 3.1 – Variáveis Estudadas, Relativas à Operação da Micro-Coluna	94
Tabela 4.1 – Reagentes Utilizados nos Métodos Analíticos	98
Tabela 4.2 – pH das Soluções de Sais Fosfatos de Razões [(mol/L)/(mol/L)]	99
Tabela 4.3 – Composição dos Sistemas de Duas Fases Aquosas PEG-Fosfatos de Potássio Usados na Extração de Proteínas	101
Tabela 5.1 – Resultado da Extração Descontínua de Tripsina para PEG 1500 e pH=6,0	108
Tabela 5.2 – Resultado da Extração Descontínua de Tripsina	109

para PEG 1500 e pH=7,0	
Tabela 5.3 – Resultado da Extração Descontínua de Tripsina para PEG 4000 e pH=6,0	110
Tabela 5.4 – Resultado da Extração Descontínua de Tripsina para PEG 4000 e pH=7,0	111
Tabela 5.5 – Resultado da Extração Descontínua de Tripsina para pH=6,0	112
Tabela 5.6 – Resultado da Extração Descontínua de Tripsina para pH=7,0	113
Tabela 5.7 – Resultado da Extração Descontínua de Tripsina para PEG 1500	114
Tabela 5.8 – Resultado da Extração Descontínua de Tripsina para PEG 4000	114
Tabela 5.9 – Lista de Variáveis para Seleção	117
Tabela 5.10 – Resultado das Variáveis	118
Tabela 5.11 – Efeitos Calculados para o Planejamento Fatorial 2 <sup>2</sup> com a Resposta Extração	124
Tabela 5.12 – Análise da Variância para Ajuste do Modelo Linear	128
Tabela 5.13 – Intervalos de Confiança (95%) para os Coeficientes da Equação 5.4	129

## NOMENCLATURA

$k_R$  – Coeficiente de Transferência de Massa da Fase Refinado

$k_E$  – Coeficiente de Transferência de Massa da Fase Extrato

$y_R$  – Concentração Molar do Solute na Fase Refinado

$y_E$  – Concentração Molar do Solute na Fase Extrato

$D$  – Difusividade de Proteínas ( $m/s^2$ )

$T$  – Temperatura (K)

$M_p$  – Massa Molecular de Proteínas (kg/kmol)

$\mu_D$  – Viscosidade da Fase (Pa.s)

$I_R$  – Índice de Recuperação do Solute

$c_f$  – Fração Mássica de Solute na Alimentação

$c_r$  – Fração Mássica de Solute no Refinado

$K$  – Coeficiente de Partição

$C_t$  – Concentração da Proteína na Fase Topo

$C_b$  – Concentração da Proteína na Fase Fundo

$k$  – Constante de Boltzman

## ABREVIATURAS

**PEG – Polietileno Glicol**

**PRDC – Coluna de Discos Perfurados Rotativos**

**RDC – Coluna de Discos Rotativos**

# **Capítulo 1**

## **Introdução**

## **1 - INTRODUÇÃO**

A modernização dos processos industriais e a necessidade de se obter produtos de melhor qualidade e viáveis economicamente, resultaram em grandes avanços na área da Biotecnologia. Isto vêm possibilitando a produção de proteínas de interesse comercial por meio de processos fermentativos que utilizam microorganismos geneticamente manipulados. Neste sentido, a extração líquido-líquido aplicada à biotecnologia é um campo tecnológico extremamente importante para o desenvolvimento de novos métodos de extração e purificação de proteínas ("downstream processing").

A viabilidade da comercialização e da produção em escala industrial de substâncias obtidas por meio de processos biotecnológicos depende significativamente das técnicas de separação empregadas na purificação do composto desejado. Assim, a etapa de purificação requer um método biocompatível e econômico. As características de baixa concentração inicial, elevado grau de pureza dos produtos, a sensibilidade térmica e a necessidade de preservar as principais propriedades dos compostos, tornam o processo de produção oneroso devido ao seu alto custo industrial.

Alguns métodos clássicos de purificação geralmente utilizados no processo de extração dos produtos obtidos por fermentação, envolvem múltiplos procedimentos entre eles várias etapas cromatográficas com elevada perda de tempo, levando, muitas vezes, a baixos rendimentos de recuperação do produto. Neste sentido, o emprego da extração líquido-líquido vem eliminar ou sinergizar o uso de algumas destas operações com vantagens, pois ao contrário da maioria dos processos exclusivamente em batelada existentes tais como cromatografia, os

sistemas líquido-líquido podem ser aplicados em contínuo; ou até mesmo como etapa de pré-purificação cromatográfica.

Os processos clássicos de extração líquido-líquido consistem na separação dos componentes de uma mistura por contato entre duas fases líquidas imiscíveis, explorando a diferença de potencial químico entre um dos solutos e os solventes para promover a transferência preferencial do mesmo entre uma fase e outra.

Embora tal processo possua um vasto histórico de aplicações em larga escala bem sucedidas nos mais variados segmentos industriais (como petroquímico e farmacêutico), apresenta contribuição ainda muito modesta na purificação de bioprodutos tais como proteínas. Algumas características específicas das proteínas como moléculas em relação à aplicação direta e exclusiva dos solventes orgânicos regularmente utilizados nos processos convencionais são responsáveis por este fato, tais como:

- As proteínas globulares em sua maioria são insolúveis nos solventes apolares;
- Os solventes orgânicos apresentam baixa ou nenhuma seletividade em relação às proteínas e seus contaminantes;
- A exposição direta da proteína ao solvente pode causar sua desnaturação total ou parcial devido à sua modificação estrutural.

Assim uma das soluções apontadas para sanar estes problemas e viabilizar a extração líquido-líquido como processo de separação de proteínas foi proposta

inicialmente por Luisi (1997, 1979) e Martinek *et al.* (1978), através da utilização de sistemas biomiméticos, ou seja, sistemas que tivessem características análogas ao comportamento das membranas celulares semiporosas dos seres vivos.

Um outro meio que pode ser usado em processos de extração líquido-líquido são os sistemas de duas fases aquosas. Os sistemas de duas fases aquosas podem ser facilmente ampliados na escala de laboratório para a planta piloto, sem mudança na natureza ou eficiência do processo. Além disso, desde que não haja fase sólida, a mistura entre duas fases é possível e o transporte interfásico é rápido. Às vezes, muito pouco tempo é requerido para que a maioria dos sistemas bifásicos alcance o equilíbrio. Um outro ponto favorável é que as fases são compatíveis com quase todas as proteínas conhecidas. Portanto, sistemas com duas fases aquosas é uma alternativa extremamente atrativa para a separação e purificação de proteínas, em larga escala. Esses sistemas que vêm sendo testados com sucesso são sistemas constituídos por duas fases aquosas imiscíveis ou parcialmente miscíveis, obtidas pela adição de dois polímeros hidrofílicos, como por exemplo, o polietileno glicol (PEG) e a dextrana ou de um desses polímeros e um sal, como por exemplo, o PEG e o fosfato de potássio.

Rabelo *et al.* (1999) utilizaram uma coluna de campânulas pulsadas para a extração do citocromo b5 num sistema de duas fases aquosas PEG/fosfato de potássio, obtendo uma extração máxima de 80% em contínuo e uma extração em torno de 70% no estado estacionário, na frequência de pulsação 1 pulso/segundo.

Este trabalho tem como objetivo estudar a extração da Tripsina num equipamento de extração que opera continuamente e com escoamento contracorrente, agitado por campânulas pulsadas.

Primeiramente, foram realizados experimentos em descontínuo (tubo de ensaio), sendo obtidos as melhores condições de extração, relacionadas ao sistema de duas fases aquosas, por exemplo, massa molecular e concentrações de PEG e de sal (fosfatos de potássio). Após a determinação da melhor condição obtida em descontínuo, esta foi usada na operação contínua da coluna, a fim de avaliar o comportamento do equipamento e do sistema durante a operação. Os parâmetros analisados no equipamento foram a frequência de pulsação e a razão entre as vazões das fases. Quanto à hidrodinâmica foi analisada a fração retida da fase dispersa ("hold up"). Quanto à transferência de massa, foi avaliado o índice de recuperação do soluto.

## **Capítulo 2**

### **Revisão da Literatura**

## **2 – REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Aspectos Gerais de Proteínas**

#### **2.1.1 Proteínas**

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

As proteínas são moléculas orgânicas mais abundantes nas células e constituem 50% ou mais de seu peso seco. São encontradas em todas as partes de todas as células, uma vez que são fundamentais sob todos os aspectos da estrutura e função celular. Existem muitas espécies diferentes de proteínas, cada uma especializada para uma função diferente. Além disso, a maior parte da informação genética é expressa pelas proteínas.

#### **2.1.2 A Composição das Proteínas**

Muitas proteínas foram isoladas em forma cristalina pura. Todas contêm carbono, hidrogênio, nitrogênio e oxigênio, e quase todas contêm elementos adicionais, particularmente fósforo, ferro, zinco, e cobre. Os pesos moleculares das proteínas são extremamente elevados, porém, por hidrólise ácida, as moléculas protéicas liberam uma série de compostos orgânicos simples de baixo peso

molecular, os  $\alpha$ -aminoácidos.

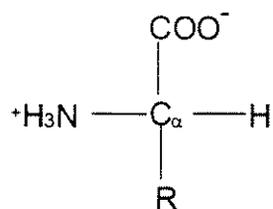
Existem 20 aminoácidos diferentes como mostrado na (Tabela 2.1). Todavia, as possibilidades de formar proteínas diferentes constituídas por esse número reduzido de monômeros são espantosamente grandes. Utilizando-se apenas um aminoácido de cada tipo, podem ser obtidas  $2,4 \times 10^{10}$  moléculas diferentes. Como as proteínas são compostas por centenas de aminoácidos e cada um deles podendo estar presentes mais de uma vez, a probabilidade de construção de moléculas diferentes é, naturalmente, muito maior.

**Tabela 2.1** - Abreviações dos aminoácidos

<b>Aminoácido</b>	<b>Abreviação de três letras</b>	<b>Abreviação de uma letra</b>
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Aspargina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutâmico	Glu	E
Cisteína	Cys	C
Glicina	Gly	G
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L

Aminoácido	Abreviação de três letras	Abreviação de uma letra
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Felilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Valina	Val	V

Todos os vinte aminoácidos encontrados em proteínas têm em comum um grupo carboxila e um grupo amina, ligados ao mesmo átomo de carbono $_{\alpha}$  (Figura 2.1), ao qual também se liga um átomo de hidrogênio e um grupo variável chamado cadeia lateral ou grupo R:



**Figura 2.1** - Estrutura geral dos aminoácidos

As propriedades das cadeias laterais dos aminoácidos, as quais variam em

estrutura, tamanho, carga elétrica e solubilidade em água, são importantes para a conformação das proteínas e, portanto, para a sua função.

Nas moléculas de proteínas, os resíduos sucessivos de aminoácidos estão unidos entre si por ligações covalentes denominadas ligações peptídicas formando cadeias longas não ramificadas chamadas de polipeptídeos. Essas cadeias podem ter de 100 a várias centenas de unidades de aminoácidos ou resíduos. Entretanto, as proteínas não são meros polímeros casuais de vários comprimentos. Todas as moléculas de uma dada espécie de proteína são idênticas em composição, seqüência e comprimento de sua cadeia polipeptídica.

Algumas proteínas possuem apenas uma cadeia polipeptídica. Por exemplo, a ribonuclease (que é a enzima que catalisa a hidrólise do ácido ribonucléico), tem uma cadeia polipeptídica simples, enquanto a hemoglobina (que é o pigmento transportador do oxigênio dos glóbulos vermelhos), tem quatro cadeias polipeptídicas.

### 2.1.3 A Conformação das Proteínas

Cada tipo de molécula protéica tem, em seu estado nativo, uma configuração tridimensional peculiar, designada conformação. Dependendo de sua conformação, as proteínas podem ser classificadas, como segue:

As **proteínas fibrosas** são materiais insolúveis em água e soluções salinas diluídas e fisicamente resistentes. São constituídas de cadeias polipeptídicas dispostas paralelamente ao longo de um único eixo, formando longas fibras ou

lâminas. As proteínas fibrosas são os elementos estruturais básicos do tecido conjuntivo dos animais superiores. São exemplos: o colágeno dos tendões e da matriz óssea, a  $\alpha$ -queratina dos cabelos, chifres, pele, unha e pernas, e a elastina do tecido conjuntivo elástico.

As **proteínas globulares** são solúveis em sistemas aquosos e se difundem rapidamente. Suas cadeias polipeptídicas são firmemente arranjadas em forma esférica ou globular compacta. A proteína globular usualmente tem uma função móvel e dinâmica. Quase todas as enzimas, por exemplo, são proteínas globulares, como são as proteínas plasmáticas com função transportadora, como a soroalbumina e a hemoglobina.

#### 2.1.4 Estruturas das Proteínas

Os termos específicos comumente usados para indicar os diferentes aspectos ou níveis da estrutura protéica serão definidos a seguir:

- **Estrutura primária:** refere-se ao esqueleto covalente da cadeia polipeptídica e à seqüência de seus resíduos de aminoácidos;
  
- **Estrutura secundária:** refere-se ao arranjo regular, repetitivo no espaço da cadeia polipeptídica ao longo de uma dimensão. A estrutura secundária é particularmente evidente nas proteínas fibrosas, em que as cadeias polipeptídicas apresentam uma conformação estendida ou espiralada longitudinal; ela ocorre também em segmento das cadeias polipeptídicas nas proteínas globulares.

- **Estrutura terciária:** refere-se à maneira pela qual a cadeia polipeptídica encurva-se ou dobra-se em três dimensões, formando a estrutura compacta firmemente enovelada das proteínas globulares.
  
- **Estrutura quaternária:** indica a maneira pela qual as cadeias polipeptídicas individuais de uma proteína que possua duas ou mais cadeias dispostas em relação umas às outras. A maioria das grandes proteínas é formada por duas ou mais cadeias polipeptídicas, geralmente sem ligações entre elas. O termo conformação, mais geral, é usado para a combinação das estruturas secundária e terciária das proteínas.

### 2.1.5 Desnaturação

Todas as moléculas de uma mesma proteína apresentam, em condições fisiológicas, a mesma conformação que é denominada *nativa*. Esta é a conformação mais estável que a molécula pode assumir naquelas condições e reflete um equilíbrio delicado entre as interações ocorridas no interior da molécula protéica e entre esta e seu meio ambiente.

Ao se proceder ao isolamento e purificação de uma proteína, são introduzidas alterações físicas e químicas no seu meio ambiente, que podem afetar sua estrutura espacial a ponto de ocasionar a perda de sua função biológica. A proteína é dita, então, *desnaturada*. A desnaturação pode ser provocada por vários tipos de tratamentos. O aquecimento da proteína nativa provoca rompimento de ligações não-covalentes. Valores de pH muito baixo ou muito alto, afetando a ionização dos grupamentos da proteína conferem à molécula uma elevada carga positiva (ou negativa), ocasionando repulsão intramolecular, com exposição do

interior hidrofóbico. A adição de solventes orgânicos polares (álcoois, por exemplo) ou de compostos com grande capacidade de formar pontes de hidrogênio (uréia, por exemplo) determina a desnaturação da proteína, porque estes últimos agentes estabelecem pontes de hidrogênio com radicais da proteína, substituindo ligações que mantinham a estrutura nativa.

Os solventes orgânicos diminuem a solvatação dos radicais polares situados na superfície da proteína. A desnaturação também pode ser ocasionada por detergentes. Uma molécula típica de detergente é composta por uma cadeia longa apolar ligada a um grupo terminal carregado eletricamente. Estes agentes são desnaturantes porque a introdução de sua cauda hidrofóbica (apolar) no interior da proteína rompe interações hidrofóbicas.

Retiradas das condições desnaturantes, muitas proteínas podem reassumir sua conformação nativa. A este processo se chama renaturação. A renaturação demonstra que a estrutura tridimensional (nativa) de uma proteína é uma consequência de sua estrutura primária. Para a maioria das proteínas, entretanto, a desnaturação é irreversível. Muitas delas, quando desnaturadas tornam-se insolúveis. É o caso da albumina do ovo, quando aquecida, e da caseína, quando o leite é acidificado, por exemplo, através da ação bacteriana.

### **2.1.6 Enzimas**

Grande parte da história da bioquímica é a história da pesquisa sobre enzimas. A atividade das enzimas foi reconhecida primeiramente em estudos antigos da digestão no estômago no período de 1780 a 1825. Mais tarde, Louis Pasteur deduziu que a fermentação do açúcar a álcool pela levedura é catalisada

por "fermentos" ou enzimas. Em 1860 ele postulou que elas são inexplicavelmente ligadas à estrutura e à vida das células da levedura. Portanto, foi um grande momento na história da pesquisa enzimática quando, em 1897, E. Büchner conseguiu extrair das células de levedura as enzimas que catalisam a fermentação alcoólica.

Essa realização demonstrou que as enzimas importantes que catalisam uma das principais vias metabólicas produtoras de energia, podem funcionar independentemente da estrutura celular.

A primeira enzima isolada em forma pura, cristalina, foi a urease, isolada de extratos de feijão por J. B. Summer em 1926. Summer descobriu que os cristais consistiam de proteínas, e ele sugeriu, contrariamente às opiniões prevalecentes, que todas as enzimas são proteínas. Entretanto, sua opinião não foi aceita imediatamente, e foi só na década de 1930, quando J. Northrop isolou as enzimas digestivas pepsina, tripsina, e quimotripsina em forma cristalina, que a natureza protéica das enzimas foi estabelecida firmemente.

Hoje, mais de 1500 enzimas são conhecidas. Muitas foram isoladas em forma cristalina pura.

### **2.1.7 Propriedades Gerais das Enzimas**

As enzimas catalisam reações químicas que, de outra maneira, ocorreriam apenas em velocidades extremamente baixas. Elas não mudam o ponto de equilíbrio das reações que catalisam. Elas são verdadeiros catalisadores, porque

não são consumidas ou alteradas permanentemente durante a reação. Desde que todas as enzimas conhecidas são proteínas, qualquer fator que pode prejudicar a estrutura nativa das proteínas também causa uma perda da atividade catalítica. Portanto, o aquecimento das enzimas, tratamento com ácidos ou bases fortes, ou a exposição a agentes desnaturantes, destrói a sua atividade catalítica.

As enzimas têm pesos moleculares que variam de 12.000 a mais de 1 milhão. Algumas enzimas consistem apenas de uma ou mais cadeias polipeptídicas, mas outras contêm também algum outro componente químico necessário para a atividade, chamado de cofator. O cofator pode ser um metal, tal como Mg, Mn, Zn ou Fe, ou uma molécula orgânica complexa, usualmente chamada de coenzima. Alguma enzima requer tanto um íon metálico como uma coenzima. Muitas vezes o cofator é ligado firmemente à parte protéica da enzima. Neste caso, o cofator é usualmente chamado de grupo protéico. Geralmente os cofatores são estáveis quando expostos ao calor, enquanto que a parte protéica da enzima é lábil nas mesmas condições.

### **2.1.8 Classificação e Nomenclatura**

As enzimas são classificadas em seis grupos de acordo com o tipo de reação que catalisam (tabela 2.2). Cada uma destas classes é ainda subdividida, de modo a identificar sem ambigüidade cada enzima. Esta nomenclatura oficial é, na prática, muitas vezes desobedecida em favor de nomes mais simples ou que se tornam clássicos. Assim, por exemplo, a enzima que catalisa a remoção de elétrons do etanol (portanto, uma óxido-redutase) é comumente referida como álcool desidrogenase, a enzima que transfere um grupo fosfato do ATP para a glicose (uma transferase) é chamada glicoquinase. Mesmo nestes casos, os nomes são

dados de forma a indicar o substrato e o tipo de reação, sempre com o sufixo ase. Ainda esta forma de identificação apresenta exceções, como é o caso das enzimas digestivas: pepsina, tripsina, etc. Mas com um pouco de prática, é possível prever o nome da enzima conhecendo-se a reação que ela catalisa, ou vice-versa.

**Tabela 2.2** - Reações catalisadas por diferentes classes de enzimas

<b>Classe</b>	<b>Tipo de reação</b>
Óxido-redutases	óxido-redução
Transferase	Transferência de grupos ( $A-X+B=A+B-X$ )
Hidrolases	Hidrólise
Liasas	adição de grupos a duplas ligações ou remoção de grupos, deixando dupla ligação
Isomerasas	Isomerização
Ligases	Condensação de duas moléculas, associada à hidrólise de uma ligação de alta energia

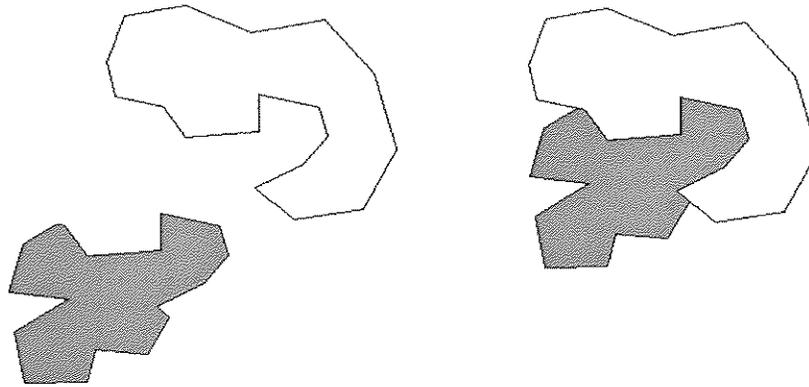
### 2.1.9 Especificidade Enzimática

Geralmente há uma grande diferença de tamanho entre as moléculas de enzimas e as de seus substratos (em uma reação enzimática, os reagentes são chamados de substratos). As enzimas são macromoléculas protéicas - mesmo as mais simples são formadas de mais de uma centena de aminoácidos - e seus pesos moleculares variam de 10.000 a alguns milhões, enquanto o peso molecular dos substratos é muitas ordens de grandeza inferior, como se pode observar na tabela 2.3.

**Tabela 2.3** - Pesos moleculares aproximados de enzimas e de seus substratos

<b>Enzima</b>	<b>Substrato</b>	<b>Peso molecular aproximado</b>
Catalase		200.000
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	34
Urease		500.000
	Uréia	60
Fosfofrutoquinase		380.000
	Frutose 6-fosfato	300
Glutamina sintetase		600.000
	Glutamato	150

Embora toda a molécula enzimática seja necessária para a reação catalítica, a ligação com o substrato se dá apenas em uma porção pequena e bem definida da enzima. Esta região à qual o substrato se liga é chamada *centro ativo* da enzima. O centro ativo é formado por alguns dos resíduos de aminoácidos presentes na cadeia polipeptídica, trazidos à proximidade uns dos outros pelos dobramentos que constituem a estrutura terciária da proteína. O centro ativo, assim organizado, constitui uma cavidade com forma definida aberta sobre a superfície da molécula globular e permite a enzima "reconhecer" seu substrato. De fato, uma molécula, para ser aceita como substrato, deve ter grupos químicos capazes de estabelecer ligações precisas com os radicais do centro ativo e a forma espacial adequada para se alojar no centro ativo (figura 2.2). Na verdade, a aproximação e a ligação do substrato induz, na enzima, um ajuste conformacional que a torna ideal para a catálise.



**Figura 2.2** - O centro ativo da enzima tem estrutura espacial específica: a ligação com o substrato ajusta a conformação enzimática, tornando-a ideal para a catálise.

Como cada enzima possui uma organização estrutural específica, o seu centro ativo permite a ligação apenas do seu substrato, trazendo grande especificidade para a catálise enzimática. Esta especificidade, cujo grau varia entre as enzimas, é sempre maior do que a apresentada pelos catalisadores inorgânicos. Os íons  $H^+$ , por exemplo, atuam como catalisadores de um grande número de reações, incluindo a hidrólise de proteínas, polissacarídeos e ésteres. As *enzimas proteolíticas*, ao contrário, são específicas para a hidrólise de proteínas, não atuando sobre carboidratos ou lipídios, para cujas hidrólises são requeridas enzimas próprias.

Entre as enzimas proteolíticas aparecem diferentes graus de especificidade: a *pepsina* hidrolisa ligações peptídicas das quais participam grupos carboxílicos aromáticos (triptofano, fenilalanina e tirosina) e a *tripsina* reconhece apenas ligações peptídicas formadas por arginina ou lisina. Graus extremos de especificidade podem ser encontrados entre as L-aminoxidases, por exemplo. São enzimas capazes de reconhecer isômeros na configuração L, sendo inativas para aminoácidos na forma D.

### 2.1.10 Eficiência Catalítica

A estrutura e a forma do centro ativo são uma decorrência da estrutura tridimensional da enzima e podem ser afetadas por quaisquer agentes capazes de provocar mudanças conformacionais na estrutura protéica. Isto torna a atividade enzimática catalítica dependente do meio ambiente, notadamente do pH e temperatura.

A maioria das enzimas apresenta um valor de pH, para o qual sua atividade é máxima; a velocidade da reação diminui à medida que o pH se afasta desse valor ótimo, que é característico para cada enzima, alguns desses valores são observados na Tabela 2.4.

A influência do pH sobre a catálise enzimática pode ser mais bem compreendida lembrando que as enzimas apresentam grupos tituláveis nos resíduos de histidina, arginina, lisina, glutamato, aspartato, cisteína e tirosina. Alguns destes grupos podem fazer parte do centro ativo ou serem importantes na manutenção da estrutura espacial da molécula. A cada valor de pH, alguns destes grupos apresentam-se protonados ou desprotonados.

Existe uma concentração hidrogeniônica que propicia um determinado arranjo de grupos protonados e desprotonados que leva a molécula de enzima à conformação ideal para exercer seu papel catalítico. Este *pH ótimo* depende, portanto, do número e tipo de grupos ionizáveis que uma enzima apresenta, ou seja, depende de sua estrutura primária. Por outro lado, quando o substrato contém grupos ionizáveis, as variações de pH também poderão afetar sua carga. A eficiência da catálise dependerá, então, de se encontrarem enzima e substrato com

conformação e carga adequadas para permitir sua interação.

Como ocorre com a maioria das reações químicas, a velocidade da reação enzimática, que, a 0°C, apresenta valores próximos de zero, é favorecida pela elevação da temperatura. O gradativo aumento da velocidade só se verifica enquanto a enzima conserva sua estrutura nativa. Acima de 50-55°C, a maioria das proteínas globulares - enzimas inclusive - são desnaturadas. A desnaturação provoca drásticas alterações conformacionais na molécula, acarretando a perda da capacidade catalítica.

**Tabela 2.4** - pH ótimo de enzimas

<b>Enzima</b>	<b>pH ótimo</b>
Pepsina	1.5
Fosfatase ácida	4.5
Urease	6.5
Tripsina	7.8
Arginase	9.7

### 2.1.11 Tripsina

Tripsina é uma *serina proteinase*, pertencente a uma classe de enzimas que apresentam o resíduo de aminoácido "*Ser*" em seu sítio ativo. Ela se forma no intestino a partir do tripsinogênio originado nas células pancreáticas. O tripsinogênio é um precursor inativo sintetizado no pâncreas, cuja ativação é feita pela clivagem de uma ligação peptídica no intestino delgado, formando assim a

tripsina uma enzima ativa.

A própria tripsina possui efeito ativante, com isso, a ativação também ocorre autocataliticamente. Durante a ativação se libera um hexapeptídeo de composição Val-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys. A tripsina está envolvida, cataliticamente, na hidrólise de ligações peptídicas, mas apenas aquelas em que o grupo carboxila é doado por um resíduo de lisina ou de arginina, independentemente do comprimento da seqüência de aminoácidos da cadeia.

A tripsina cristalizada tem um peso molecular de 23.000 e sua atuação ótima ocorre em pH 7.8, ou seja, em meio fracamente alcalino; é constituída por 223 aminoácidos. Como se disse, atua sobre as ligações entre lisina e arginina da cadeia peptídica.

Há mais de 5 décadas utiliza-se tripsina em grande escala na indústria, o que tem gerado uma enorme gama de artigos e estudos de aplicação nos mais diferenciados graus de pureza. Destacando algumas aplicações das mais citadas, é utilizada em antiinflamatórios medicinais, como clarificadora de cerveja, em "pool" enzimático para detergentes, no tratamento de lã e como auxiliar no desenvolvimento de membranas e biosensores (Bailey e Ollis, 1986).

## **2.2 Separação e Purificação de Proteínas**

Desde que as diferentes proteínas diferem em conteúdo e seqüência de aminoácidos, elas contêm razões diferentes de aminoácidos com grupos R ácidos e básicos. Portanto, as proteínas diferem nas suas curvas de titulação ácido-base e

nos seus pontos isoelétricos (pI), o pH ao qual elas não se movem num campo elétrico (tabela 2.5). E também elas diferem umas das outras através de propriedades características, tais como: solubilidade, peso molecular, carga elétrica e afinidade por determinados compostos. O método de purificação a ser escolhido dependerá da proteína em particular que se pretende isolar e, usualmente, empregam-se combinações seqüenciais de diferentes métodos.

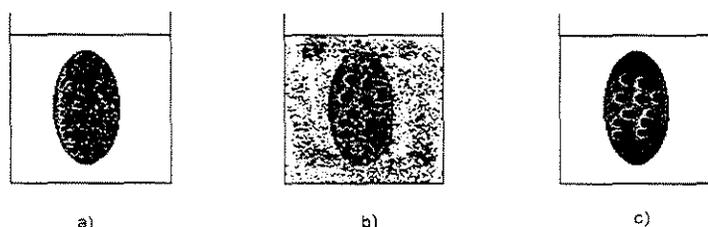
**Tabela 2.5** - Ponto isoelétrico de algumas proteínas

<b>Proteína</b>	<b>pH isoelétrico</b>
Pepsina	<1,0
Albumina de ovo	4,6
Soroalbumina	4,9
Urease	5,0
$\beta$ -lactoglobulina	5,2
$\gamma$ -globulina	6,6
Hemoglobina	6,8
Mioglobina	7,0
Quimotripsinogênio	9,5
Citocromo	10,65
Lisozima	11,0

### 2.2.1 Diálise

Por serem macromoléculas, as proteínas podem ser separadas de substâncias

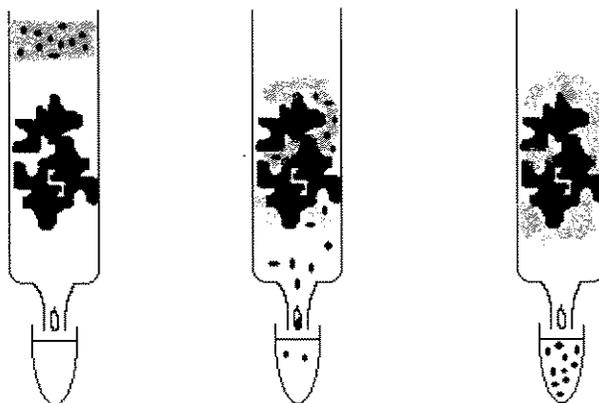
de baixo peso molecular por *diálise*. Neste processo, a mistura de proteína e moléculas pequenas é colocada dentro de um saco de material com poros ultramicroscópicos, como o celofane. Quando o saco de diálise é imerso em água, as moléculas protéicas ficam retidas, enquanto as moléculas pequenas ou íons atravessam a membrana de diálise (figura 2.3).



**Figura 2.3 - Diálise**

### 2.2.2 Filtração em Gel

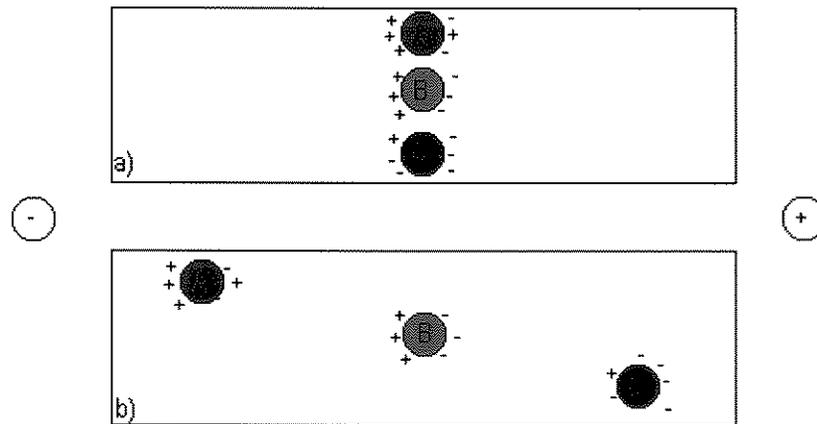
A separação das proteínas de uma mistura pode ser efetuada por métodos baseados na diferença de tamanho entre as moléculas, já que o peso molecular das proteínas varia de alguns milhares (13.000 para citocromos c) a vários milhões (2.800.000 para hemocianina). A mais usada destas técnicas é a filtração em gel. A mistura de proteínas é passada através de uma coluna formada por um gel constituído por esferas contendo poros de tamanho definido. As moléculas menores do que o diâmetro dos poros podem penetrar nas esferas, ao passo que as maiores não. Deste modo, as moléculas menores percorrem, ao longo da coluna, um trajeto muito maior do que as moléculas maiores, que sairão da coluna em primeiro lugar (figura 2.4). Este método também permite a separação entre proteínas e moléculas ou íons pequenos (como na diálise).



**Figura 2.4** - Filtração em gel

### 2.2.3 Eletroforese

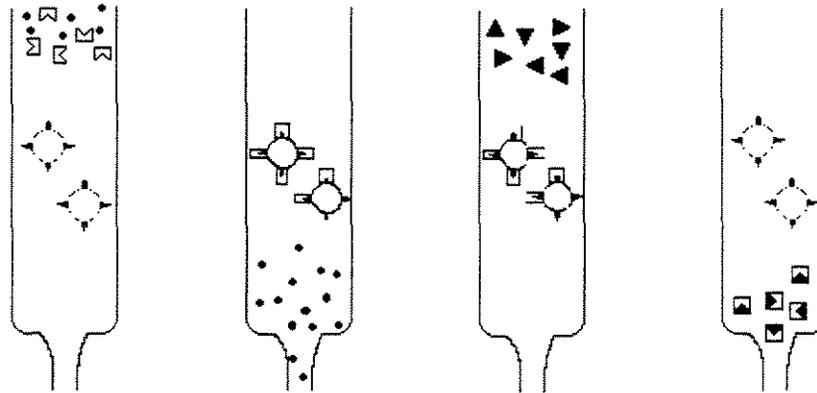
Em um mesmo pH, proteínas diferentes apresentarão cargas líquidas diferentes, o que determinará velocidades de migração diferentes se as proteínas forem submetidas a um campo elétrico. Este é o princípio da *eletroforese*. A mistura de proteínas é aplicada sobre um suporte inerte, constituído por papel ou poliacrilamida. Depois de submetidas por algum tempo a uma diferença de potencial adequado, a posição das diferentes proteínas é revelada por coloração específica para proteínas (figura 2.5).



**Figura 2.5** - Eletroforese

## 2.2.4 Cromatografia de Afinidade

Proteínas que apresentem afinidade específica por algum composto podem ser purificadas por *cromatografia de afinidade*. O princípio do método consiste em ligar o composto pelo qual a proteína tem afinidade (ligante) a uma matriz insolúvel e, com este material, preparar uma coluna. A mistura de proteínas é passada pela coluna: a proteína de interesse fica adsorvida à coluna, graças à interação não-covalente com o ligante, e as outras proteínas passam livremente. A proteína adsorvida pode ser diluída, por adição de solução concentrada do ligante (figura 2.6). Se a proteína for uma enzima, o ligante pode ser o substrato, o produto ou um inibidor competitivo. No caso de purificação de anticorpos, o ligante utilizado é o antígeno.



**Figura 2.6** - Cromatografia de afinidade

### 2.2.5 Extração Líquido-Líquido

Uma situação muito comum na Engenharia Química é a separação dos constituintes de uma mistura líquida homogênea composta de dois ou mais componentes. Para realizar esta separação existem vários métodos cuja aplicação é limitada pelas características físicas e químicas dos componentes da mistura a ser separada, pelos custos dos processos de separação e pelas condições disponíveis para a implantação do processo escolhido.

A extração líquido-líquido, um dos principais métodos de separação adotados industrialmente, é um processo que envolve a transferência de massa entre dois líquidos imiscíveis ou parcialmente miscíveis. Na extração líquido-líquido, a separação de um componente de uma solução líquida homogênea ocorre pela adição de um constituinte líquido, insolúvel ou parcialmente solúvel. O soluto difunde-se no solvente com uma velocidade característica até atingir as concentrações de equilíbrio em cada uma das fases formadas. Este processo de separação é baseado na distribuição do soluto entre duas fases e na miscibilidade

parcial dos líquidos.

O conhecimento das relações de equilíbrio de fases é fundamental para as análises quantitativas para o processo de extração. As relações de equilíbrio de fases são baseadas em princípios termodinâmicos e representadas por diagramas estabelecidos por leis de distribuição dos constituintes entre as fases. Na extração líquido-líquido, o efeito de pequenas variações de pressão sobre o equilíbrio é insignificante, restringindo a atenção à influência da temperatura e da concentração (Coimbra, 1995).

Geralmente, a extração líquido-líquido é empregada nos casos em que os componentes sejam sensíveis à temperatura requerida para a separação, quando o componente desejado seja pouco volátil e esteja presente em pequena quantidade na solução ou quando a separação por outros métodos tenha alto custo, entre outros casos.

Quanto à viabilidade econômica dos processos que empregam a extração líquido-líquido, esta é fortemente influenciada pelos custos do equipamento e pelos custos de recuperação e reposição do solvente. O custo de operação de um extrator líquido-líquido (consumo de energia mais manutenção) é geralmente negligenciável comparado aos outros fatores (Hanson, 1968 a e b).

Embora aplicada com sucesso há muito tempo, como uma técnica de separação laboratorial, sua utilização a nível industrial iniciou-se nas primeiras décadas do século XX, quando se procurava um método que resolvesse o problema da remoção de hidrocarbonetos aromáticos do querosene. Principalmente depois da Segunda Guerra Mundial, teve grande desenvolvimento na indústria, alcançando

os mais diversos setores. Atualmente, é empregada com sucesso, em larga escala, em vários setores industriais tais como, extração de metais, extração de compostos orgânicos, como ácidos e álcool, purificação de antibióticos, indústria farmacêutica e para tratamentos de efluentes industriais, entre outros. Sua maior aplicação concentra-se na indústria petroquímica. Mais recentemente, a extração líquido-líquido vem sendo estudada e aplicada na área de Biotecnologia para a purificação e extração de biomateriais, como enzimas e proteínas.

Alguns fatores que estimulam o emprego da extração líquido-líquido são (Humphrey, 1984):

- Perspectivas de economia em comparação a outros processos de separação.
- Possibilidade de evitar a degradação de compostos, devido ao efeito da temperatura, que pode ser causada por processos de separação que fazem uso da energia térmica.
- Desenvolvimento de equipamentos de extração bastante eficientes e que promovem um contato entre as fases mais efetivo.
- Melhor entendimento dos princípios para o desenvolvimento, projeto e aumento de escala do processo de extração.

A extração líquido-líquido pode ser realizada de diversas formas por meio de vários tipos de equipamentos, mas sempre seguindo os mesmos princípios básicos de contato entre os líquidos, transferência de massa, equilíbrio de fases e separação

de fases. Esta separação de fases comumente ocorre pelo processo de decantação (Rabelo, 1995).

### 2.2.6 Conceitos Básicos

Em um processo de extração líquido-líquido, são usadas as seguintes denominações:

**SOLUTO** - é o constituinte a ser extraído e que se encontra dissolvido no diluente;

**ALIMENTAÇÃO** - é a solução constituída pela mistura do soluto e diluente, a qual se deseja separar;

**SOLVENTE** - É o líquido destinado a extrair os solutos da solução de alimentação;

**DILUENTE** ou **INERTE** - é o líquido no qual se encontram dissolvidos os solutos, é um dos componentes de alimentação;

**EXTRATO** - é a fase líquida rica em solvente, que contém o soluto extraído dissolvido. É uma corrente de saída da coluna;

**REFINADO** - é a fase líquida que retém essencialmente o diluente ou inerte. É também uma corrente de saída da coluna.

Os solventes utilizados devem ser compostos que tenham densidades diferentes da densidade de alimentação. Por esse motivo, as expressões "fase leve" e "fase pesada" são usadas para nomear as correntes que fluem na coluna. A fase de menor densidade é chamada de "fase leve" e a fase de maior densidade é chamada "fase pesada".

Durante um processo de extração vários padrões de comportamento acontecem no interior do extrator, sendo que alguns desses fenômenos prejudicam o processo de transferência de massa. Os fenômenos mais conhecidos são definidos a seguir:

**"Hold-up"** - é a fração de retenção da fase dispersa, que é a razão do volume da fase dispersa que fica retida no interior do equipamento pelo volume total do equipamento.

**Inundação** - ocorre quando as condições de operação na coluna impedem o escoamento contracorrente das fases e a dispersão de uma fase na outra. Nessa situação, as correntes entram e saem da coluna em uma mesma extremidade. Assim, não há contato entre as fases e a transferência de massa não é possível.

**"Backmixing" (ou 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 da massa e a eficiência de separação. A alta velocidade da fase contínua pode fazer com que esta carregue as gotas da fase dispersa em sentido oposto ao do escoamento dessa fase. Pode ocorrer também devido à presença de gotas muito pequenas ou turbulência excessiva.

**"Backflow"** - é o retorno axial da fase contínua. Ocorre quando a fase contínua é carregada em direção oposta à esperada (Hanson, 1968 b).

**Coalescência** - é um fator importante em processos de extração líquido-líquido. A coalescência é necessária para a separação das fases, mas em determinadas condições, é prejudicial à extração, por aumentar o tamanho das gotas.

A coalescência se opõe à geração de gotas no interior da coluna e consiste na recombinação de gotas, originando gotas maiores ou "porções" da fase dispersa nos estágios da coluna. Este comportamento está relacionado com a quantidade de gotas presente na mistura entre as fases e com a frequência de colisão das gotas. Segundo Hanson (1968 a), a coalescência das gotas da fase dispersa em uma fase contínua é fundamental para ocorrer à separação das fases. Em geral, quanto menor o tamanho das gotas, mais lento é a coalescência e maior será a tendência da solução emulsificar. Por outro lado, se a agitação imposta às fases é pouco intensa, a coalescência também poderá ocorrer, desde que não haja o fornecimento de energia suficiente para promover a fragmentação do líquido em gotas (Góis, 1995).

### **2.2.7 Equipamentos Usados nos Processos de Extração**

A escolha de um extrator é função da natureza dos produtos e das características físicas e químicas do sistema em estudo, além de ser função do desempenho do equipamento, considerando-se as condições de extração.

Para o desenvolvimento de equipamentos de extração líquido-líquido, deve-

se avaliar, além do sistema de trabalho, os dados de equilíbrio e de transferência de massa nas temperaturas de interesse.

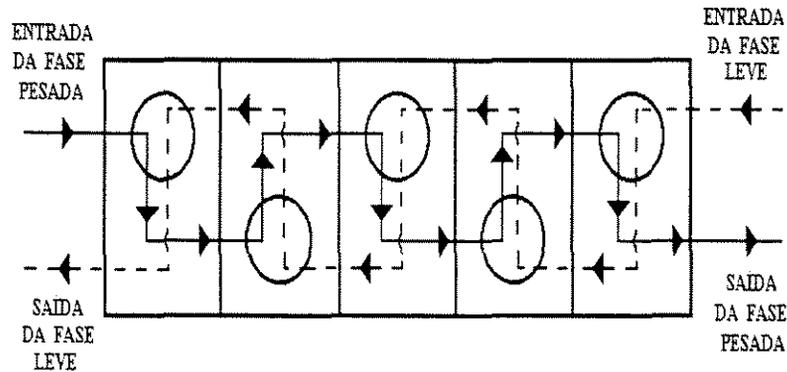
A utilização de extratores verticais nos processos de extração líquido-líquido é justificada pelo fato desses equipamentos ocuparem pequena área, terem boa eficiência de separação e apresentarem facilidades de operação e manutenção. Além disso, nesses equipamentos, o processo de transferência de massa e separação das fases é mais rápido e o sistema pode atingir o equilíbrio ou aproximar-se dele em um período de tempo menor do que em outros tipos de equipamentos.

Existe um grande número de equipamentos desenvolvidos para a aplicação da extração líquido-líquido, que podem ser classificados de acordo com os princípios gerais de operação e construção. Vários autores, entre eles Hanson (1971), dividiram os extratores em duas categorias, de acordo com o tipo de contato entre as fases:

### **1) Sistemas de contato e separação de fases em estágios**

No caso de operação em estágios, o fluxo difusional de matéria entre as fases ocorre de maneira a reduzir a diferença de concentração que causa este fluxo. Se prosseguir por um tempo suficiente, um equilíbrio é estabelecido, depois do qual nenhum fluxo difusional ocorre. A taxa de difusão e o tempo determinam a eficiência do estágio que pode ser alcançada. Nesta categoria, enquadram-se os misturadores-decantadores. Estes sistemas são formados por uma série de 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 faz-se a separação das fases antes delas passarem ao próximo estágio. Um esquema destes sistemas é mostrado na figura 2.7.



**Figura 2.7** - Esquema de um sistema de contato e separação em estágios (misturadores-decantadores).

Nestes equipamentos, obtêm-se altas eficiências de separação em cada estágio. A grande desvantagem destes equipamentos é o grande espaço físico requerido para sua instalação, principalmente nos casos em que o tempo para atingir o equilíbrio ou a decantação da fase densa é muito grande.

## 2) Sistemas de contato diferencial (contínuo)

Nos sistemas diferenciais, os líquidos escoam continuamente e, geralmente, em contracorrente, sendo que os equipamentos são normalmente colunas verticais. O escoamento em contracorrente ocorre em função da diferença de densidade entre os líquidos em contato na coluna. 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

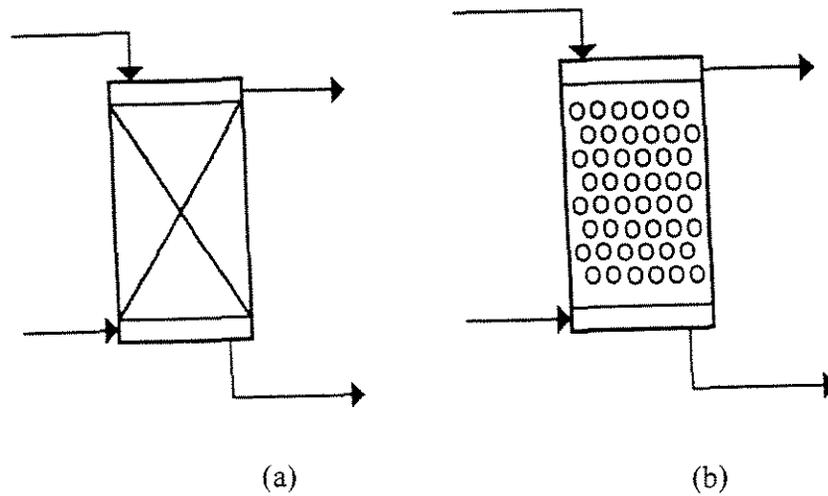
misturadores-decantadores.

Esta categoria ainda pode ser subdividida em outras classes, de acordo com a maneira de promover as misturas das fases. A seguir, são mostradas essas classes e alguns exemplos de equipamentos de cada uma delas.

#### **A.1 -Colunas sem agitação mecânica e separação pela gravidade**

- Extratores de múltiplos estágios, como por exemplo, as colunas de pratos perfurados.
  
- Colunas "Spray"
  
- Colunas Recheadas

Na figura 2.8 são mostrados os esquemas de colunas recheadas e "spray" respectivamente.



**Figura 2.8** - Esquema de colunas recheadas (a) e "spray" (b)

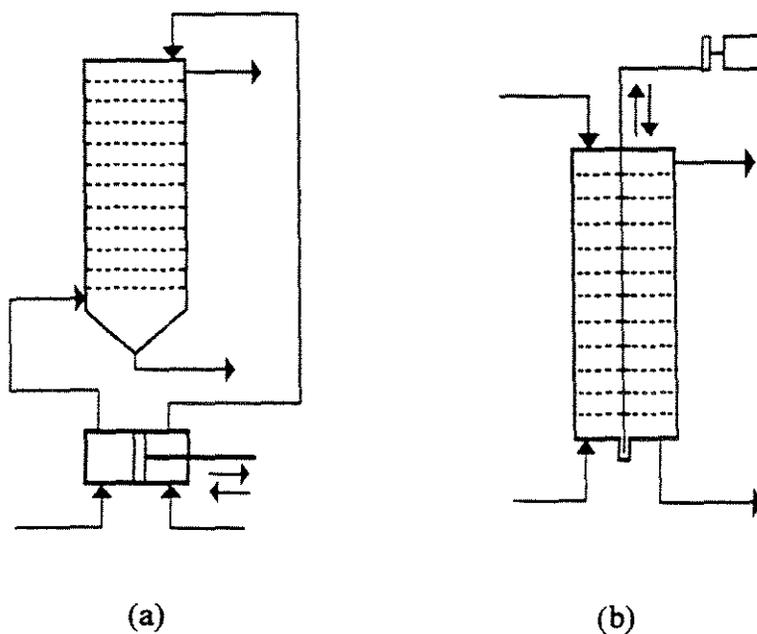
Nestes equipamentos, a forma de promover o contato entre as fases e, portanto a transferência de massa, é a ação da força gravitacional, devido à diferença de densidades entre as duas fases. São os mais simples extratores diferenciais usados na extração líquido-líquido. Eles apresentam baixo custo de instalação e manutenção e ocupam reduzidos espaços físicos. A principal desvantagem é a baixa eficiência de separação obtida, já que muitas vezes não se consegue uma boa mistura entre as fases. Há a possibilidade de formação de caminhos preferenciais e zonas de estagnação.

#### **A-2- Colunas com agitação mecânica e separação gravitacional**

- Coluna de fluxo pulsado
  
- Coluna de pratos pulsados
  
- RDC (Coluna de Discos Rotativos)

Nestes equipamentos, além da força da gravidade, tem-se a ação da agitação promovida mecanicamente, que pode ser transferida ao sistema por meio de pulsações ou sistemas rotativos. Por exemplo, nas colunas pulsadas, além da força da gravidade, existe a ação da agitação causada pelas pulsações, agindo conjuntamente como força-motriz para a transferência de massa na coluna. Nestes equipamentos, a eficiência de separação cresce bastante em relação aos equipamentos da classe anterior. A principal desvantagem é o maior consumo de energia, necessário para produzir as pulsações.

Na figura 2.9 são mostrados esquemas de colunas pulsadas.



**Figura 2.9** - Esquema de colunas de fluxo pulsado (a) e de pratos pulsados (b).

### **A.3-Contatores Centrifugos**

- Extrator Podbielniak
  
- Extrator Luwesta
  
- Extrator de Laval

Estes equipamentos utilizam a força centrífuga como força-motriz para a transferência de massa. Eles são de desenvolvimento mais recente, possuem alta eficiência de separação e ocupam reduzido espaço físico. A desvantagem é o seu alto custo de implantação.

### **2.2.8 Colunas Pulsadas**

As colunas agitadas por pulsações, 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 deve favorecer um contato mais intenso entre as fases, sem prejudicar o escoamento de ambas as fases.

O primeiro trabalho apresentado sobre colunas agitadas por pulsações 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 obter-se o máximo contato entre duas corrente líquidas. O princípio de funcionamento desta coluna consta basicamente do seguinte: as correntes líquidas são introduzidas 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.

Van Dijck (1935) propôs também um outro tipo de coluna, em que os pratos são fixos e os fluidos pulsados por meio 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 radiativas 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.

Duarte et al (1992) apresentaram um estudo da hidrodinâmica e transferência

de massa em uma coluna pulsada de discos e coroas. O sistema líquido ternário usado foi água-ácido málico-álcool amílico, sendo que a transferência de massa se realizou da fase contínua (água) para a fase dispersa (álcool amílico). A intensidade de pulsação, definida pelo produto da amplitude e frequência, variou de 0,6 a 1,8 cm/s. Verifica-se que há um aumento de eficiência com o aumento da velocidade de pulsação até um máximo, a partir do qual esta começa a diminuir. Eficiências superiores a 90% foram encontradas (esta eficiência é baseada na comparação com o equilíbrio - Eficiência de Murphree). Os dados de equilíbrio para este sistema foram determinados experimentalmente.

Khemangkorn et al (1978) analisaram a influência da direção de transferência de massa e de vários parâmetros no desempenho e na eficiência de uma coluna de fluxo pulsado. Observou-se que a direção de transferência de massa exerce pouca influência sobre a altura de uma unidade de transferência.

### **2.2.9 Transferência de Massa em um Processo de Extração Líquido-Líquido**

É de fundamental importância no estudo da extração líquido-líquido ou de um extrator em particular, a avaliação da transferência de massa nesse equipamento. O estudo da transferência de massa visa principalmente avaliar o quanto o sistema se aproxima do equilíbrio, possibilitando assim definir um limite ideal de operação para o extrator. Sabe-se que na extração líquido-líquido, o processo de transferência de massa é governado, principalmente pela difusão (Lo et al, 1982).

Analisando os trabalhos publicados, observou-se que os estudos de

transferência de massa relacionam-se, principalmente, à análise do diâmetro médio das gotas, número de estágios teóricos, altura equivalente a um estágio teórico, coeficientes de transferência de massa, número de unidades de transferência de massa e eficiência de extração.

Assim, neste item são apresentados os princípios básicos da transferência de massa em processos de extração líquido-líquido, como também, os meios de representar a eficiência nestes processos.

### **2.2.10 Princípios da Transferência de Massa**

Quando um sistema contém um ou mais componentes cujas concentrações variam de ponto a ponto no sistema, há uma tendência natural de 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 menor tempo. O transporte de um constituinte de uma região de maior concentração para outra de menor concentração é chamado "transferência de massa".

A transferência de massa ocorre tanto pelo mecanismo molecular quanto pelo mecanismo convectivo. Estes mecanismos têm se mostrado diretamente dependentes do gradiente de concentração das espécies difundindo-se em uma fase. Quando o equilíbrio é estabelecido, o gradiente de concentrações e, por sua vez, a taxa de difusão das espécies, tornam-se zero na fase. A transferência de massa entre duas fases requer um afastamento do equilíbrio.

O mecanismo de transferência de massa depende da dinâmica do sistema no qual ocorre. A massa pode ser transferida por movimento molecular randômico em fluidos sem movimento ou pode ser transferida entre um fluido em movimento e uma superfície ou entre dois fluidos relativamente imiscíveis, em movimento, sendo dependente das propriedades de transporte e das características dinâmicas do escoamento. O primeiro caso é característico de transferência de massa molecular e os dois outros casos são característicos da transferência de massa convectiva.

### 2.2.11 O Coeficiente de Transferência de Massa

Em processos de extração líquido-líquido, a transferência de soluto para o solvente ocorre através da interface. Supondo-se que nenhuma substância permaneça acumulada na interface, a velocidade de transferência de massa deve ser a mesma nos dois lados da interface, de forma a serem proporcionais às resistências existentes em cada fase (Coulson, 1974).

Vários mecanismos são sugeridos para representar as condições na região de fronteira entre as fases. O mais antigo é dado pela "Teoria dos Dois Filmes", proposta por Whitmann em 1923 (Whitman, 1923). Mais tarde, outros mecanismos foram propostos, como a "Teoria da Penetração" de Higbie (1935), a de Danckwerts (1951) e a "Teoria da Penetração em Filmes" de Toor e Marchells (1958).

Em um processo de extração líquido-líquido, a transferência através da interface do refinado ocorre devido à diferença de concentração ( $y_R - y_{Ri}$ ), sendo esta diferença de concentrações a força-motriz da transferência de massa na fase refinado. Na interface do extrato, a transferência de massa ocorre pela diferença de

concentração ( $y_{Ei}-y_E$ ), sendo esta diferença de concentrações, a força-motriz da transferência de massa na fase extrato. Neste caso, o fluxo do soluto,  $N_B$ , pode ser representado pela seguinte equação:

$$N_B = k_R \cdot (y_R - y_{Ri}) = k_E \cdot (y_{Ei} - y_E) \quad (2.1)$$

Onde:  $k_R$  e  $k_E$  são os coeficientes parciais ou individuais de transferência de massa relativos às fases refinado e extrato, respectivamente;  $y_R$  e  $y_E$  são as concentrações molares do soluto nas fases refinado e extrato respectivamente e  $y_{Ri}$  e  $y_{Ei}$  são as concentrações do soluto na interface, também relativas às fases refinado e extrato, respectivamente.

A taxa de transferência de massa global do soluto é determinada pela seguinte expressão:

$$N_B = K_R \cdot (y_R - y_R^*) = K_E \cdot (y_E^* - y_E) \quad (2.2)$$

Onde:  $N_B$  é a taxa de extração do soluto,  $K_R$  e  $K_E$  são os coeficientes globais de transferência que estimam as resistências das duas fases.

Em estudos de processos de extração líquido-líquido em contínuo com sistemas de duas fases aquosas, Pawar et al (1997), Jafarabad et al (1992 a e b) e Porto (1998) usaram o coeficiente de transferência de massa calculado de maneira a ser mostrada a seguir.

Em sistemas de duas fases aquosas, a resistência à transferência de massa existe em ambas as fases, na fase rica em PEG e na fase rica em sal, por exemplo. Contudo, a viscosidade da fase rica em PEG é pelo menos sete vezes maior do que a fase rica em sal. Portanto, de acordo com a estimativa da difusividade de proteínas representada pela correlação 2.3, a difusividade na fase rica em PEG é sete vezes maior do que a fase rica em sal. Pode-se, então, concluir que o coeficiente de transferência de massa da fase rica em PEG é pelo menos três vezes menor do que o da fase rica em sal sob condições hidrodinâmica similares (Pawar et al, 1997).

Segundo Geankoplis (1983), a difusividade de proteínas é estimada pela seguinte correlação:

$$D=9,4 \times 10^{-15} T / \mu_D M_p^{1/3} \quad (2.3)$$

Onde: D é a difusividade de proteínas em m<sup>2</sup>/s, T é a temperatura em K,  $\mu_D$  é a viscosidade da fase em Pa.s e  $M_p$  é a massa molecular de proteínas em kg/kmol.

Os coeficientes de transferência de massa global são dados pela seguinte equação, cujo desenvolvimento pode ser encontrado no trabalho de Treybal (1968):

$$1/K_d = 1/k_d + m/k_c \quad (2.4)$$

Nesta equação, m é o coeficiente de partição do soluto, a fase contínua, que é indicada pelo subíndice c, é a fase rica em sal e a fase dispersa, que é indicada pelo

subíndice d, é a fase rica em PEG.

A equação 2.4 representa a resistência total, onde se relaciona o coeficiente de transferência global com os parciais (Treybal, 1968).

Geralmente, o termo  $m/k_c$  é desprezível em sistemas de fases aquosas formados por PEG e sal, pois quanto maior a viscosidade da fase, maior é a resistência imposta à transferência de massa. Assim, neste caso, a maior parte da resistência à transferência de massa é oferecida pela fase rica em PEG. Como resultado, pode-se concluir que a resistência que controla a transferência de massa prevalece na fase dispersa. Sendo assim, o termo  $1/k_c$  é menor do que  $1/k_d$ , já que o coeficiente de transferência de massa é inversamente proporcional à resistência imposta à transferência de massa. Além disso,  $m$ , que é o coeficiente de partição, é menor do que 1. Por isso, o termo  $m/k_c$  pode ser desprezado. Portanto, neste caso, o coeficiente de transferência de massa da fase dispersa governa a transferência de massa global. O balanço de massa para enzimas e proteínas em uma altura diferencial,  $dH$ , da coluna é dado por:

$$QdC_p = k_d a \cdot (C_p - KC_s) \cdot dH \quad (2.5)$$

Onde:  $k_d a$  é o coeficiente de transferência de massa da fase dispersa ( $\text{min}^{-1}$ ).

Nos trabalhos citados, os valores de  $KC_s$  eram sempre menores que 2% do valor mínimo de  $C_p$  na coluna em qualquer tempo, durante o experimento. Portanto, o valor de  $KC_s$  pode ser assumido como constante com relação à altura e, então, a mistura na fase contínua não é importante para a estimativa do valor do coeficiente de transferência de massa nestas condições. O valor médio de  $C_s$ ,

denominado  $C_{fc}$ , foi estimado com base em um balanço material (total de enzima extraída dividida pelo volume da fase rica em sal - fase contínua). Foi assumido que a fase dispersa flui em escoamento pistão. Verificou-se que o número de Peclet da fase dispersa era sempre maior que 20, usando-se o procedimento de Laddha et al (1976), Wijffels e Rietema (1972) e Joshi (1982). Portanto, a mistura axial não é importante e a consideração de escoamento do pistão é válida. A integração da equação 2.5 acima e a substituição das condições de contorno ( $H=0$ ,  $C_{pi}=C_{ent}$  e  $H=H_D$ ,  $C_{p0}=C_{sai}$ ) fornece a seguinte equação (Pawar et al, 1997):

$$k_d a = (Q/V) \cdot \ln[(C_{ent} - KC_{fc}) / (C_{sai} - KC_{fc})] \quad (2.6)$$

Esta equação para o  $k_d a$  foi desenvolvida para processos de operação semicontínua (Jafarabad et al, 1992 a e b, Pawar et al, 1997). Contudo, ela vem sendo usada também para a avaliação de processos de operação contínua (Porto, 1998).

Assim, esta equação é usada para estimar o coeficiente de transferência de massa da fase dispersa no presente trabalho.

### 2.2.12 Eficiência de Extração

Dois aspectos distintos sobre eficiência de extração devem ser considerados: o primeiro, diferencia o comportamento real do ideal e o segundo trata a eficiência em termos de mecanismos de transporte de massa. Baseadas nestes aspectos, várias definições de eficiência têm sido propostas (Lo et al, 1982).

Das definições de eficiência encontradas na literatura, considerou-se as de Kawase (1990) e de Murphree (1925).

A eficiência definida por Kawase (1990) é baseada nas concentrações de soluto em uma mesma fase, na entrada e na saída da coluna. Ela é equacionada da seguinte maneira:

$$I_R = \frac{c_f - c_r}{c_f} \quad (2.7)$$

Onde:  $c_f$  é a fração mássica de soluto na alimentação

$c_r$  é a fração mássica de soluto no refinado.

Esta definição matemática pode ser chamada de Índice de Recuperação do Soluto, percentagem de extração ou percentagem de massa extraída.

O desempenho de um extrator de discos rotativos com "saia" perfurada (RDCS) foi estudado por Kawase (1990), em escala piloto. Os dados obtidos para este equipamento foram examinados usando a correlação acima proposta. Foi necessário determinar as concentrações das fases do topo e do fundo da coluna.

A segunda definição de eficiência, que pode ser usada, é uma correlação experimental que descreve a eficiência de separação do extrator em estudo, equacionada da seguinte forma:

$$E^* = \frac{y_f - y_r}{y_f - y_r^*} \quad (2.8)$$

Murphree (1925) apresentou esta definição matemática de eficiência, chamada Eficiência de Murphree.

Chegou-se a esta definição por meio de uma modelagem, fazendo-se uso de conhecimentos de análise dimensional. Esta equação representa a relação entre a eficiência obtida no equipamento (eficiência ideal) e a que seria obtida se o tempo de contato entre as fases fosse suficiente para se atingir o equilíbrio (eficiência real), portanto representa o desvio em relação ao equilíbrio. Esta equação é muito importante para fins de comparação e projeto de equipamentos de extração. Nesta definição,  $y_r^*$  é a concentração de soluto (fração molar) que se encontraria na fase refinado se o sistema estivesse em equilíbrio com a fase extrato.

Para uso da equação 2.8 é necessário o conhecimento das condições de equilíbrio para o sistema líquido ternário, o que pode ser obtido experimentalmente ou através de teorias termodinâmicas.

### **2.2.13 Características da Transferência de Massa em Processos de Extração Líquido-Líquido**

Em equipamentos de extração líquido-líquido em contracorrente, a transferência de massa ocorre em uma dispersão de gotas que fluem pela ação da gravidade através da fase líquida contínua (Rod, 1966). Uma maneira de melhorar a transferência de massa em colunas de extração líquido-líquido, aumentando a

área interfacial entre as fases e diminuindo o tamanho das gotas é apor meio de colunas mecanicamente agitadas. Há várias formas de promover a agitação em uma coluna, entre elas estão: pulsações e os dispositivos rotativos. As colunas de pratos pulsados ou fluxo pulsado são exemplos de equipamentos usados nestes processos.

A mudança de concentração em uma gota, na coluna, é função da diferença de densidades, do coeficiente de transferência de massa, da área interfacial e do tempo de contato entre as fases, sendo que estas variáveis dependem do diâmetro das gotas. A concentração nas gotas menores é mais próxima do equilíbrio do que nas gotas maiores devido ao maior tempo de residência e maior área interfacial (Rod, 1996).

Segundo Hanson (1968 a e b), em extratores comerciais, a transferência de massa ocorre entre a fase contínua e as gotas. Em sistemas líquido-líquido, o aumento da agitação, inicialmente, causa um crescimento da área interfacial (por meio da diminuição do tamanho das gotas) e assim, eleva a taxa de transferência de massa. Porém, isso não acontece indefinidamente (Rabelo, 1995). 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 interna, resultando na transferência de massa nas gotas devido apenas ao processo de difusão molecular que é lento. Em terceiro lugar, após um certo ponto, o aumento na agitação pode começar a suprimir a interação gota a gota, reduzindo a mistura na fase dispersa e também a taxa de transferência de massa (Hanson, 1968 b). Há, portanto, um grau ótimo de agitação que fornece a taxa de transferência de massa máxima.

### **2.2.14 Fração de Retenção da Fase Dispersa ("Hold-up")**

A transferência de massa entre as fases líquidas em escoamento em uma coluna de extração depende, entre outros fatores, da área interfacial de contato entre as fases contínuas e dispersa. A área interfacial está relacionada com o tamanho das gotas e com a retenção da fase dispersa no interior da coluna. A retenção da fase dispersa é expressa pela fração volumétrica da fase dispersa contida no volume total da coluna, sendo de grande importância no projeto de colunas de extração líquido-líquido por influenciar a transferência de massa entre as fases.

A seguir, são apresentados os fundamentos referentes à fração de retenção da fase dispersa, as regiões de operação existentes em colunas pulsadas e estudos encontrados na literatura relacionados com esta medida.

As publicações existentes na literatura, relacionadas à fração de retenção são, em sua maioria, referentes às colunas com fluxo pulsado, sendo que a quantidade de estudos relativos às colunas com pratos pulsantes é pequena. Assim, baseou-se a revisão bibliográfica nas colunas de fluxo e pratos pulsados, além de alguns trabalhos sobre a fração de retenção da fase dispersa em colunas de discos rotativos.

### **2.2.15 As Regiões de Operação**

As regiões de operação em colunas pulsadas são definidas como faixas de operação derivadas do comportamento das fases nas colunas (Góis, 1995).

Sege e Woodfield (1954) foram os primeiros autores a descreverem as regiões de operação em colunas pulsadas. Para isso, estes autores construíram gráficos em que foram relacionados à carga total de alimentação ( $V_c + V_d$ ) com a frequência de pulsação e definiram a existência de zonas ou regiões de operação distintas. A seguir é apresentada uma breve descrição de cada região de operação, segundo Sege e Woodfield (1954).

**1-Região de operação de completa inundação:** Sege e Woodfield (1954) definiram o ponto de inundação ("flooding") como sendo a condição de operação em que as correntes de alimentação da coluna e de entrada do solvente são impossibilitadas de escoarem em contracorrente. Ou seja, as correntes entram e saem da coluna por uma mesma extremidade, sem que possa acontecer um contato adequado entre elas. As gotas da fase que deve se dispersar na fase contínua são rejeitadas por esta fase. Não se dispersam e assim, não ascendem até o topo da coluna, devido às condições nas quais o equipamento é operado. Este tipo de operação é totalmente indesejável em qualquer equipamento de contato contínuo.

**2-Região de operação de inundação por pulsação insuficiente:** Esta região é parecida com a anteriormente descrita, por se tratar de uma região de operação de inundação. Nesta região de operação, a inundação é causada pela baixa quantidade de energia que é fornecida à coluna. As correntes líquidas não conseguem ultrapassar os furos dos pratos e retornam pela mesma extremidade em que entraram na coluna.

**3-Região de operação de mistura-decantação:** A operação de mistura-decantação, segundo Sege e Woodfield (1954), ocorre em baixas cargas (vazão total que entra na coluna) e frequências, sendo caracterizada pela separação das duas fases (leve e pesada), sob a forma de camadas distintas entre os pratos durante

o pulso. Este tipo de operação é altamente estável, porém menos eficiente quando comparada com a operação da mesma coluna em condições de emulsão.

**4-Região de operação de emulsão:** A operação tipo emulsão ocorre a cargas e frequências mais elevadas que a da operação mistura-decantação, sendo caracterizada pelo pequeno tamanho das gotas produzido. É uma dispersão uniforme da fase leve na pesada, apresentando, portanto, pequena variação durante o pulso. A grande área de contato interfacial por unidade de volume faz com que este tipo de operação seja mais eficiente que os apresentados anteriormente.

**5-Região de operação instável:** A operação instável ocorre a cargas e frequências ainda mais elevadas que as da região de emulsão. A mistura das fases forma gotas grandes ou porções de líquido com forma irregular, devido principalmente à coalescência das gotas da fase dispersa.

### 2.3 Sistemas de Duas Fases Aquosas

Na escolha de meios de extração para aplicações na biotecnologia, vários critérios devem ser considerados, já que nesta área parâmetros como, solubilidade e estabilidade dos compostos são importantes e não podem ser desprezados. Entre esses critérios pode-se citar (Porto, 1998):

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

- Ser passível de esterilizar;
- Ser imiscível ou parcialmente miscível com soluções aquosas;
- Não deve ter a tendência de formar emulsões estáveis com materiais biológicos;
- Não ser inflamável.

Além desses fatores, em processos de extração líquido-líquido aplicados a quaisquer sistemas, é imprescindível que os solventes escolhidos formem duas fases (sejam imiscíveis ou parcialmente miscíveis) e tenham densidades diferentes (Hustedt et al, 1985). É também importante que a separação das fases seja rápida.

Nos processos biotecnológicos, em que se opera com biomoléculas ou células, existe um número muito limitado de solventes adequados a serem usados. O uso de solventes orgânicos é, normalmente, limitado pelas características hidrofílicas dos produtos de fermentação. Isso leva à necessidade de utilização de elevadas razões entre as fases orgânica e aquosa, devido aos baixos coeficientes de partição dos produtos em relação ao solvente orgânico. Além disso, os solventes são geralmente tóxicos para as proteínas e também provocam a desnaturação das mesmas. Assim, a introdução dos sistemas de duas fases aquosas é uma alternativa que possibilita o emprego da extração líquido-líquido nestes processos, já que estes sistemas ajustam-se aos critérios requeridos nas bioseparações.

Os sistemas de duas fases aquosas formam-se pela adição de soluções aquosas de dois polímeros hidrofílicos, como por exemplo, polietileno glicol

(PEG) e dextrana ou de um polímero e um sal, como por exemplo, o PEG e fosfato de potássio, em concentrações acima de seus valores críticos, quando se separam em duas fases, espontaneamente. Nos exemplos citados, a fase mais leve, que tem a menor densidade, é rica em polietileno glicol, enquanto que a fase mais pesada, que tem a maior densidade, é rica em dextrana ou sais. Os polímeros e os sais são solúveis em água, mas são incompatíveis entre si e se separam em duas fases (Albertsson, 1986). Eles constituem um meio suave e protetor, adequado para a extração de substâncias de origem biológica, pois as fases são compostas de cerca de 70% a 90% de água, o que proporciona um ambiente ameno e adequado para o trabalho com compostos biologicamente ativos, preservando a sua estabilidade molecular e permitindo o seu processamento neste meio (Coimbra, 1995).

A separação espontânea, em duas fases distintas, devido à adição de soluções aquosas de dois polímeros foi inicialmente observada pelo microbiologista holandês Beijerinck, em 1896, ao misturar ágar com gelatina (ou amido solúvel) e água, a certas concentrações. A fase inferior era rica em ágar e a superior em gelatina (ou amido). Em 1956, Albertsson constatou que sistemas formados por polímeros solúveis e solventes orgânicos, assim como sistemas formados por polímeros hidrofílicos e água, também possibilitavam a partição de materiais biológicos, ou seja, permitiam que uma terceira substância introduzida ao sistema fosse coletada, preferencialmente, em uma das fases, de acordo com os ajustes de parâmetros físico-químicos. Devido a esta característica, os sistemas de duas fases aquosas estão sendo empregados no isolamento e purificação de biomoléculas de importância comercial, tais como, células, proteínas, enzimas, vírus, fragmentos de membranas e organelas celulares. De acordo com Albertsson (1986), é possível obter-se separações bastante seletivas de substâncias, usando-se sistemas aquosos de polímeros, sob condições não desnaturantes.

Além de ser usado com método de separação aplicados a materiais biológicos sob condições que preservam a sua atividade biológica, os sistemas de duas fases aquosas são usados também na determinação de propriedades superficiais de biomoléculas, tais como, carga e hidrofobicidade (Albertsson, 1986; Franco, 1992).

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

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

### **2.3.1 Tipos de Sistemas de Duas Fases Aquosas**

Existe uma grande variedade de polímeros hidrofílicos, naturais ou sintéticos, capazes de gerar a separação das fases ao se misturarem com um segundo polímero ou um composto de baixo peso molecular, como um sal. Alguns exemplos desses sistemas encontram-se na tabela 2.2. Entre eles, os mais estudados são PEG/Dextrana e PEG/Fosfato de Potássio. Nos livros de Albertsson (1986, 1971) encontram-se detalhados vários sistemas de duas fases aquosas com os respectivos diagramas de equilíbrio, descrevendo também as suas propriedades físico-químicas.

A escolha desses componentes das fases foi ao acaso, mas aparentemente perfeita, já que os coeficientes de partição nestes sistemas são atraentes nas faixas normais de separação (Kula, 1990).

Em princípio, todos os tipos de sistemas de duas fases aquosas podem ser empregados na separação de biomoléculas. No entanto, quando se considera o sistema em larga escala, onde os critérios de custo, quantidade de reagentes, tempo de separação das fases e reciclagem dos componentes não podem ser desprezados, o número de sistemas capazes de conjugar os requisitos necessários é bastante reduzido. De acordo com estas limitações, os sistemas usados no processamento em larga escala têm sido restritos aos sistemas constituídos por PEG-Dextrana e PEG-Sal, por estarem disponíveis no mercado em grandes quantidades, serem atóxicos, passíveis de esterilização e apresentarem uma maior faixa de aplicação e propriedades físicas adequadas, principalmente com relação à diferença de densidade e viscosidade. A adição de PEG e Dextrana em alimentos é permitida em muitos países, enquadrando-se dentro da legislação para o trabalho com produtos alimentícios e farmacêuticos. O mesmo pode ser dito para alguns tipos de sais de citratos, fosfatos e sulfatos (Coimbra, 1995).

**Tabela 2.6** - Exemplos de sistemas de duas fases aquosas (Albertsson, 1986)

Polietilenoglicol-	Dextrana
Polietilenoglicol-	Ficol
Polietilenoglicol-	Fosfato de Potássio
Polipropilenoglicol-	Polietilenoglicol
Polipropilenoglicol-	Dextrana
Polipropilenoglicol-	Glucose

Polietilenoglicol-	Dextrana
Polipropilenoglicol-	Fosfato de Potássio
Metilcelulose-	Dextrana
Polivinil álcool-	Dextrana

### 2.3.2 Polietilenoglicol

O polietilenoglicol,  $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ , é um dos polímeros mais úteis em sistemas de duas fases aquosas. Ele é um poliéter sintético neutro, linear ou de cadeia ramificada, disponível em diferentes massas moleculares, variando de poucas centenas a milhares de daltons. Solubiliza-se em água e em diferentes solventes orgânicos. A sua solubilização em água é atribuída à ligação das moléculas de água a muitas ou todas as moléculas em torno da cadeia do polietileno. Essa ligação ocorre pelo mecanismo de pontes de hidrogênio. Ligações deste tipo são relativamente fracas e podem ser quebradas de várias maneiras (Franco, 1992). O calor, em muitos casos, é suficiente para quebrar essas ligações e insolubilizar as moléculas do polímero. A adição de cátions monovalentes diminui a solubilidade desses polímeros, devido à competição dos íons de sal pela água, o que efetivamente reduz a quantidade de moléculas de água livres disponíveis para solubilizar o polímero. Dos sais inorgânicos,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$  e  $\text{AlCl}_3$ , são os mais capazes de promover este efeito.

O polietileno glicol, também chamado na forma abreviada de PEG, é também conhecido pelos nomes comerciais de poliglicol E®, carbowax E® e pluracol E®, dependendo da empresa que o fabrica. Para massas moleculares acima de 20000 daltons são denominados óxidos de polietileno, PEO. São

fornecidos na forma de soluções incolores estáveis ou pastas, se possuírem massas moleculares menores que 1000. Os de massas moleculares elevadas, acima de 1000, são encontrados na forma de pó ou de flocos brancos (Coimbra, 1995). Podem ser estocados a temperatura ambiente, embora a 4°C, a ocorrência de oxidação em soluções seja retardada. A oxidação do PEG, detectada pela diminuição do pH, devido à liberação de grupos ácidos altera a coloração da solução para marrom (Bamberger et al, 1985).

Não sendo antigênico nem imunogênico foi aprovado pelo FDA, "Food and Drug Administration". Sua utilização é de interesse na biotecnologia e biomedicina. Está sujeito a modificações químicas rápidas, controlando a solubilidade e aumentando o tamanho das moléculas às quais se liga. Não provoca a diminuição da atividade de células e proteínas (Harris, 1992). Sendo biodegradável e atóxico, a descarga de PEG não é problemática (Coimbra, 1995).

### **2.3.3 Sistemas PEG/Sal**

A formação de sistemas de duas fases aquosas constituídas por PEG e sal foi primeiro observado por Albertsson nos anos 50, mas os fundamentos teóricos envolvidos na formação desses sistemas ainda não são bem explicados.

Esse sistema foi introduzido para a aplicação prática na separação de proteínas em larga escala, devido à maior diferença entre as massas específicas das fases, menor viscosidade e menores custos, levando a uma separação muito mais rápida do que os sistemas PEG/Dextrana, por exemplo. A aplicação industrial de sistemas de duas fases aquosas PEG/Sal foi incentivada e desenvolvida pela disponibilidade de equipamentos comerciais que permitem separações contínuas e

mais rápidas de proteínas (Kula, 1990; Kroner e Kula, 1978; Kroner et al, 1982; Kula et al, 1982).

Os sistemas PEG/Sal apresentam boa seletividade e economia quando comparados aos sistemas PEG/Dextrana. Isto facilita o uso de sistemas polímero/sal em aplicações industriais, onde a partição é conduzida em baixas concentrações de sais (Kroner et al, 1984). Íons como fosfato, citrato e sulfato distribuem-se de maneira mais desigual do que íons monoatômicos, como cloretos, o que gera uma maior diferença de potencial entre as fases e conseqüentemente afeta positivamente o coeficiente de distribuição do soluto (Coimbra, 1995). Ao contrário da Dextrana, sais são fáceis de manusear e tem baixo custo.

Para sistemas de duas fases aquosas PEG/Sal, os efeitos de "salting out" parecem atuar de maneira mais intensa com o aumento do comprimento da linha de amarração, transferindo as proteínas da fase rica em sal para a fase rica em PEG. Se a solubilidade da proteína na fase rica em PEG não for suficiente, elas tendem a precipitar na interface. Os limites de solubilidade e "salting out" são dependentes das propriedades individuais das proteínas, portanto uma resposta diferencial é esperada quando uma mistura de proteínas é manipulada (Kula, 1982).

Inicialmente, os sistemas PEG/fosfato foram os mais usados e estudados (Kula, 1979, 1985, 1990; Kula et al, 1982; Hustedt et al, 1978, 1982; Veide et al, 1983). Os sistemas PEG/Sulfato começaram a ser estudados posteriormente (Eiteman e Gainer, 1989 a,b, 1991; Chiang e Wang, 1988).

Vernau e Kula (1989, 1990) desenvolveram um sistema de duas fases

aquosas usando citratos, a fim de tornar os sistemas de duas aquosas menos agressivos ao meio ambiente. O citrato é biodegradável e atóxico, e poderia ser descartado em uma planta de tratamento de resíduos.

### **2.3.4 Partição de Proteínas em Sistemas de Duas Fases Aquosas**

O fundamento de partição de biomoléculas entre duas fases ainda não é totalmente compreendido, apesar do progresso alcançado com a modelagem termodinâmica da distribuição de proteínas na interface dos sistemas de duas fases aquosas. Existem duas diferentes aproximações para a abordagem termodinâmica, a primeira utiliza um tratamento rigoroso para a modelagem do equilíbrio (Baskir et al, 1989) e a outra, métodos de contribuição de grupos (Kang e Sandler, 1988).

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

Há vários fatores que influenciam a partição de biomoléculas em sistemas de duas fases aquosas. Estes fatores são inerentes ao próprio sistema (tipo de componentes do sistema, massa molecular do polímero, concentração do polímero, e dos sais, tipo de íon presente, força iônica e pH) e ao biocomposto que é distribuído (massa molecular, carga, hidrofobicidade e conformação, presença de

ligantes bioespecíficos, entre outros). A seleção de propriedades dos sistemas de duas fases aquosas apropriados para a purificação de uma proteína específica é ainda muito empírica, embora existam regras gerais com relação ao efeito das características do polímero e da composição iônica da proteína a sofrer a partição (Cascone et al, 1991).

A modelagem quantitativa da partição de proteínas em sistemas de duas fases aquosas representa um complexo problema porque o comportamento do sistema depende de muitos fatores, que já foram citados anteriormente e das interações entre eles: interações dos polímeros com as cadeias das proteínas e com diferentes sais, interações polímero-polímero, sal-proteína, proteína-proteína e, quando usados, as interações dos ligantes com os outros componentes presentes. Estudos empíricos com sistemas de duas fases aquosas mostraram ser a distribuição da proteína função desses fatores.

A existência de tantas variáveis torna extremamente difícil a previsão teórica do coeficiente de partição de um dado soluto, conduzindo muitas vezes, ao trabalho experimental (Sebastião et al, 1996; Porto, 1998).

Considerando que  $C_t$  e  $C_b$  sejam as concentrações da proteína nas fases do topo e do fundo, o coeficiente de distribuição das proteínas é definido por:

$$K=C_t/C_b \quad (2.9)$$

Modelos quantitativos para predição do comportamento do sistema em função do tipo de polímero, de biomolécula, da composição das fases, do pH e da temperatura não estão disponíveis. Além disso, os mecanismos fundamentais que

governam o comportamento dessas variáveis ainda não foram satisfatoriamente entendidos (Baskir et al, 1989). Uma vez mais se ressalta a importância do desenvolvimento da termodinâmica da extração em sistemas de duas fases aquosas (Kula, 1990).

O coeficiente de partição de uma proteína em um sistema de duas fases aquosas, tendo o PEG como fase superior, geralmente, aumenta com a diminuição da massa molecular do PEG. Este fato é tanto mais pronunciado quanto maior for a massa molecular da biomolécula a sofrer a partição (Albertsson et al, 1987).

A adição de sais, mesmo em concentrações milimolares, influencia fortemente a partição de materiais carregados eletricamente. Em sistemas PEG/Dextrana, a adição de sal neutro com NaCl, diminui o coeficiente de partição de proteínas carregadas negativamente e aumenta a partição de proteínas positivamente carregadas. A magnitude deste efeito aumenta na ordem  $\text{SO}_4^{2-} < \text{F}^- < \text{Cl}^- < \text{I}^-$  e  $\text{NH}_4^+ < \text{Na}^+ < \text{K}^+$ . A alteração do pH do sistema contendo sal poderá alterar a partição pela mudança na carga da proteína (Johansson, 1985). Como a carga, na maioria dos biomateriais, é dependente do pH, a escolha deste e de um sal pode constituir um modo efetivo de ajuste de partição (Porto, 1998).

O fato de a partição depender de um grande número de fatores distintos confere considerável versatilidade aos sistemas de duas fases aquosas na separação de misturas de componentes.

A seletividade na partição de proteínas tem ainda que ser mais estudada e entendida. Um melhor conhecimento do comportamento de proteínas em sistemas de duas fases aquosas também levará à habilidade de prever a partição de

proteínas-alvo, freqüentemente encontradas em uma mistura de proteínas heterogênea e complexa (Franco, 1992).

A partição em sistemas de duas fases aquosas é principalmente, um processo onde os grupos expostos das moléculas entram em contato com os componentes das fases e é, portanto, dependente da superfície (Albertsson, 1986).

## 2.4 Modelos para a Partição de Proteínas entre as Fases

### 2.4.1 Teoria de Brönsted

A base para a separação por meio de um sistema bifásico é a distribuição seletiva de substâncias entre as fases. A distribuição é caracterizada pelo coeficiente de partição  $K$ , definido como concentração de proteína na fase mais leve, do topo,  $C_t$ , dividida pela concentração de proteínas na fase mais pesada, do fundo,  $C_b$ :

$$K = C_t/C_b \quad (2.10)$$

Obviamente, a escolha de um sistema adequado é uma das principais etapas em todo o trabalho de partição.

Se a energia necessária para movimentar as moléculas de proteínas de uma fase para outra é  $\Delta E$ , espera-se que, no equilíbrio, uma relação entre os coeficientes de partição e  $\Delta E$  seja expressa da seguinte maneira (Baskir et al, 1987):

$$C_t/C_b = e^{-\Delta E/kT} \quad (2.11)$$

Onde  $k$  é a constante de Boltzman,  $T$  é a temperatura absoluta,  $C_t$  e  $C_b$  são as concentrações das moléculas de proteínas nas fases do topo e do fundo, respectivamente.

$\Delta E$  deve depender do tamanho da partícula ou molécula, desde que quanto maior o tamanho, maior o número de átomos expostos que podem interagir com a fase ao redor, e então, a seguinte equação é sugerida:

$$C_t/C_b = e^{-\lambda M/kT} \quad (2.12)$$

Onde  $M$  é a massa molecular e  $\lambda$ , neste caso, é um fator que depende de outras propriedades que não a massa molecular. Para uma molécula esférica,  $M$  poderia ser substituído por  $A$ , a área superficial da molécula. Assim, a equação acima poderia ser escrita da seguinte forma:

$$C_t/C_b = e^{-\lambda A/kT} \quad (2.13)$$

Onde  $\lambda$ , neste caso, é um fator que depende de outras propriedades, que não sejam a área superficial. Por exemplo, propriedades de superfície, como a energia livre de superfície pela unidade de área.

Essa é conhecida como a teoria de partição de Brønsted e seu ponto principal é a relação exponencial entre o coeficiente de partição e as propriedades que

entram no fator  $\lambda$ , como por exemplo, a hidrofobicidade ou afinidade e carga. Pequenas mudanças em tais fatores provocam relativamente grandes mudanças no coeficiente de partição. Esta teoria prediz um alto grau de seletividade. Embora o modelo de Brönsted tenha demonstrado que a partição de proteínas pode ser sensível à massa molecular das partículas, ele é mais um modelo qualitativo, desde que combina todas as variáveis do sistema em um único parâmetro (Franco, 1992).

#### 2.4.2 Modelo de Albertsson

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

$$\ln K = \ln K_{el} + \ln K_{hidrof} + \ln K_{hifil} + \ln K_{conf} + \ln K_{lig} + \ln K_{tamanho} \quad (2.14)$$

Onde os subíndice el., hidrof., hifil., conf., lig., e tamanho referem-se, respectivamente, às contribuições eletrostáticas, hidrofóbicas, hidrofílicas, de conformação, de interações entre os ligantes e o tamanho das moléculas. A presença de sais implica na adição do termo  $\ln K_{hid}$ , onde hid. refere-se à hidratação. Estes parâmetros podem ser manipulados a fim de atingir a partição ótima da proteína-alvo.

Na prática, não se usa essa teoria para predizer o comportamento da partição. Ela tem sido usada apenas para descrever e explicar os comportamentos observados.

Esses modelos sofrem a limitação de examinar apenas o efeito das características das moléculas de proteína sem deter-se em analisar em detalhes a contribuição das fases que formam o meio. Eles não indicam como a massa molecular, a concentração, ou a escolha do polímero formador da fase influenciará a partição em sistemas de duas fases aquosas.

Assim, modelos quantitativos para a predição do comportamento do sistema em função do tipo de polímero, de biomolécula, da composição das fases, do pH e da temperatura não estão disponíveis (Coimbra, 1995). Os mecanismos fundamentais que governam o comportamento do sistema, em relação a essas variáveis, não foram satisfatoriamente compreendidos (Baskir et al, 1989).

### **2.4.3 Teorias Termodinâmicas**

Atualmente, existem métodos analíticos modernos, que medem os coeficientes do virial em sistemas binários com razoável precisão, aumentando o número de informações e facilitando o desenvolvimento de fundamentos termodinâmicos para sistemas de duas fases aquosas (Kula, 1990). Qualitativamente, a separação de fases e a distribuição de solutos podem ser preditas por meio de uma expressão do coeficiente de partição em função de parâmetros medidos experimentalmente. Para tanto, emprega-se normalmente a teoria de Flory-Huggins (Flory, 1953), uma aproximação mecânica estatística para descrição termodinâmica da separação de fases de polímeros em solventes orgânicos.

A teoria de Flory-Huggins é suficiente para descrever o comportamento termodinâmico que leva à separação das fases. Ao misturar polímeros, estes

preferem associar-se a misturar-se com outras moléculas de polímero, formando duas fases de diferentes composições de polímeros (Carlsson, 1988).

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

## **2.5 PLANEJAMENTO E ANÁLISE DE EXPERIMENTOS**

Pode-se definir um experimento como um teste ou uma série de testes nos quais as variáveis de processo são alternadas a fim de se observar às mudanças ocorridas nas respostas do sistema (Montgomery, 1997). O objetivo de uma pesquisa experimental é investigar as condições ótimas para obter um novo produto ou processo, mapear as respostas de interesse dentro da região operacional e escolher as condições para atingir as especificações desejadas.

A metodologia adequada para desenvolver estas aplicações depende do grau de conhecimento que existe sobre a relação entre a variável de resposta e as variáveis de processo. Os casos extremos são (Vasconcelos, 1997):

- A relação é conhecida a partir de considerações físicas. Neste caso, há um conhecimento exato do sistema e da função matemática que relaciona as variáveis de processo e de resposta, a menos de erros de experimentais. (modelo físico ou teórico).
  
- A relação não é conhecida e deve ser pesquisada experimentalmente. Busca-se uma função matemática que represente aproximadamente o fenômeno numa região limitada das variáveis de processo (modelo empírico).

Quando é preciso investigar diversas variáveis ao mesmo tempo, a determinação de relações de causa e efeito torna-se demorada e dispendiosa. A aplicação de conhecimento estatístico pode ajudar a resolver problemas como esse, de forma racional e econômica. Experimentos estatisticamente planejados fornecem uma base válida para o desenvolvimento de um modelo empírico do sistema de investigação (Barros Neto, 1995).

Esse item apresenta um resumo sobre os principais conceitos relativos à execução de um planejamento experimental baseado em princípios estatísticos e à análise dos dados resultantes, visando a elaboração de um modelo empírico do processo.

### **2.5.1 Conceitos Estatísticos Básicos**

#### **Erros**

Erros sistemáticos são erros que afetam os resultados sempre na mesma

direção e surgem como resultados de instrumentos descalibrados, aferições errôneas, padrões primários adulterados, etc. (Barros Neto, 1995)

Erro experimental é a flutuação ou ruído observado nos resultados de repetições de determinações experimentais. Esse é um erro estatístico, significando que ele surge de variações não controladas e geralmente inevitáveis e por isso é também chamado de erro aleatório. Qualquer determinação experimental estará afetada, em maior ou menor grau, por erros aleatórios, pois não é possível controlar rigidamente todos os fatores envolvidos. (Montgomery, 1997)

### **Populações, Amostras e Distribuições**

O conjunto de todos os indivíduos ou valores possíveis para uma dada situação é o que se chama em estatística de população, cuja média aritmética  $\mu$  indica a tendência central. O objetivo da inferência estatística é tirar conclusões sobre uma população utilizando uma amostra da população. Em uma amostragem aleatória cada membro da população tem a mesma probabilidade de ser escolhido (Peters, 1968). Normalmente a média da amostra é indicada pelo símbolo  $\bar{x}$ , enquanto que os valores individuais são indicados por  $x_1, x_2, x_3$ , etc.

O espalhamento ou dispersão dos dados pode ser estimado pela variância da amostra,  $s^2$ :

$$s^2 = \left( \frac{1}{N-1} \right) \left( \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \right), \quad (2.15)$$

onde:  $x_i$  é a  $i$ -ésima observação,  $N$  o número total de observações da amostra e  $\bar{x}$ , a média amostral (Barros Neto, 1995).

Para que as medidas de dispersão e de posição tenham as mesmas unidades, é usual substituir a variância pela sua raiz quadrada, que é chamada de desvio padrão.

Em análise estatística é necessário utilizar uma quantidade denominada graus de liberdade. Essa quantidade permite a correção matemática de dados devido a restrições impostas aos mesmos. Se houver um certo número  $p$  de restrições diferentes, o número de graus de liberdade se reduzirá de  $N$  para  $v = N - p$ . No cálculo da variância, por exemplo, (Equação 2.15), há uma restrição imposta devido ao cálculo da média, o que retira um grau de liberdade do conjunto de desvios  $x_i - \bar{x}$ .

A ordenação de dados com suas freqüências de ocorrência agrupadas em intervalos de classe é chamada de distribuição ou distribuição de freqüência.

### 2.5.2 Seleção de Variáveis

O primeiro passo no planejamento de um experimento é determinar quais são os fatores, isto é, as variáveis controladas pelo experimentador e as respostas de interesse para o sistema que se deseja estudar. É necessário também definir claramente o objetivo que se deseja alcançar, pois isto dependerá do tipo de planejamento a ser adotado (Barros Neto, 1995).

Para a determinação dos fatores de interesse uma técnica muito eficaz é a pesquisa de variáveis, desenvolvida por Dorian Shainin, que dissocia com precisão os efeitos principais e as interações entre as variáveis (ver definições no item 2.3.3). A técnica consiste em três fases sucessivas (Sutton, 1997):

### **Fase 1**

Nesta fase são listadas todas as variáveis potencialmente relevantes para o processo e atribuídos valores “bons” (+) e “ruins” (-) a cada uma (Sutton, 1997). Deve-se levar em conta que:

- A lista deve incluir até mesmo aquelas variáveis que parecem triviais, pois se uma variável crítica for omitida por ter sido considerada irrelevante, todos os experimentos desta fase terão de ser repetidos.
- Deve-se colocar em primeiro lugar na lista as variáveis consideradas mais importantes, pois elas serão examinadas primeiro na Fase 2, e pode-se poupar trabalho se provar que os fatores mais importantes são os do topo da lista.
- Cada nível (+) deve ser escolhido com a certeza de que levará à resposta desejada ou “boa” e cada nível (-) deve ser relacionado por levar a uma resposta inferior ou “ruim”.

Em seguida são realizados seis experimentos, três com todas as variáveis na posição (+) e três na posição (-), em ordem aleatória. Todos os seis experimentos precisam ser realizados para estabelecer com um nível de confiança de 95% que as

variáveis críticas foram incluídas na lista.

Se os resultados experimentais mostrarem que as respostas “boas” e “ruins” foram produzidas e com valores bem distintos, levando-se em conta o erro experimental pode-se afirmar que a lista contém a(s) variável(eis) crítica(s) e passa-se à Fase 2. Se esses dois critérios não forem encontrados, então ou a lista não contém as variáveis críticas ou os resultados bons e ruins foram invertidos, isto é, uma posição (+) na realidade produz um resultado (-) e vice-versa.

## **Fase 2**

Nesta fase examina-se o significado de cada variável pela utilização de experimentos aos pares, nos quais cada par enfoca uma variável particular. Inicialmente, o nível (-) da variável particular é combinado com o nível (+) de todas as outras variáveis; em seguida, os valores são trocados, isto é, o nível (+) daquela variável é combinado com o nível (-) de todas as outras variáveis. Pela troca de apenas uma variável o pesquisador pode verificar os efeitos daquela variável em particular (incluindo suas interações), pois todos os outros fatores permanecem nas condições escolhidas na fase 1.

Os resultados desta fase podem ser:

- A variável resposta não é afetada quando a variável em estudo é trocada. Nesse caso a variável particular não influencia a resposta dentro da faixa de condições testada.

- Há uma inversão completa das respostas, isto é, as respostas “boas” tornam-se “ruins” e as “ruins” tornam-se “boas”, quando a variável é trocada. Esse resultado indica que a variável em questão é a única variável crítica e nenhuma outra controlará a resposta, dentro das condições testadas.

Na seqüência desta fase são realizados mais dois experimentos para confirmação dos resultados. Ajustam-se todas as presumíveis variáveis críticas de modo que seus níveis (-) sejam combinados com os níveis (+) das demais variáveis e vice-versa. Se as respostas se inverterem as variáveis críticas foram identificadas.

### **Fase 3**

Nesta fase são quantificados os efeitos das variáveis críticas e suas interações por meio de métodos de Análise de Variância (ou ANOVA – “Analysis of Variance”), utilizando-se programas disponíveis comercialmente como, por exemplo, o Statistica da StatSoft (1995).

### **2.5.3 O Planejamento Fatorial**

Para executar um planejamento fatorial é necessário especificar os níveis em que cada fator será estudado, pois ele requer a realização de experimentos para todas as possíveis combinações dos níveis dos fatores (Cox, 1958).

Se houver  $n_1$  níveis do fator 1,  $n_2$  do fator 2,..., e  $n_k$  do fator k, o planejamento será um fatorial  $n_1 \times n_2 \times \dots \times n_k$ . O planejamento  $2^4$  é aquele realizado com 4 fatores em 2 níveis, perfazendo um total de 16 ensaios. O experimentador

pode querer repetir ensaios para ter uma estimativa do erro experimental e, neste caso, o número total de experimentos será maior. No caso de repetições é importante observar que elas sejam feitas rigorosamente de forma idêntica em todas as etapas do processo em estudo.

A listagem das possíveis combinações em um planejamento fatorial  $2^4$ , que é chamada de matriz de planejamento, é apresentada na Tabela 2.7, com os níveis codificados, onde (-) corresponde ao valor mais baixo e (+) ao valor mais alto (Barros Neto, 1995).

**Tabela 2.7** - Matriz de planejamento fatorial  $2^4$ .

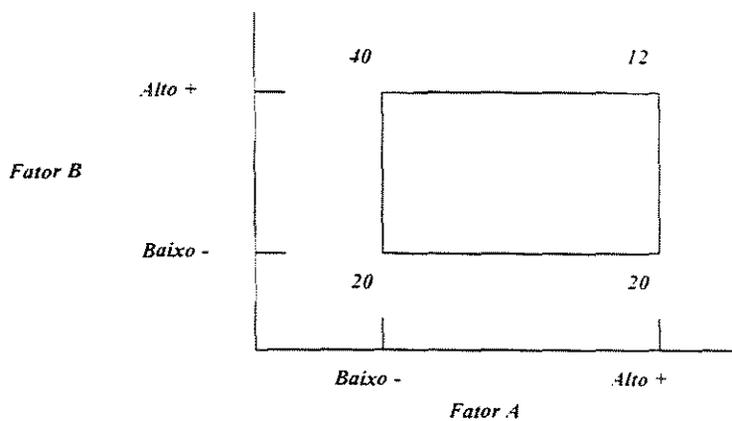
<b>Ensaio</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
01	-	-	-	-
02	+	-	-	-
03	-	+	-	-
04	+	+	-	-
05	-	-	+	-
06	+	-	+	-
07	-	+	+	-
08	+	+	+	-
09	-	-	-	+
10	+	-	-	+
11	-	+	-	+
12	+	+	-	+

Ensaio	1	2	3	4
13	-	-	+	+
14	+	-	+	+
15	-	+	+	+
16	+	+	+	+

### Efeitos e Interações

O efeito de um fator A pode ser definido como a mudança sofrida pela variável resposta quando passamos do nível mais baixo (-) de A para o nível mais alto (+) de A (Werkema, 1996). O efeito principal de um fator é a média dos efeitos desse fator em todos os níveis dos outros fatores.

A figura 2.10 mostra os resultados de um experimento com dois fatores.



**Figura 2.10** - Um experimento com 2 fatores, com as respostas y mostradas nos vértices (Montgomery, 1997).

No planejamento fatorial  $2^4$  são calculados, além da média global, quinze efeitos: quatro efeitos principais, seis interações de dois fatores, quatro interações de três fatores e uma interação de quatro fatores. Existem algoritmos e programas comerciais disponíveis que realizam os cálculos, como o algoritmo de Yates (Sutton, 1997) e o programa Fatorial (Barros Neto, 1995), entre outros.

## 2.5.4 Modelos Empíricos

### Ajuste por Mínimos Quadrados

A partir de planejamentos fatoriais de dois níveis pode-se construir modelos lineares simplificados, válidos apenas para dois extremos do intervalo, mas que, em muitas situações, configura-se como uma boa aproximação do sistema real (Li, 1964). Contudo, se for necessário um conhecimento maior sobre a relação funcional que liga a resposta do sistema aos fatores que a influenciam, são necessárias informações adicionais sobre o sistema, o que leva a realização de experimentos em pontos intermediários da região de interesse (Barros Neto, 1995).

A tabela 2.8 mostra os rendimentos observados em um planejamento  $2^2$  (Barros Neto, 1995).

**Tabela 2.8** - Rendimento de uma reação em função da temperatura, para o catalisador A (Barros Neto, 1995).

Temperatura t(°C)	40	45	50	55	60
Rendimento y (%)	60	70	77	86	91

O modelo para os dados da Tabela 2.8 pode ser representado por meio da seguinte equação:

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 T_i + \varepsilon_i, \quad (2.16)$$

onde:  $y_i$  é o rendimento correspondente à temperatura  $T_i$  e  $\varepsilon_i$  é o erro aleatório associado à determinação experimental do seu valor. Para determinar os valores de  $\beta_0$  e  $\beta_1$  deve-se ajustar a Equação (2.16) aos cinco pares de valores ( $y_i$ ,  $T_i$ ) da Tabela 2.8.

### Análise da Variância

O exame dos resíduos é fundamental na avaliação da qualidade do ajuste de qualquer modelo. O desvio de um valor observado em relação à média de todas as observações ( $y_i - \bar{y}$ ), pode ser decomposto em duas parcelas (Barros Neto, 1995):

$$(y_i - \bar{y}) = (\hat{y}_i - \bar{y}) + (y_i - \hat{y}_i). \quad (2.17)$$

A primeira parcela representa o afastamento da previsão do modelo para o ponto em questão,  $\hat{y}_i$ , em relação à média global  $\bar{y}$ . A segunda parcela é a diferença entre o valor observado e o valor previsto. Para um modelo bem ajustado essa segunda diferença deve ser pequena. Em termos quantitativos, essa comparação de desvios é feita por meio da soma dos quadrados, chamada de Soma Quadrática ou SQ. Assim:

$$[\text{SQ em torno da média}] = [\text{SQ devida à regressão}] + [\text{SQ residual}].$$

A soma quadrática devida à regressão,  $\text{SQ}_R$ , indica a parte da variação total das observações em torno da média que é descrita pela equação de regressão. Quanto maior for a fração descrita pela regressão, melhor será o ajuste do modelo. Isso é quantificado pela razão  $R^2 = \text{SQ}_R / \text{SQ}_T$  (Barros Neto, 1995).

A soma quadrática residual,  $\text{SQ}_r$ , representa a parte das respostas em torno da média que não é explicado pela regressão. Dividindo-a pelo número de graus de liberdade, obtém-se a média quadrática residual, que é uma medida aproximada do erro médio cometido ao se usar a equação de regressão para prever a resposta do sistema a uma dada condição.

Cada SQ tem associado a si um certo número de graus de liberdade, que indica quantos valores independentes envolvendo  $n$  observações  $y_1, y_2, y_3, \dots, y_n$  são necessários para determiná-la. Em geral, o número de graus de liberdade da SQ residual é a diferença entre o número de observações e o número de parâmetros estimados,  $p$ , isto é,  $v_r = n - p$ .

O número de graus de liberdade da SQ devida à regressão é o número de parâmetros menos um,  $v_R = p - 1$  (Barros Neto, 1995).

Para o caso de um modelo com apenas dois parâmetros os resultados da análise encontram-se reunidos na Tabela 2.9, que é chamada Tabela de Análise da Variância, onde são apresentadas também as Médias Quadráticas (MQ), que correspondem à divisão das Somas Quadráticas (SQ) pelos seus respectivos graus de liberdade (Barros Neto, 1995).

**Tabela 2.9** – Análise de variância para o ajuste de um modelo linear com 2 parâmetros (Barros Neto, 1995).

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Nº de graus de liberdade	Média Quadrática
Regressão	$\Sigma \left( \hat{y}_i - \bar{y} \right)^2$	1	$MQ_R = SQ_R$
Resíduos	$\Sigma \left( y_i - \bar{y} \right)^2$	n-2	$MQ_r = SQ_r / (n-2) = s^2$
Total	$\Sigma \left( y_i - \bar{y} \right)^2$	n-1	

### Intervalos de Confiança

A flutuação nas respostas introduz incerteza na determinação dos parâmetros e nas previsões feitas a partir dele, mesmo quando o modelo adotado está correto. Contudo, pode-se quantificar esta incerteza e determinar intervalos de

confiança para os valores estimados, que são intervalos dentro dos quais espera-se encontrar os parâmetros em questão (Brownlee, 1965).

Supondo que  $\theta$  seja um parâmetro desconhecido, o intervalo de confiança em torno dele será:

$$\theta \pm t_{n,2} \times [\text{erro padrão (ou desvio padrão) de } \theta],$$

onde: a variável aleatória  $t_{n,2}$  segue a distribuição de Student, com  $n-2$  graus de liberdade. A distribuição  $t$  é válida para amostras aleatórias tiradas de uma população normal. O valor de  $t$  também depende do nível de confiança com que se deseja estimar o parâmetro  $\theta$ , usualmente 95% (Barros Neto, 1995).

O parâmetro  $\theta$  será estatisticamente não significativo quando seu intervalo de confiança contiver o valor 0 (zero), isto é, quando os limites do intervalo tiverem sinais contrários. Como nenhum valor em um intervalo de confiança é mais provável do que outro, o valor de  $\theta$ , nesse caso, pode ser zero.

### **Falta de Ajuste e Erro Puro**

O gráfico de resíduos é uma boa ferramenta para se avaliar a qualidade do modelo. Entretanto, quando existem observações repetidas, é possível estimar o erro aleatório e, com ele, avaliar quantitativamente o ajuste do modelo.

A soma quadrática residual pode ser decomposta em duas parcelas (Barros

Neto, 1995):

$$\sum_i^m \sum_j^{n_i} \left( y_{ij} - \hat{y}_i \right)^2 = \sum_i^m \sum_j^{n_i} \left( y_{ij} - \bar{y}_i \right)^2 + \sum_i^m \sum_j^{n_i} \left( \hat{y}_i - \bar{y}_i \right)^2 \quad (2.18)$$

Como não depende das estimativas  $\hat{y}_i$ , o primeiro somatório do lado direito nada tem a ver com o modelo e reflete apenas a dispersão das respostas repetidas ao redor de suas médias em cada nível. Esse termo é chamado de soma quadrática devida ao erro puro ( $SQ_{ep}$ ) e dá uma medida do erro aleatório que afeta as respostas. A média quadrática devido ao erro puro,  $MQ_{ep}$ , é uma estimativa da variância  $\sigma^2$  postulada para as observações, esteja o modelo bem ajustado ou não.

O segundo somatório depende do modelo e fornece uma medida da falta de ajuste do mesmo às respostas observadas, por isso é chamado de soma quadrática devida à falta de ajuste,  $SQ_{faj}$ . A equação 2.18 pode ser resumida assim:

[Soma Quadrática Residual]= [Soma Quadrática devido ao erro puro]+[Soma Quadrática devido à falta de ajuste]

A média quadrática devido à falta de ajuste,  $MQ_{faj}$ , também estima  $\sigma^2$ , se o modelo for adequado. Um teste F razão  $MQ_{faj}/MQ_{ep}$  é utilizado para avaliar se o modelo está bem ajustado às observações. Valores altos dessa razão significam uma grande falta de ajuste.

## **Capítulo 3**

### **Equipamento e Procedimento Experimental**

## **3 – EQUIPAMENTO EXPERIMENTAL**

### **3.1 Introdução**

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

Neste capítulo são apresentados detalhes da montagem da micro-coluna agitada por campânulas pulsantes e os procedimentos adotados para a obtenção dos resultados experimentais. Nos experimentos foram usados sistemas de duas fases aquosas formados por PEG, sal (fosfato de potássio) e água deionizada, para a extração das proteínas.

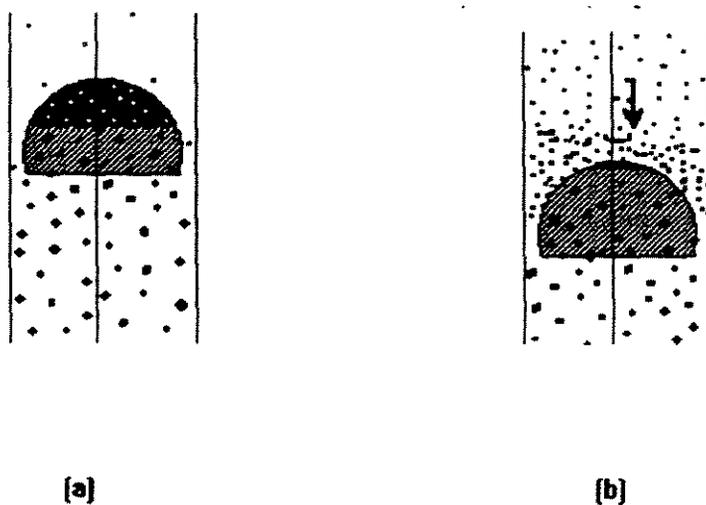
Neste equipamento foram realizados estudos relativos ao comportamento hidrodinâmico e de transferência de massa.

### **3.2 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 das 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 se aproxime do equilíbrio.

Com o sistema de agitação composto por campânulas pulsantes, as fases que entram na coluna comportam-se da maneira mostrada na figura 3.1. Como pode ser visto, 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.



**Figura 3.1** – Agitação por meio de campânulas pulsantes numa coluna de extração líquido-líquido pulsada. (a) campânula parada durante o intervalo entre os pulsos. (b) movimento descendente durante o pulso.

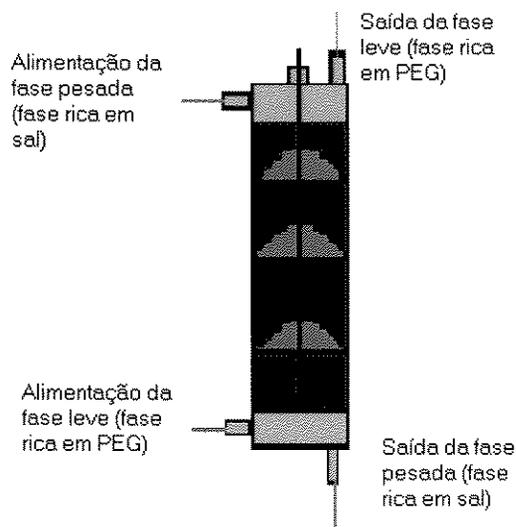
Durante o pulso, quando a campânula desce, o líquido mais leve (de menor densidade) que fica concentrado no interior da campânula, é forçado a passar pelos furos da peneira. A fase leve é “quebrada” em gotas bem pequenas. Uma

importante característica da agitação obtida por meio do uso de campânulas pulsantes é a formação de uma dispersão, bastante uniforme e de gotas pequenas, da fase leve na fase contínua, como pode ser visto na figura 3.1. Essas características são favoráveis à transferência de massa no sistema. Quando a campânula sobe, o movimento ascendente faz com que as fases misturem-se ainda mais.

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

### **3.3 Descrição do Equipamento**

Um esquema da micro-coluna de campânulas é mostrado na figura 3.2. Esta 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.



**Figura 3.2** – Esquema da micro-coluna de campânulas pulsantes.

No centro desta micro-coluna, está localizada uma haste de aço inox, na qual estão soldadas três campânulas, distanciadas 4 cm uma da outra. O diâmetro da base da campânula é 2,49 cm. A peneira de aço de inox, da qual a campânula é constituída, tem MESH 24 e, portanto, possui uma área livre para escoamento de 38%. Na figura 3.3, é mostrada a fotografia de uma haste na qual estão soldadas duas campânulas.

Durante um pulso, a campânula movimenta-se aproximadamente 2,8 cm para baixo e 2,8 para cima, o que faz com que a amplitude do pulso seja de aproximadamente 5,6 cm.



**Figura 3.3** – Campânulas soldadas à haste. Formando o dispositivo de agitação da micro-coluna.

Os bocais de alimentação e saída das fases são de aço inox e possuem um diâmetro interno de 3,65 cm e 6,85 cm de diâmetro externo. Na figura 3.4, é mostrada uma fotografia da micro-coluna utilizada neste trabalho.

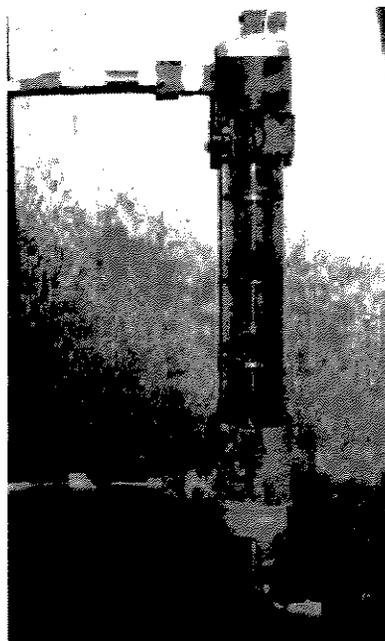
Os pulsos são fornecidos por um dispositivo que promove os movimentos alternativos (movimenta o eixo para cima e para baixo) e controlados por um controlador de frequência de pulsação.

A entrada das duas fases (fase leve e fase pesada) é feita por meio de uma bomba peristáltica de quatro pontos, previamente calibrada.

Os tubos para conduzir as entradas e saídas das fases são de viton, que é um material resistente à ação da maioria dos solventes. O viton foi escolhido para

permitir que outros sistemas sejam usados, já que os sistemas de duas fases aquosas não são corrosivos.

A temperatura dos experimentos foi mantida em  $(24 \pm 3)$  °C.



**Figura 3.4** – Micro coluna de campânulas pulsantes.

Na figura 3.5, encontra-se uma figura da montagem experimental, composta por duas bombas peristálticas, a micro-coluna, o controlador de pulsos e o dispositivo que fornece os pulsos ao sistema.

### **3.4 Procedimento Experimental – Operação da micro-coluna**

Para a operação da micro-coluna, com a finalidade de obter-se dados relativos à transferência de massa e fração de retenção da fase dispersa, foi usado o procedimento descrito a seguir:

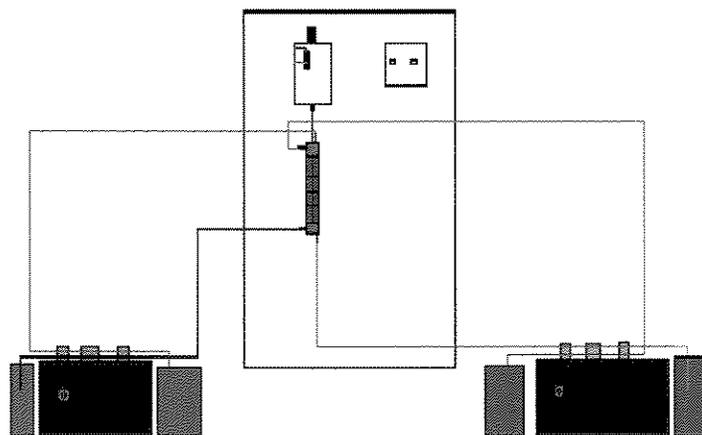
Primeiro é feita a alimentação da micro-coluna na entrada da fase pesada (nesse caso, fase rica em sal). Depois de preenchida toda a micro-coluna, ajusta-se a vazão, por meio da bomba peristáltica no valor desejado. Em seguida, alimenta-se a coluna com a fase leve (nesse caso fase rica em PEG). Ajusta-se também a vazão de alimentação da fase leve na vazão desejada. Nas saídas das fases leve e pesada uma conexão de plástico transparente, ligada aos bocais, permite que seja observado se o líquido está fluindo de maneira estável, mantendo o nível da coluna constante. Para o controle do nível de líquido no topo da coluna, que deve ser mantido constante, periodicamente, as vazões de saída de ambas as fases são verificadas durante o tempo de operação da micro-coluna.

Optou-se por este modo de controle do nível porque, como pode ser visto nas figuras 3.4 e 3.5, para fixar a coluna ao suporte e para construir a parte superior da coluna por onde o sistema de pulsação é introduzido e onde está o bocal de saída, usou-se aço-inox, o que impede a visualização das fases no topo e no fundo da coluna. Assim, não é possível que o controle do nível de líquido na coluna seja feito por meio da visualização das fases no interior do equipamento.

Após este procedimento, inicia-se a contagem do tempo de operação do equipamento e deixando a micro-coluna operando por sessenta minutos. O tempo de operação da micro-coluna foi escolhido baseado em trabalhos anteriores,

embora tenha sido observado que, algumas vezes, o estado estacionário foi atingido num tempo menor (aproximadamente trinta minutos).

No estado estacionário, as concentrações de saída das duas fases não variam com o tempo, embora, na prática, pequenas oscilações tenham sido verificadas. Considera-se que essas oscilações ocorram devido a erros experimentais, por possíveis imprecisões nas medidas ou devido às impurezas.



**Figura 3.5** – Montagem do Sistema de Extração líquido-líquido

Periodicamente, durante a operação da micro-coluna, coleta-se amostras nas saídas das fases do topo e do fundo da micro-coluna. Verifica-se, então, as vazões de saída das fases, por meio da medida do volume coletado durante um determinado período de tempo. Essas amostras são analisadas posteriormente, para que a concentração de proteína seja obtida.

Após sessenta minutos de operação, termina-se a corrida (tempo de um experimento). Fecham-se, simultaneamente, as entradas e saídas das fases. A

seguir, retira-se todo o líquido que está na coluna, deixa-se separar as fases e mede-se o volume da fase leve e o volume total da coluna. Com este procedimento, calcula-se a fração de retenção da fase dispersa.

### **3.5 Procedimento Experimental para Obtenção da Fração de Retenção da Fase Dispersa**

O procedimento experimental adotado no estudo da fração de retenção da fase dispersa baseou-se em um método que na literatura é conhecido como “método das interrupções simultâneas”. Usando-se este procedimento, obteve-se as medidas da fração de retenção da fase dispersa em cada experimento realizado.

O “método das interrupções simultâneas” consiste nos seguintes procedimentos:

- Depois de alcançado o tempo de operação do equipamento e retirada as amostras, interrompe-se a alimentação das duas fases. Simultaneamente, interrompe-se o mecanismo de pulsação, fecha-se às saídas de ambas as fases e deixa-se o conteúdo da micro-coluna em repouso, até que ocorra a separação das fases.
  
- A seguir, mede-se o volume total do líquido e o volume da fase dispersa contidos na micro-coluna, por meio da drenagem do conteúdo da micro-coluna, que é coletado em uma proveta graduada. Deixam-se os líquidos em repouso novamente, para que as fases separem-se completamente e posteriormente, anota-se os volumes desejados.

### 3.6 Procedimento Experimental Usado no Estudo da Transferência de Massa

O estudo da transferência de massa realizado neste trabalho foi baseado nos resultados experimentais obtidos e aplicado às equações 2.6, 2.7, que fornecem os valores do coeficiente de transferência de massa e índice de recuperação do soluto.

O procedimento experimental adotado para a aquisição dos dados de transferência de massa consta basicamente de medidas de concentração de proteína na corrente de alimentação e nas correntes de saída da micro-coluna. Estas medidas diretas ou usando-se o Método de Bradford.

### 3.7 Variáveis Estudadas

Neste trabalho, é analisada a influência de algumas variáveis operacionais sobre a hidrodinâmica e transferência de massa na micro-coluna desenvolvida e apresentada, possibilitando a identificação das melhores condições de operação da coluna, entre as estudadas, visando à obtenção de eficiências mais elevadas. A tabela 3.1 apresenta as variáveis que foram avaliadas e seus respectivos valores.

**Tabela 3.1** – Variáveis estudadas, relativas à operação da micro-coluna.

Variáveis estudadas	Valores assumidos
Frequência de pulsação (pulsos/segundo)	0,11; 0,16; 0,33
Razão entre as fases ( $V_d/V_c$ )	0,5; 1,0; 1,5

Nos experimentos em descontínuo, variou-se a composição dos sistemas de duas fases aquosas a fim de se encontrar as melhores condições de extração. Foram estudadas três linhas de amarração para diferentes massas moleculares de PEG. As tabelas com os valores dessas variáveis se encontram no Capítulo 4.

Para uma série de experimentos, variou-se a linha de amarração para sistemas formados com PEG 1500 e 4000, com finalidade de verificar a influência da concentração de PEG e dos sais na operação da micro-coluna. Os valores das concentrações de PEG e sal usados nestes experimentos foram:

PEG 1500/fosfatos de potássio (%p/p): 16,2/ 14,3

17,7/ 15,7

19,7/ 17,7

PEG 4000/fosfatos de potássio (%p/p): 16,2/ 14,3

17,7/ 15,7

19,7/ 17,7

## **Capítulo 4**

### **Materiais e Métodos**

## 4 - MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Reagentes

A tabela 4.1 apresenta os reagentes e produtos químicos utilizados neste trabalho.

**Tabela 4.1** - Reagentes utilizados nos métodos analíticos.

REAGENTES	PUREZA	FORNECEDOR
Tripsina (do pâncreas suíno)	99% de Pureza	Sigma
Fosfato de Potássio monobásico	Analítico	Ecibra
Fosfato de Potássio bibásico	Analítico	Ecibra
Polietileno Glicol - 1500	Puro	Synth
Polietileno Glicol - 4500	Puro	Synth
Etanol	Absoluto	Synth
Ácido Ortofosfórico	Puro	Ecibra

### 4.2 Proteína

A proteína modelo utilizada foi a Tripsina do pâncreas suíno (comercial), cujo ponto isoelétrico (pI) é 6,8, o pH ótimo é 7,8 e o PM= 23.000g/mol.

## 4.3 Preparação dos Sistemas de Duas Fases Aquosas

### 4.3.1 Extração em Descontínuo

Para os processos de extração em descontínuo realizados em tubos de ensaio, foram pesados sistemas com massa total de 6 g.

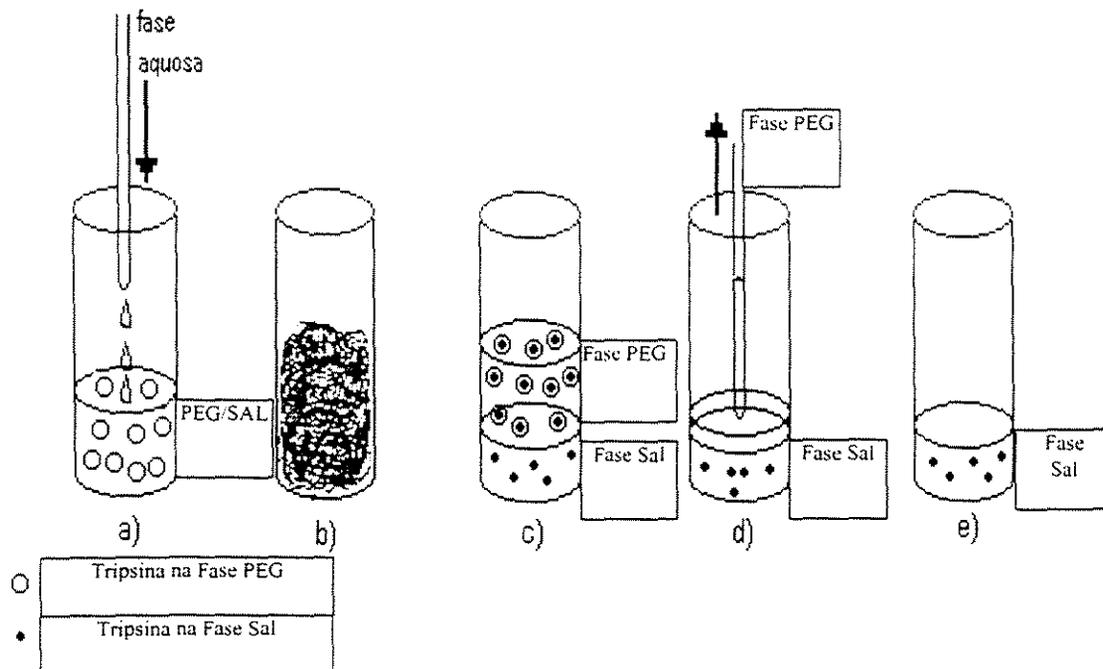
As quantidades de PEG, fosfatos de potássio e água deionizada foram pesadas, de modo que as concentrações de PEG, sal e água fossem obtidas. Para obter-se o pH desejado, deve-se colocar as proporções adequadas entre os sais de fosfato de potássio mono e bibásico. A relação entre o pH e a proporção entre os sais encontram-se na tabela 4.2.

**Tabela 4.2** – pH das soluções de sais de fosfatos de razões [(mol/L)/(mol/L)], sal 1 : monobásico; sal 2 : bibásico (sais fosfato – de potássio (K) ou de sódio (Na)) (Adaptada de Franco, 1992)

PH	Razão sal 1 : sal 2 [(mol/L)/(mol/L)]
5,8	11,50
6,0	7,10
6,6	1,67
7,0	0,67
7,4	0,24
8,0	0,06

Depois de pesados e misturados os componentes do sistema, estes são agitados por 30 minutos em agitador magnético e, a seguir, agitado por um minuto em “vórtice”, para garantir a dissolução total dos componentes do sistema.

O procedimento é ilustrado na figura 4.1:



**Figura 4.1** - Extração descontínua da tripsina.

- adição da fase aquosa com tripsina;
- agitação vórtice por 1 minuto;
- separação das fases após 10 minutos na centrífuga;
- retirada da fase leve (fase com PEG);

Foram utilizados sistemas de duas fases aquosas com as concentrações de polímeros e sais apresentados na tabela 4.3.

**Tabela 4.3** – Composição dos sistemas de duas fases aquosas PEG-Fosfatos de Potássio usados na extração de proteínas.

Massa Molecular do PEG (Da)	PEG/Fosfato de Potássio (%p/p)		
	Linhas de Amarração		
	1	2	3
1500	16,2	17,7	19,7
4000	16,2	17,7	19,7

Na maioria dos casos, para cada tipo de sistema, as concentrações do polímero e do sal foram escolhidas de forma a obter três linhas de amarração: uma próxima ao ponto crítico, outra intermediária e uma outra mais afastada do ponto crítico, tendo-se utilizado para este fim os diagramas de fases descritos por Albertsson (1996).

#### 4.3.2 Extração Contínua de Tripsina em Sistemas de Duas Fases Aquosas

Os sistemas de duas fases aquosas utilizados para a extração contínua em colunas de extração líquido-líquido foram preparados da seguinte maneira: quantidades pré-determinadas de PEG, sais de fosfato de potássio (mono e bibásico) e água deionizada foram pesados, misturados e agitados em um agitador magnético por cerca de 4 horas, para que o sistema atinja o equilíbrio e os componentes sejam totalmente dissolvidos. O volume total das fases preparado era calculado de acordo com a vazão escolhida para o experimento, permitindo a

operação da micro-coluna por sessenta minutos e o preenchimento da micro-coluna com a fase rica em sal. A razão de sais mono e bibásico foram determinadas de modo a obter-se um pH=6,0 para o experimento com a Tripsina. As fases foram deixadas em repouso por 24 horas em um decantador e então, cada fase foi cuidadosamente removida e estocada separadamente, para posterior uso na micro-coluna.

## **4.4 Método Analítico**

### **4.4.1 Preparação do Reagente BRADFORD**

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

### **4.4.2 Determinação do Conteúdo Protéico**

A determinação da tripsina foi feita de acordo com o método do Bradford (1976). O princípio do método de BRADFORD é baseado no fato que o corante Comassie Brilliant Blue coexiste em duas formas de cores diferentes: a cor vermelha e a cor azul. A forma da cor vermelha é rapidamente convertida na outra forma, por ligação da parte cromófora do corante da proteína. A 400 µl da fase adicionou-se 2 ml do reagente de BRADFORD e a absorbância foi lida a 595 nm antes de 15 minutos.

## 4.5 Cálculo do Índice de Recuperação do Soluto

O “Índice de Recuperação do Soluto” é obtido pela seguinte equação:

$$I_R = \frac{c_f - c_r}{c_f} \quad (4.1 a)$$

Onde:  $c_f$  é a fração mássica de soluto na alimentação e  $c_r$  é a fração mássica de soluto na fase refinado.

Nos cálculos realizados, usou-se a concentração (massa/volume) ao invés da fração mássica. Assim usou-se a seguinte equação:

$$I_r = \frac{C_f - C_r}{C_f} \quad (4.1 b)$$

Onde:  $C_f$  é a concentração do soluto na alimentação e  $C_r$  é a concentração de soluto na fase refinado.

## 4.6 Cálculo do Coeficiente de Partição

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

$K = \text{Concentração de tripsina na fase Superior} / \text{Concentração de Tripsina na fase Inferior}$

## 4.7 Cálculo do “Hold-up”

Na extração contínua, após ter sido atingido o estado estacionário em condições de agitação e velocidade das fases pré-estabelecidas, foi determinado o hold-up da fase dispersa pelo método do estancamento. Neste procedimento são interrompidos simultaneamente os pulsos e correntes de entrada e saída da coluna. A coluna foi então descarregada, em uma proveta graduada e lidos os volumes das fases que estavam separadas pela gravidade. Desta maneira é retirada a medida do “hold up” médio e o mesmo foi calculado utilizando-se a seguinte expressão:

$$H = [(\text{volume da fase dispersa (ml)} / \text{volume total do sistema de fases (ml)}) * 100$$

## **Capítulo 5**

### **Resultados e Discussões**

## **5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1- Extração Descontínua**

O processo de extração líquido-líquido da proteína Tripsina foi primeiramente realizado em descontínuo para determinar parâmetros ótimos de extração. As variáveis pH, concentração do PEG e do Sal foram investigados para se obter melhores resultados na extração contínua.

A escolha do intervalo de investigação das variáveis experimentais foi baseada na literatura e nas características bioquímicas da Tripsina. Essa proteína apresenta massa molar de -23000 g/mol, pH ótimo de 7,8, sendo que a característica mais importante para este tipo de separação é o seu ponto isoelétrico, de 6.8, pois por meio dele se consegue prever a carga líquida da proteína no pH em estudo.

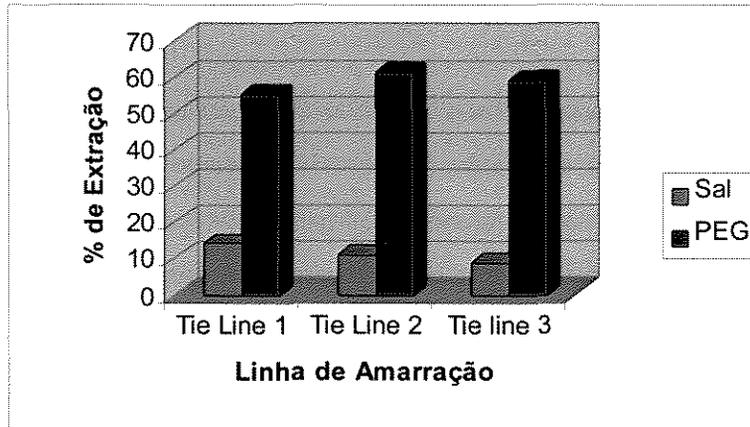
#### **5.1.1 – Parâmetros Experimentais**

Com a metodologia descrita no capítulo anterior, foi elaborada uma planilha de experimentos baseados na variação do pH (6,0 e 7,0), concentração do Sal e PEG e do tipo do PEG (1500 e 4000). Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Os resultados obtidos nos experimentos encontram-se nas tabelas 5.1, 5.2, 5.3 e 5.4 e gráficos 5.1, 5.2, 5.3 e 5.4. Nas tabelas, os resultados foram apresentados pelas médias dos ensaios em duplicata.

**Tabela 5.1** – Resultado da extração descontínua de tripsina para PEG 1500 e pH=6,0.

	Sal (%)	PEG(%)
<b>Tie Line 1</b>	14,00	55,28
<b>Tie Line 2</b>	11,01	61,26
<b>Tie Line 3</b>	8,70	59,01



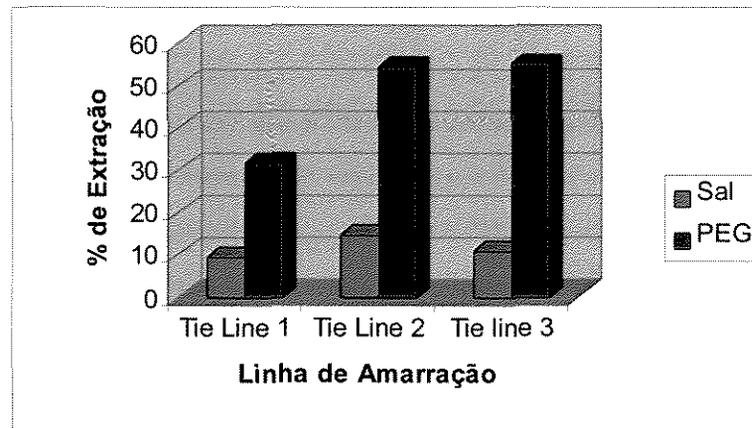
**Figura 5.1** - Gráfico da extração descontínua de tripsina para PEG 1500 e pH=6,0.

Pelos resultados obtidos na tabela 5.1 e pelo gráfico 5.1, observa-se que a fase PEG extraiu a maior parte da tripsina da solução em relação à fase salina. A tie line 2 apresentou a melhor extração na fase leve (PEG) em relação às outras tie lines. O aumento na concentração do sal e do PEG resultou na redução da extração da proteína na fase salina.

O balanço de massa não fechou devido ao acúmulo de tripsina na interface da solução e pelas perdas decorrentes dos ensaios.

**Tabela 5.2** – Resultado da extração descontínua de tripsina para PEG 1500 e pH=7,0.

	Sal (%)	PEG (%)
<b>Tie Line 1</b>	9,49	31,65
<b>Tie Line 2</b>	14,68	54,35
<b>Tie Line 3</b>	10,97	55,11



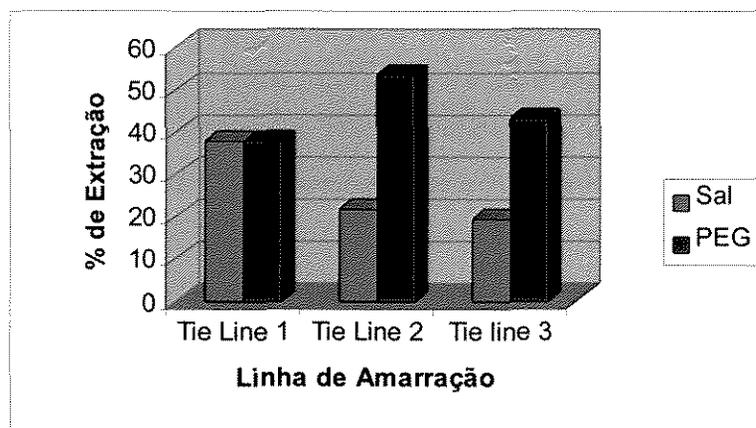
**Figura 5.2** - Gráfico da extração descontínua de tripsina para PEG 1500 e pH=7,0.

Os resultados representados na tabela 5.2 e no gráfico 5.2 indicam que a tie line 3 obteve a melhor extração para a fase leve (PEG). Porém a extração pela fase leve (PEG) na tie line 2 ficou próxima do resultado obtido pela tie line 3, o que indica que altas concentrações de sal e PEG ajudam na extração da proteína. Para fase salina a tie line 2 obteve a melhor extração em relação a demais tie lines. Notou-se que o aumento ou redução da concentração do sal e do PEG não elevou o nível de extração da fase salina.

Foi evidenciado o acúmulo de tripsina na interface da solução, o que resultou em perdas de proteína durante a extração.

**Tabela 5.3** – Resultado da extração descontínua de tripsina para PEG 4000 e pH=6,0.

	Sal (%)	PEG (%)
<b>Tie Line 1</b>	37,84	37,91
<b>Tie Line 2</b>	21,63	53,67
<b>Tie Line 3</b>	19,49	43,22



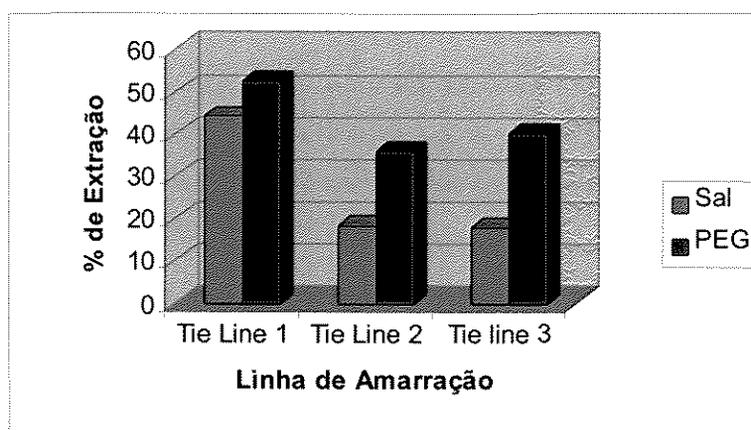
**Figura 5.3** - Gráfico da extração descontínua de tripsina para PEG 4000 e pH=6,0.

Pela tabela 5.3 e pelo gráfico 5.3, observa-se que a extração da fase leve (PEG) e fase salina praticamente tiveram o mesmo valor para tie line 1. Isso demonstra que a menor quantidade de sal e PEG utilizada nesse sistema não alterou a extração nas fases. Com relação a fase salina, evidenciou-se que com o aumento da concentração de sal, a quantidade de proteína na fase decresce (“salting out”).

O balanço de massa não foi fechado devido às perdas provocadas pelos ensaios e pelo acúmulo de tripsina na interface da solução.

**Tabela 5.4** – Resultado da extração descontínua de tripsina para PEG 4000 e pH=7,0.

	Sal (%)	PEG (%)
<b>Tie Line 1</b>	44,21	52,59
<b>Tie Line 2</b>	18,44	35,81
<b>Tie Line 3</b>	18,09	40,33



**Figura 5.4** - Gráfico da extração descontínua de tripsina para PEG 4000 e pH=7,0.

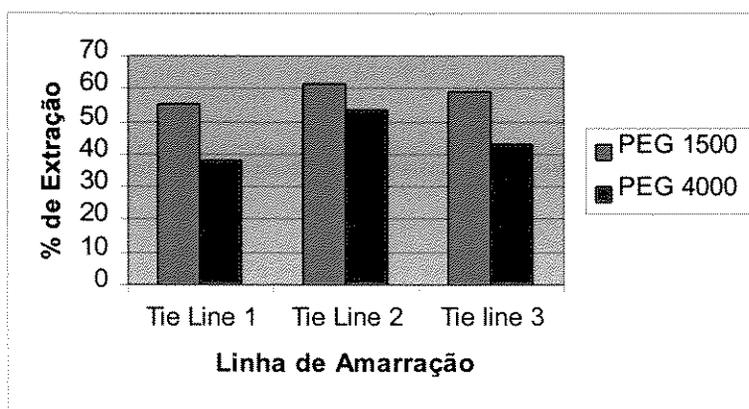
Nos resultados obtidos na tabela 5.4 e no gráfico 5.4, verifica-se que a menor concentração de sal e PEG resultou na melhor condição de extração para fase leve (PEG) para tie line 1. O mesmo ocorreu para a fase salina, a menor concentração de sal e PEG proporcionou a melhor extração na tie line 1. Evidenciou-se que para tie line 1 não houve acúmulo de proteína na interface da solução, mas nas demais tie lines verificou-se que houve uma perda de proteína na interface.

### 5.1.2 – Efeito do PEG

Os resultados da influência do PEG na extração da Tripsina são apresentados nas tabelas 5.5 e 5.6 e gráficos 5.5 e 5.6.

**Tabela 5.5** – Resultado da extração descontínua de tripsina para pH=6,0

	PEG 1500 (%)	PEG 4000(%)
<b>Tie Line 1</b>	55,28	37,91
<b>Tie Line 2</b>	61,26	53,67
<b>Tie Line 3</b>	59,01	43,22

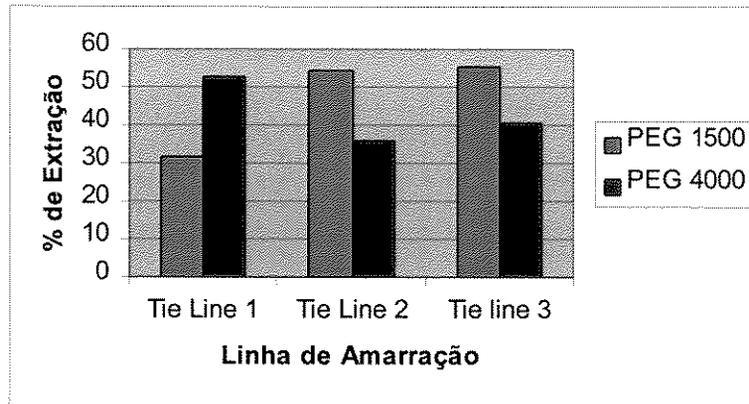


**Figura 5.5-** Gráfico da extração descontínua de tripsina para pH=6,0.

Verificou-se nos resultados acima que o PEG 1500 teve um rendimento superior ao do PEG 4000 nos ensaios para pH=6,0. Isso demonstra que o peso molecular do PEG interfere na extração da proteína.

**Tabela 5.6** – Resultado da extração descontínua de tripsina para pH=7,0

	PEG 1500 (%)	PEG 4000(%)
<b>Tie Line 1</b>	31,65	52,59
<b>Tie Line 2</b>	54,35	35,81
<b>Tie Line 3</b>	55,11	40,33

**Figura 5.6** - Gráfico da extração descontínua de tripsina para pH=7,0.

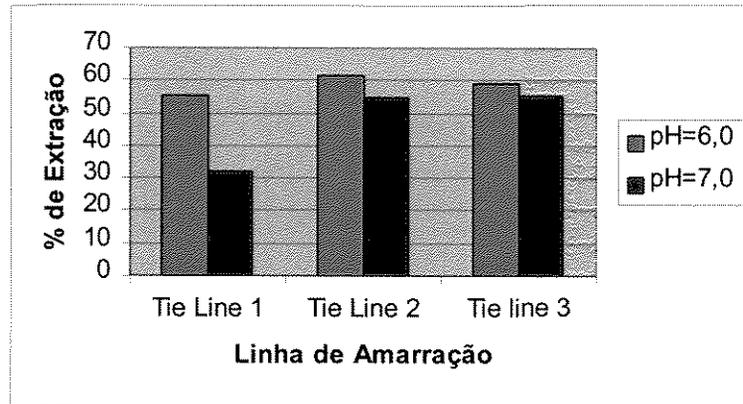
Observa-se nos resultados da tabela 5.6 e no gráfico 5.6 que o PEG 1500 obteve uma melhor extração nas tie lines 2 e 3 para pH=7,0. Pode-se notar uma forte tendência para a extração em um PEG com menor peso molecular. Para tie line 1 observou-se a maior extração por parte do PEG 4000 em relação ao PEG 1500.

### 5.1.3 – Efeito do pH

Os resultados da influência do pH na extração da tripsina são apresentados nas tabelas 5.7 e 5.8 e gráficos 5.7 e 5.8.

**Tabela 5.7** – Resultado da extração descontínua de tripsina para PEG 1500

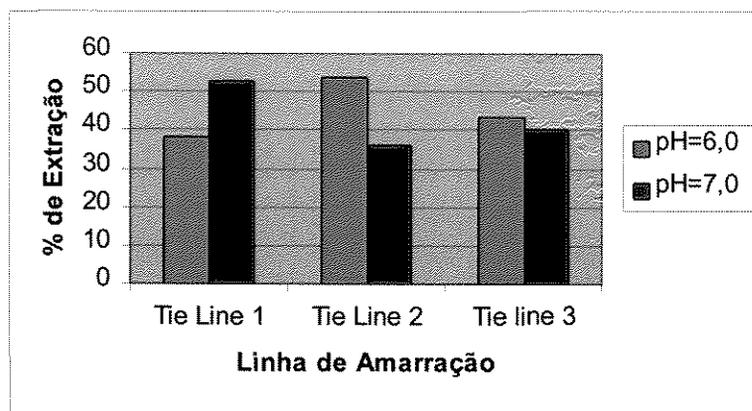
	pH=6,0 (%)	pH=7,0(%)
<b>Tie Line 1</b>	55,28	31,65
<b>Tie Line 2</b>	61,26	54,35
<b>Tie Line 3</b>	59,01	55,11

**Figura 5.7** - Gráfico da extração descontínua de tripsina para PEG 1500.

Evidenciou-se na tabela e gráfico acima que o pH=6,0 possui uma tendência em extrair a proteína na fase leve (PEG) para o PEG 1500. Isso demonstra que a variável pH é importante na escolha da melhor condição de extração.

**Tabela 5.8** – Resultado da extração descontínua de tripsina para PEG 4000

	pH=6,0 (%)	pH=7,0(%)
<b>Tie Line 1</b>	37,91	52,59
<b>Tie Line 2</b>	53,67	35,81
<b>Tie Line 3</b>	43,2	40,33

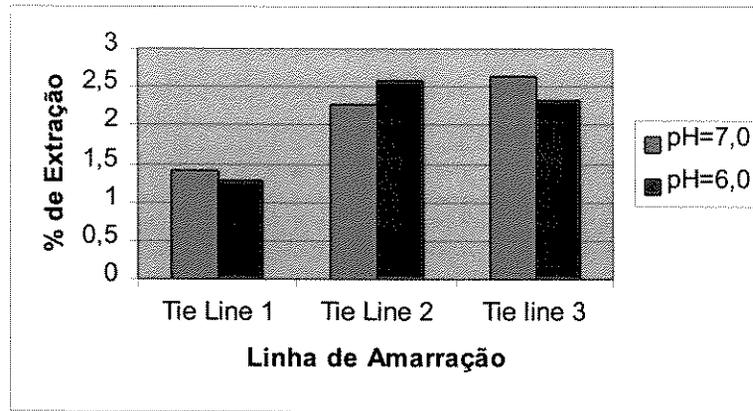


**Figura 5.8** - Gráfico da extração descontínua de tripsina para PEG 4000.

Verifica-se pelos dados obtidos na tabela e gráfico acima que houve uma melhor extração para pH=6,0 nas tie lines 2 e 3, durante a extração na fase leve (PEG). Entretanto para a tie line 1 verificou-se que o pH=7,0 possui uma melhor extração. Isso confirma a importância do pH na hora da escolha das melhores condições de operação na extração contínua.

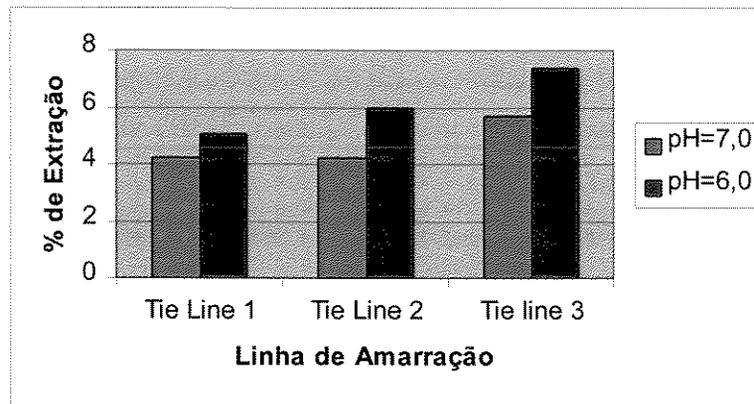
#### 5.1.4 – Coeficiente de Partição

Com a metodologia descrita no capítulo anterior, verificou-se o comportamento dos coeficientes de partição baseados na variação do pH (6,0 e 7,0), concentração do Sal e PEG e do tipo do PEG (1500 e 4000). Os resultados são mostrados no gráfico 5.9 e 5.10.



**Figura 5.9** - Gráfico do coeficiente de partição da tripsina para PEG 4000.

Observou-se que o coeficiente de partição teve um valor máximo para pH=6,0 na tie line 2 e para pH=7,0 para tie line 3. Isto significa que a diferença de concentração de proteínas entre as fases diminui quando a concentração do sal e do PEG são elevados. Um outro fator significativo que pode ser observado no gráfico acima, é com relação ao menor do coeficiente de partição tie line 1. Pode-se dizer que a concentração de proteína nas fases teve uma influência da maior razão entre as concentrações do sal e do PEG.



**Figura 5.10** - Gráfico do coeficiente de partição da Tripsina para PEG 1500.

Observou-se que o coeficiente de partição para pH=6,0 foi superior ao coeficiente de partição para pH=7,0 em todas as tie lines. Nota-se que a diferença do coeficiente de partição diminui à medida que a tie line decresce, isto pode ter sido ocasionado pelo aumento da razão entre as concentrações de sal e PEG.

Analisando-se os resultados obtidos, o sistema formado por PEG 1500, pH=6,0 e a Tie Line 2 (PEG/Sal – 17,7/15,7) foi considerada a mais adequada para a extração da Tripsina. As condições mencionadas foram utilizadas para a extração líquido-líquido contínua de tripsina na micro-coluna de campânulas pulsantes.

## 5.2- Extração Contínua

### 5.2.1 – Seleção das Variáveis

A tabela 5.9 apresenta a lista de variáveis com o nível (+), que produz resultados “bons”, (-) que produz resultados “ruins” e (0) representa o ponto central entre o nível (+) e (-), tendo como resultado a extração do produto. A % de extração foi determinada segundo o capítulo anterior. Foram realizados 6 ensaios, 2 com nível(+), 2 com nível (-) e 2 com nível (0), sendo que a ordem de execução dos mesmos foi sorteada para garantir que as variáveis não controladas não interfiram no resultado.

**Tabela 5.9** – Lista de variáveis para seleção

Variável	Nível (+)	Nível (0)	Nível (-)
Razão da vazão da fase leve/fase pesada	1,5	1,0	0,5
Freqüência de Pulsação (pulsos/segundo)	1/3	1/6	1/9

A tabela 5.10 apresenta os resultados médios obtidos nesta fase.

**Tabela 5.10** – Resultados da seleção das variáveis

Ensaio (aleatório)	Nível das vazões	Nível de Pulsação	Extração (%)
3	-	-	43,99
2	+	-	85,33
5	-	+	47,54
4	+	+	90,63
1	0	0	80,57
6	0	0	75,48

### 5.2.2) Cálculo do “Hold-up”

Determinou-se a fração de retenção da fase dispersa ( $\theta$ ) por meio da relação entre o volume da fase dispersa retido na micro-coluna e o volume total da micro-coluna, como visto no capítulo anterior. O resultados estão no gráfico 5.11.

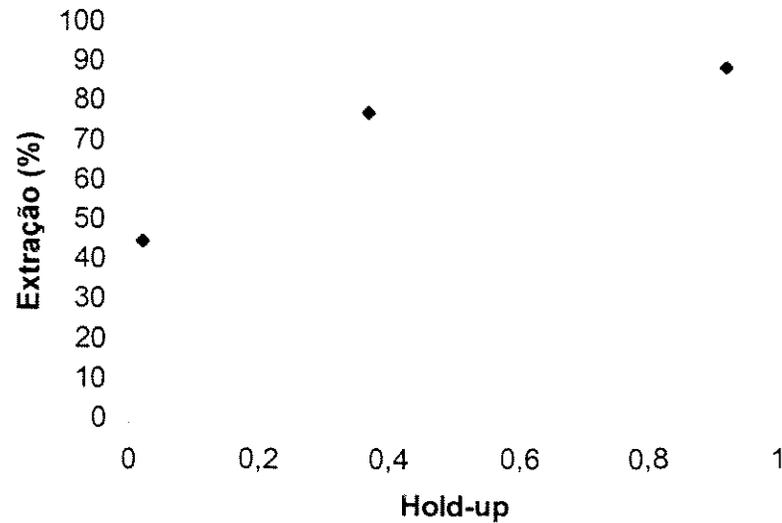
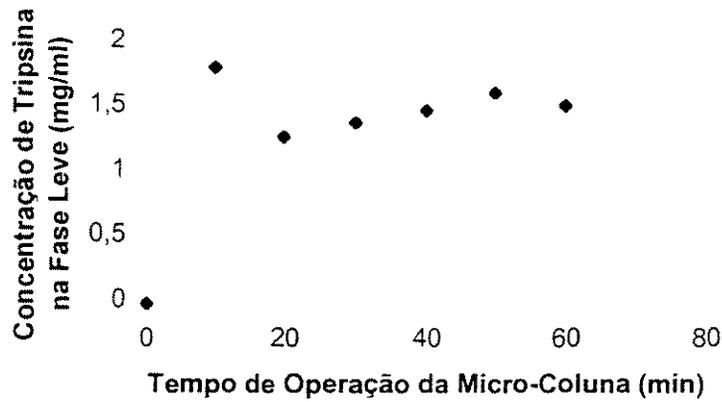


Figura 5.11 - Gráfico do hold-up x Extração (%).

Observou-se no gráfico acima que a eficiência de separação está ligada a fração de retenção da fase dispersa. Isto ocorre devido ao crescimento da fração de retenção da fase dispersa, que promove um tempo maior de contato entre as fases, e com isso a transferência de massa é elevada.

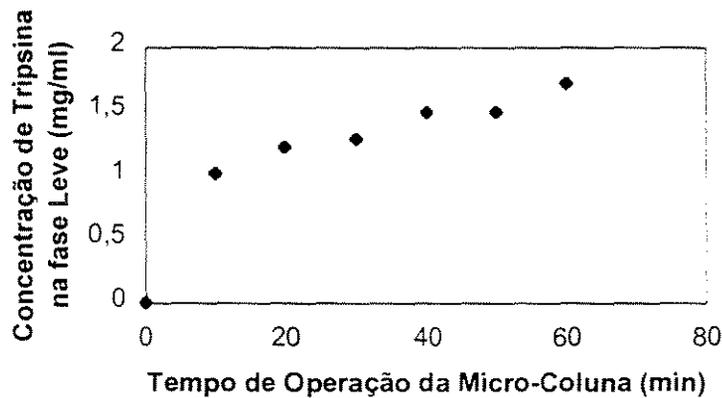
### 5.2.3) Extração Contínua de Tripsina na Micro-Coluna de Campânulas Pulsantes

O estudo da extração foi realizado a fim de analisar o comportamento da extração líquido-líquido durante o tempo de operação da micro-coluna. O resultados obtidos são apresentados nos gráficos 5.12, 5.13, 5.14, 5.15 e 5.16.



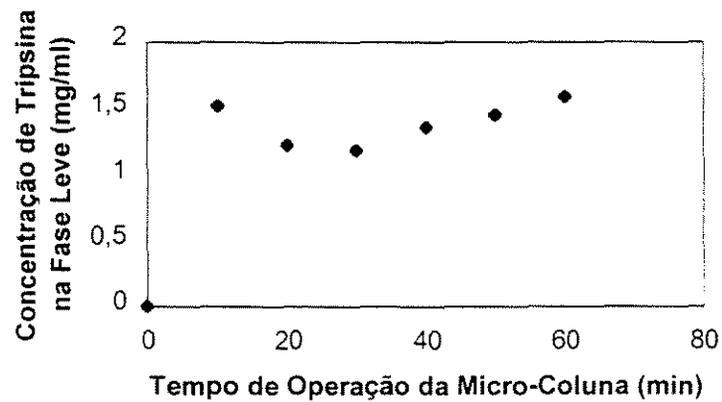
**Figura 5.12** - Gráfico da Concentração de Tripsina x Tempo de Operação para o ensaio 1.

Verificou-se que a concentração de tripsina aumentou com o decorrer do tempo, tendo uma pequena queda no final dos 60 minutos. Evidenciou-se um pico no início devido ao acúmulo de proteína na interface das fases, seguido de uma transferência menor de proteína para a fase PEG.



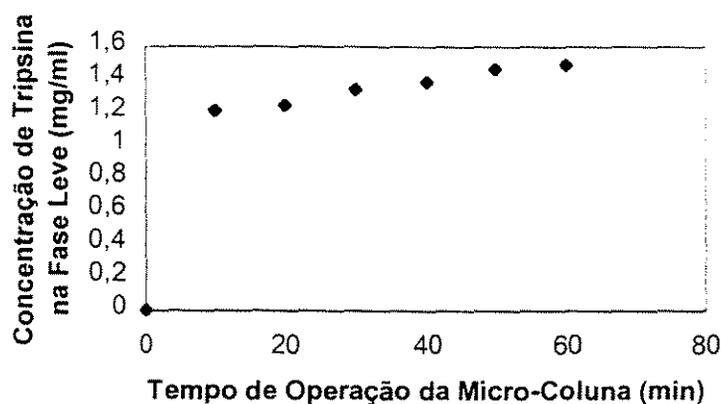
**Figura 5.13** - Gráfico da Concentração de Tripsina x Tempo de Operação para o ensaio 2.

Evidenciou-se no gráfico anterior, que a concentração da tripsina na fase leve aumentou com o decorrer do tempo. Devido ao maior tempo de contato entre as fases, foi possível obter uma maior transferência de proteína para fase PEG.



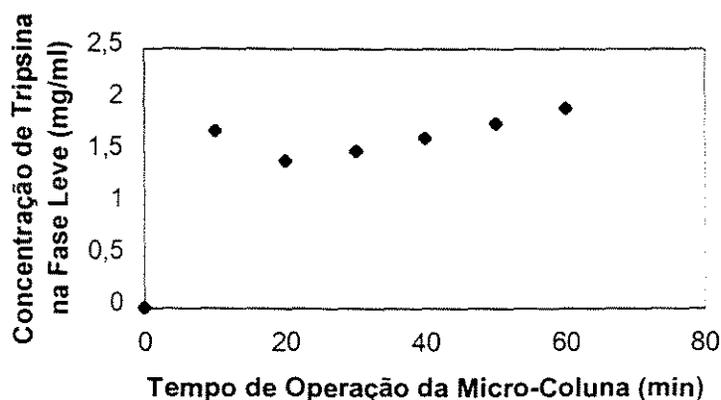
**Figura 5.14** - Gráfico da Concentração de Tripsina x Tempo de Operação para o ensaio 3.

Observou-se uma queda na concentração de tripsina nos primeiros 30 minutos de operação da coluna, em seguida a concentração voltou a aumentar até o final da operação. A transferência de proteína para fase PEG pode ter sido influenciada pela redução na razão da vazão de alimentação da fase leve sobre a fase pesada.



**Figura 5.15** - Gráfico da Concentração de Tripsina x Tempo de Operação para o ensaio 4.

De acordo com os resultados apresentados no gráfico acima, evidenciou-se uma estabilização na concentração de tripsina na fase leve. Neste ensaio utilizou-se a maior vazão de alimentação da fase leve e a maior frequência de pulsação. O que contribuiu para uma concentração estável durante a operação da coluna.



**Figura 5.16** - Gráfico da Concentração de Tripsina x Tempo de Operação para o ensaio 5.

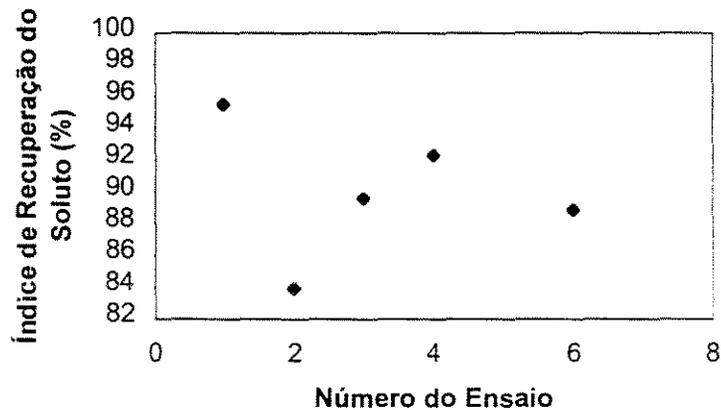
Verificou-se uma queda da concentração de tripsina nos primeiros 20 minutos e em seguida o mesmo voltou a apresentar um crescimento. Isso pode ter

vido gerado pelo aumento na vazão de alimentação da fase pesada em relação à fase leve e simultaneamente o uso da maior frequência de pulsação.

#### 5.2.4) Cálculo do Índice de Recuperação do Solute para os Ensaio Realizados

Os dados referentes ao Índice de Recuperação do Solute foram calculados a partir dos valores médios das concentrações de Tripsina nos ensaios realizados na micro-coluna.

O comportamento do Índice de Recuperação do Solute, em relação aos ensaios realizados pode ser observada na figura 5.17.



**Figura 5.17** – Gráfico do Índice de Recuperação do Solute em relação aos ensaios realizados na micro-coluna.

Evidenciou-se no gráfico acima que o melhor índice de recuperação do soluto foi realizado no ensaio 1. Isto pode ser explicado pela mesma vazão utilizada na alimentação de entrada da fase leve e da fase pesada, simultaneamente utilizou-se a frequência intermediária de pulsação para o ensaio. Com estas

condições de operação houve uma maior interação entre as fases possibilitando um melhor índice de recuperação.

### 5.3)Planejamento Fatorial

#### 5.3.1)Resultado dos Efeitos

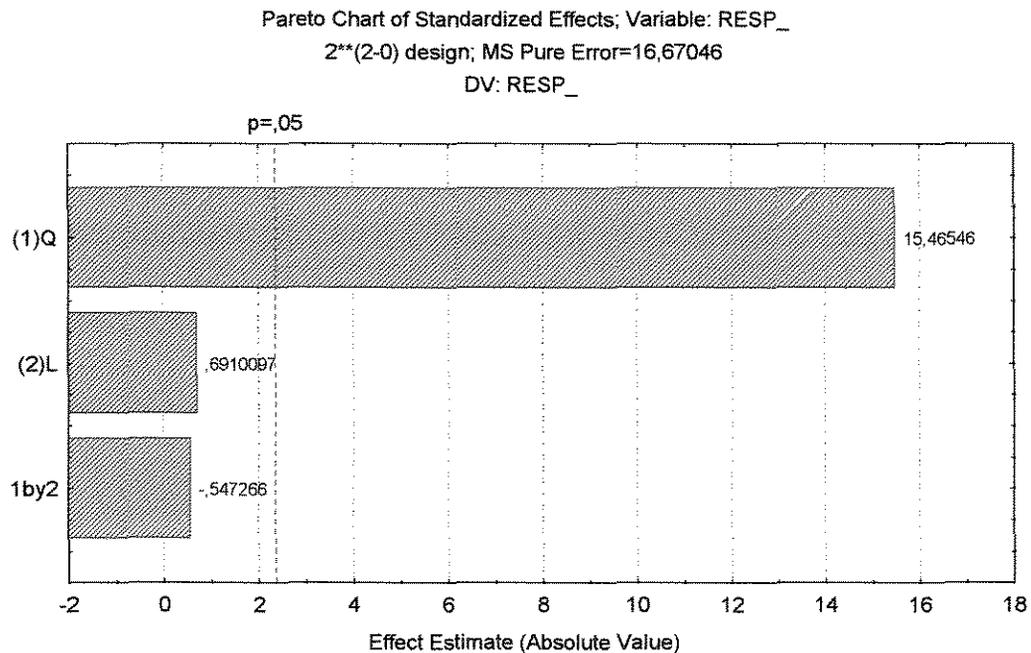
A tabela 5.11 reúne os resultados dos cálculos dos efeitos para a resposta extração. Observando essa tabela verifica-se que alguns efeitos são mais significativos do que os outros. O valor que parece ser mais significativo é do efeito Q. As demais interações parecem ser de menor importância.

**Tabela 5.11** – Efeito calculados para o planejamento fatorial  $2^2$  com a resposta extração.

Média:	66,87
Efeitos principais:	
Q (razão da vazão de alimentação)	42,22
L (frequência de pulsação)	4,43
Interação de dois fatores:	
QL	0,87

Uma maneira de visualizar se os efeitos são significativos é por meio do gráfico Pareto de Efeitos, mostrado na figura 5.18. Esse gráfico parece confirmar as conclusões feitas acima, pois, fora o efeito Q, as demais interações ficam abaixo no nível de confiança de 95% ( $p=0,05$ ) de significância. As variáveis L e QL tiveram um efeito estimado em 0,69 e  $-0,57$  respectivamente, ficando abaixo de 2,1, para serem consideradas significativas com  $p=0,05$  (95% de confiança). O que

indica que fazem parte de uma população normal de média zero, isto é, pontos sem significado físico. Essa análise foi feita utilizando-se o programa STATISTICA®.



**Figura 5.18** – Gráfico Pareto de Efeitos

Uma maneira de decidir se os efeitos calculados são significativamente diferentes de zero é o emprego de um teste t, aplicado na suposição de que os erros se distribuem normalmente. Neste teste, determinam-se intervalos de confiança tendo o valor zero como ponto central:

$$0 \pm t_n \times \text{erro padrão do efeito},$$

onde  $t_n$  é o valor de t para n graus de liberdade, que se refere ao número de graus de liberdade em que a estimativa do erro padrão está baseada.

Como as observações individuais no planejamento fatorial foram realizadas em duplicatas, a estimativa combinada da variância de uma observação individual de  $s^2$  (desvio padrão), para um conjunto de N ensaios duplicados é dada por:

$$s^2 = \sum_i d_i^2 / 2N = 51,53 / 4 \times 2 = 6,44 \quad (5.1)$$

onde  $d_i$  é a diferença entre os valores do par numérico.

Em um planejamento fatorial  $2^2$  cada efeito é uma combinação linear de dezesseis valores, com coeficientes  $\pm 1/4$ . Admitindo-se que esses valores sejam independentes, uma vez que as repetições foram idênticas e realizadas de forma aleatória, pode-se utilizar a Equação 5.1 para obter uma estimativa da variância do efeito (Barros Netos, 1995):

$$\sigma_y^2 = \sum_i a_i^2 \sigma_i^2, \quad (5.2)$$

onde  $\sigma_i^2$  e  $\sigma_y^2$  são a variância populacional da variável aleatória  $x_i$  e a variância populacional da combinação linear, respectivamente, e  $a_i$  são os coeficientes de valor  $\pm 1/4$ .

Como a variância de uma observação individual é estimada em 6,44, a variância média de duas observações será  $6,44/2=3,22$ . Usando-se a estimativa de  $s^2=6,44$  no lugar de  $\sigma_i^2$  e aplicando-se a equação 5.2, a variância  $\hat{V}$  de um efeito pode ser estimada por:

$$\hat{V} = (1/16 + \dots + 1/16) \times 3,22 = (4/16) \times 3,22 = 0,805 \quad (5.3)$$

O erro padrão de um efeito é a raiz quadrada desse valor, que é 0,897.

No nível de confiança de 95% o valor de t que corresponde a 4 graus de liberdade é 2,776. Pode ser considerado estatisticamente significativo o efeito cujo valor absoluto exceder

$$0 \pm 2,776 \times 0,897 = 2,49$$

Aplicando-se o teste t aos valores da tabela 5.11 observa-se que é significativo apenas o efeito principal Q, cujo valor é superior ao valor de 2,49. Já a interação L possui um valor pouco acima do valor limite e não havia sido considerado significativo no gráfico Pareto.

Observa-se, na Tabela 5.11 que o efeito de Q é positivo. Isto significa que, ao aumentar-se a razão da vazão de alimentação ocorrerá um aumento na extração da proteína Tripsina.

O Q (razão da vazão de alimentação) apresentou maior influência sobre o processo devido ao maior valor absoluto do efeito.

### **5.3.2) Modelo Empírico**

No capítulo 2, o item 2.6.4 descreve a metodologia para determinar o modelo linear simplificado à partir do planejamento fatorial.

No item 5.2.1 foi identificado como significativo o efeito Q e ajustadas as respostas do planejamento fatorial a um modelo linear considerado satisfatório contendo esses termos e representado pela equação

$$\hat{y} = b_0 + b_1Q + b_2L + b_{12}QL \quad (5.4)$$

onde os termos  $b_i$  são os coeficientes da reta de regressão e os termos  $x_i$  são os fatores codificados.

Ao serem incluídos novos experimentos ao modelo, com faixas de variação intermediárias dos fatores, deve-se verificar se o modelo proposto anteriormente continua válido. Isto é feito por meio da análise de variância, que permite a avaliação dos resíduos deixados pelo modelo.

A Tabela 5.12 apresenta a análise da variância para o modelo linear. Essa análise foi feita utilizando-se o programa STATISTICA®.

**Tabela 5.12** – Análise da variância para ajuste do modelo linear

Fonte de variação	Soma Quadrática	Nº de Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	3987,24	1	3987,24	500,9
Resíduos	7,96	1	7,96	
Falta de Ajuste	262,55	1	262,55	2,25
Erro Puro	116,69	7	116,69	
Total	3995,2	10		
% de Variância Explicada (R <sup>2</sup> )= 91,34				

Para testar se a equação de regressão é estatisticamente significativa compara-se o valor calculado da razão  $MQ_R/MQ_r$  com o valor tabelado de  $F_{p,q}$ , no nível de confiança desejado, onde  $p$  e  $q$  são o número de graus de liberdade de  $MQ_R$  e  $MQ_r$ , respectivamente. A aplicação do teste  $F$  não pode ser feita, quando o modelo apresenta falta de ajuste.

A razão  $MQ_{faj}/MQ_{cp}$  para o modelo em estudo tem o valor de 2,25. Comparado com o valor de  $F_{1,7} = 5,59$ . Verifica-se que o modelo proposto não apresenta falta de ajuste.

O valor de  $MQ_R/MQ_r$  é 500,9. Quando comparado com  $F_{1,1} = 161,4$ , esse valor indica que o modelo é altamente significativo no nível de confiança de 95%.

Aplicando-se  $t$  para a determinação de intervalos de confiança para os coeficientes da equação 5.4 verifica-se que os coeficientes  $b_2$  e  $b_{12}$  não são estatisticamente significativos. Como mostra a tabela 5.13, os limites superior e inferior dos intervalos de confiança dos coeficientes  $b_2$  e  $b_{12}$  têm sinais contrários, indicando que o zero está incluído nos intervalos. Como todos os valores dentro de um intervalo de confiança têm a mesma probabilidade de ocorrer, os coeficientes  $b_2$  e  $b_{12}$ , podem ter o valor zero.

**Tabela 5.13** – Intervalos de confiança (95%) para os coeficientes da equação 5.4

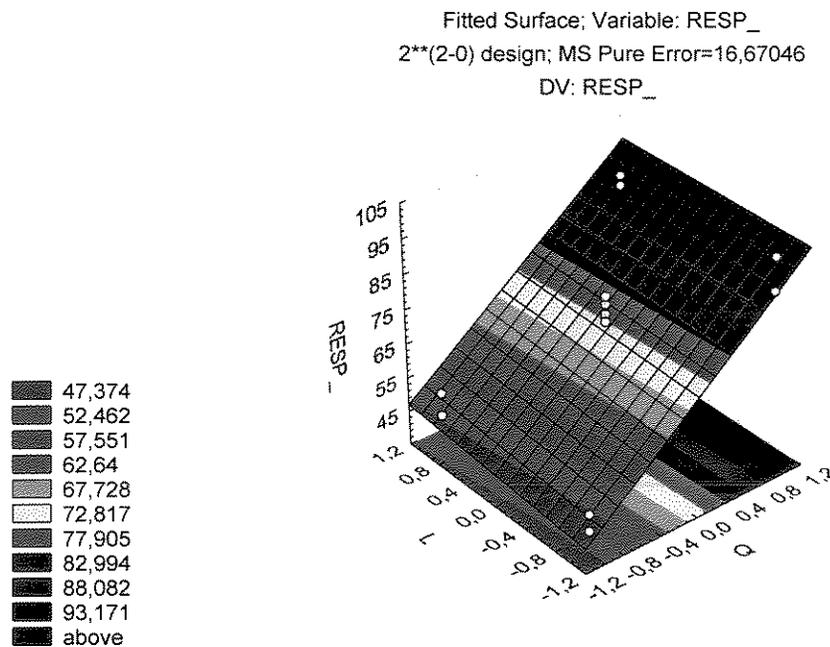
Variável	Coefficiente	Erro Padrão	Limite Inferior	Limite Superior
Média Global	71,41	1,178645	68,62295	74,19705
Q	22,325	1,44354	18,91157	25,73843
L	0,9975	1,44354	-2,415929	4,410929
QL	-0,79	1,44354	-4,203429	2,623429

Retirando-se os termos  $b_{2.L}$  e  $b_{12.QL}$  da equação 5.4 o modelo empírico fica:

$$E = 71,41 + 22.325. Q \quad (5.5)$$

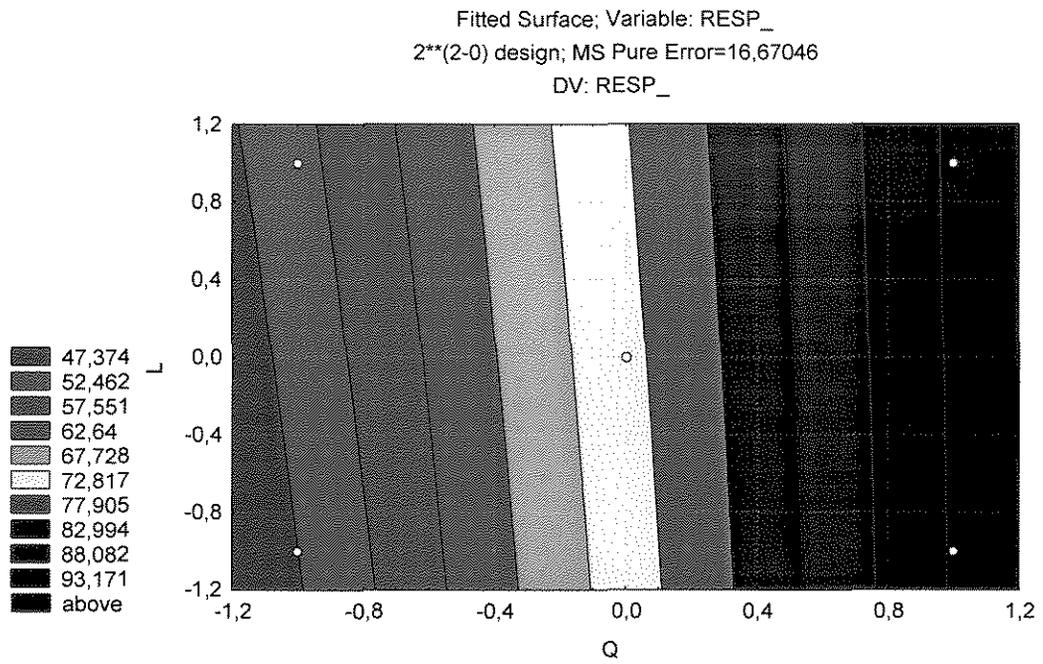
### 5.3.3) Análise da Superfície de Resposta para o Sistema

Utilizando o programa STATISTICA®, com os dados da tabela 5.10 determinou-se os gráficos da Superfície de Resposta do Sistema e suas Curvas de Nível. Os resultados estão representados nas figuras 5.19 e 5.20.



**Figura 5.19** – Superfície de Resposta do Sistema

No gráfico acima observa-se que com o aumento da razão da vazão de alimentação ( $Q$ ) resulta em uma melhor extração. Isso demonstra que o sistema sofre uma grande influência na transferência de massa pela relação das vazões da fase leve e pesada. Com relação à frequência de pulsação, ficou evidente pelo gráfico que sua influencia foi pequena na transferência de massa.



**Figura 5.20** – Curva de Nível da Superfície de Resposta

Pelo gráfico 5.20 notou-se a grande variação de extração da proteína nos três níveis de Q, enquanto que L teve uma mínima variação de transferência de massa.

1

## **Capítulo 6**

### **Conclusões e Sugestões**

## 6 – CONCLUSÕES

Os estudos desenvolvidos neste trabalho mostram que:

- A extração em tubos de ensaio (batelada) para a extração da Tripsina são influenciados pelo peso molecular do PEG, pelo pH e pela concentração do Sal e PEG.

- Os resultados obtidos no sistema bifásico numa micro-coluna pulsante mostrou-se bastante adequado, obtendo-se uma extração de 90,63%.

- A frequência de pulsação teve pouca influência na extração contínua da Tripsina.

- Um alto índice de extração de Tripsina foi provocado pela razão entre vazões da fase leve e pesada, o que mostrou ser uma variável de grande importância nos ensaios.

- Os resultados do hold-up (em torno de 90% de extração) indicaram um elevado índice de extração para uma alta fração de retenção da fase dispersa.

- A aplicação de métodos estatísticos para o estudo do sistema é adequada, a modelagem apresentou uma boa correlação.

- O equipamento mostrou ser de fácil operação e sem apresentar problemas durante os ensaios. O que torna viável para utilização em processos industriais.

## 6.1 – Sugestões

Como propostas para dar continuidade ou complementar este estudo, pode-se citar:

- Obtenção de uma modelagem matemática da coluna, para promover o scale-up do processo.
- Uma análise da influência da temperatura, visando refinar esta informação no impacto na transferência de massa.
- Utilizar outros tipos de sistemas de duas fases aquosas, como por exemplo: PEG-Dextrana, PEG –Glucose, etc.
- Utilizar o sistema para a extração de outros tipos de proteínas, como por exemplo: tirosina, leucina, valina, etc.
- Utilizar uma bomba de maior vazão, para a realização de ensaios em outros níveis de razão entre a vazões das fases.

## **Capítulo 7**

### **Referências Bibliográficas**

## 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTSSON, P. A. *Partition of Cell Particles and Macromolecules*. Wiley-Interscience, New York, 2<sup>a</sup> ed., 1971.

ALBERTSSON, P. A. *Partition of Cell Particles and Macromolecules*. Wiley-Interscience, New York, 1986.

ALBERTSSON, P. A., CARJARVILLE, A., BROOKS, D. E., TJERNELD, F. *Partition of Proteins in Aqueous Two-Phase System and the Effect of Molecular Weight of the Polymer*. Biochin. Biophys. Acta, 926, 87-93, 1987.

ALBERTSSON, P. A., JOHANSSON, G., TJENELD, F. *Aqueous Two-Phase Separation*. In: *Separation Process in Biotechnology*. Juan A. Asenjo (ed), Marcel Dekker, New York, cap. 10, 287-326, 1990.

ASENJO, J. A., FRANCO, T. T.; ANDREWS, A. T., ANDREWS, B. A. In: *Biological for Recombinant Microorganisms and Animal Cells*. New strategies in Production and Recovery. Eds. M. White, S. Veuvény and Shafferman. VCH Publisher, 1990.

ATHA, D. H.; INGHAM, K. C. *Mechanism of Precipitation of Proteins by Polyethylene Glycols*. Analysis in Terms of Excluded Volum. The Journal of Biological Chemistry, 256 (23), 12108-12117, 1981.

BAIRD, M. H. I.; LANE, S. J. *Drop Size and Holdup in a Reciprocating Plate Extraction Column*. Chem. Eng. Sci., 28, 947-957, 1973.

BAIRD, M. H. I.; LANE, S. J. *Drop Size and Holdup in a Reciprocating Plate Extraction Column*. Can. J. Chem. Eng., 62, 218-227, 1984.

BAMBERGER, S.; SEAMAN, G. V. F.; BROWN, J. A.; BROOKS, D. E. *The Partition of Sodium Phosphate and Sodium Chloride in Aqueous Dextran-Polyethyleneglycol Two Phase System*. J. Coll. And Interf. Sci., 99 (1), 187-193, 1984.

BAMBERGER, S.; BROOKS, D.; SHARP, K.; VAN ALSTINE, J.; WEBBER, T. *Preparation of Phase Systems and Measurement of Their Physicochemical Properties*. In: Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems: Theory, Methods, Uses and Applications to Biotechnology. eds Walter, H.; Brooks, D. E.; Fisher, D.; Academic Press, NY, 85-130, 1985.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. *Planejamento e Otimização de Experimentos*. Editora da UNICAMP, 2<sup>a</sup> ed., Campinas, SP, 1996.

BASKIR, J. N.; HATTON, T. A.; SUTTER, V. W. *Thermodynamics of the Separation of Biomaterials in Two-Phase System: Effect of the Phase Forming Polymer*. Macromolecules, 20, 1300-1311, 1987.

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

BEIJERICK, M. W. Zbl. Bakt., 2, 627-689, 1896.

BELVAL, S.; BRETON, B.; HUDDLESTON, J.; LYDDIATT, A. *Influence of Temperature upon Protein Partitioning in Poly(ethylene glycol) – Salt aqueous*

*Two-Phase Systems Close to the Critical Point With Some Observations Relevant to the Partitioning of Particles.* Journal of Chromatography B, 711, 19-29, 1998.

BROOKS, D.; SHARP, K.; FISHER, D. *Theoretical Aspects of Partitioning.* In: *Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems.* Eds, H. Walter, D. E. Brooks, D. Fisher, academic Press, Orlando, PL, 1985.

BURKHART, L. *A Survey of Simulation Methods for Modelling Pulsed Sieve-Plate Extraction Columns, 1979.* In: Kumar, A. e Hartland S. Chem. Eng. Proc., 23, 41-59, 1988.

CABEZAS, H.; EVANS, J.; SZLAG, D. *Statistical Thermodynamics of Aqueous Two-Phase Systems.* In: *Downstream Processing and Bioseparation – Recovery and Purification on Biological Products.* Ads. Hamel, J.; Hunter, J.; Sikdar, S.; ACS Symposium Series, 38-52, 1990.

CABEZAS, H. JR; KABIRI-BADR, M. *Thermodynamis of Aqueous Mixtures of Salts and Polymers.* In: *Frontiers in Bioprocessing II.* Eds. S. Siledar, P. Todd, M. Bier. ACS Boobs, Washington, 1991.

CABRAL, J. M. S.; AIRES-BARROS, M. R. *Liquid-Liquid Extraction of Biomolecules Using Aqueous Two-Phase Systems.* In: *Recovery Process for Biological Materials.* John Wiley & Sons Ltd (eds), New York, 273-301, 1993.

CARLSON, A. *Factors Influencing the Use of Aqueous Two-Phase Partition for Protein Purification,* Sep. sci. Technol., 23 (8 e 9), 785-817, 1988.

CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; AIRES-BARROS, M. R.; TAMBOURGI, E. B.; CABRAL, J. M. S. *Recovery of Recombinant Cutinase With Reversed Micelles*

*in a Continuous Perforated Rotating Disc Contactor*, Biotechnol. Tech., 8, 413-418, 1994.

CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G. *Separação e Purificação de uma Cutinase Recombinante Utilizando Sistemas Micelares*. Tese de Doutorado em Biotecnologia, Instituto Superior Técnico, Lisboa-Portugal, 1995.

CARVALHO JR, L. B.; LIMA, C. J.; MADEIROS, P. H. *Phytochemistry*, 22(10), 2423,1891.

CASCONE, O.; ANDREWS, B. A.; ASENJO, J. A. *Partitioning and Purification of Thaumatin in Aqueous Two-Phase System*, Enzyme Microb. Technol., 13, 629-635, 1991.

CASSIANO, D. A. *Otimização da Separação de Tripsina em Sistemas de Micelas Reversas através de Análise por Superfície de Resposta*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1999. Tese (Mestrado).

CHIANG, H. L.; WANG, S. S. *Extractive Partition of L-aspartase and Fumarase from E. coli Using Aqueous Polyethylene Glycol Ammonium Sulphate Systems*, Biotech. Techniques, 2 (4), 283-288, 1988.

CLIFT, R.; GRACE, J. R.; WEBER, M. E., *Bubbles Drops and Particles*. New York, Academic Press, 1978.

COIMBRA, J. S. R. *Desempenho de um Extrator Tipo Graesser na Separação de Proteínas do Soro de Queijo Usando Sistemas aquosos Bifásicos*. Campinas, tese de Doutorado da Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1995.

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

COLEB, J. *In: Recent Advances in Liquid-Liquid Extraction*. New York. Hanson, C. Pergamon Press, 1971.

COULSON, J. M.; RICHARDSON, J. F. *Tecnologia Química*. v. 1. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1974.

DANCKWERTS, P. V. *Significance of Liquid Film Coefficients in Gas Absorption*, *Ind. Eng. Chem.*, 43, 1460, 1951.

DELL, F. R.; PRATT, H. R. C. *Liquid-Liquid Extraction: Part I – Flooding Rates for Packed Columns*, *Trans. Inst. Chem. Eng.*, 29, 89-109, 1951.

DIAMONT, A. D.; HSU, J. T. *aqueous Two-Phase Systems for Biomolecule Separation*. In: *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology, Managing* (ed), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 47, 90-134, 1992.

DUARTE, M. M. L.; MALMARY, G.; MOLINIER, J. *Estudo Hidrodinâmico em uma Coluna Pulsada de Discos e Coroas*. In: *Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Revista Brasileira de Engenharia*, 9 (1), 109-118, 1992.

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

EITEMAN, M. A.; GAINER, J. L. *The effect of Free-Volume Changes on Partitioning in Magnesium Sulfate-Poly (ethylene glycol) Aqueous Two-Phase Systems*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 992, 125-127, 1989.

EITEMAN, M. A.; GAINER, J. L. *Peptide Hydrophobicity and Partitioning in Polyethylene Glycol – Magnesium Sulfate Aqueous Two-Phase Systems*, *Biotechnology Process*, 6, 479-484, 1990.

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

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

FRANCO, T. T. *Use of Modified Proteins in Aqueous Two-Phase Systems. Effect of Surface Hydrophobicity and Change*. Faculty of Agriculture and Food, University of Reading, 1992. Tese (Doutorado)

GÓIS, L. M. N. *Estudo e Desenvolvimento de um Extrator de Pratos Perfurados Pulsantes*. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas–São Paulo, 1995. Tese (Doutorado).

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

GRICO, A. *L'Extraction par Solvent au Moyen de Columns Pulsantes, 1995*. In: Kumar a., Hartland, S. *Chem. Eng. Proc.*, 23, 41-59, 1998.

GRIFFITH, W. L. *The Extraction of Cobalt from Nickel in a Pulse Column, 1952.*

In: Kumar A., Hartland, S. *Chem. Eng. Proc.*, 23, 41-59, 1988.

GROSSMAN, P. D.; GAINER, J. L. *Correlation of Aqueous Two-Phase Partitioning of Proteins With Changes in Free Volume*, *Biotechnol. Process*, 4, 6-11, 1998.

GROSSMAN, C.; ZHU, J.; MAURER, G. *Phase Equilibrium on aqueous Two-Phase Systems Containing Aminoacids and Peptides*, *Fluid Phase Equilibria*, 82, 275-282, 1993.

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

HAFEZ, M. M.; BAIRD, M. H. I. *Power Consumption in a Reciprocating Plate Extraction Column*, *Trans. Inst. Chem. Eng.*, 56, 229-238, 1978.

HANSON C. *Solvent Extraction ...*, *Chemical Engineering*, August 26, 77-98, 1968 a.

HANSON C. *Recent Research in Solvent Extraction*, *Chemical Engineering*, September 9, 153-142, 1968 b.

HANSON, C. *Recent Advances in Liquid-Liquid Extraction*. New York. Pergamon Press, 1971.

HARRIS, J. M. *Poly(ethylene glycol) Chemistry – Biotechnical and Biomedical Applications*. Plenum Press, NY, 1992.

HAYNES, C. A.; BEYNON, R. V.; KING, R. S.; BLANCH, H.; PRAUSNITZ, J. M. *Thermodynamic Properties of Aqueous Polymer Solutions: Polyethylene glycol/Dextran*, *Phys. Chem.*, 93, 5612-5617, 1989.

HEYBERGER, A. *Holdup and Flooding in a Vibrating Plate Extractor*, *Col. Cze. Chem. Com.*, 48, 989-1000, 1983.

HUDDLESTON, J. G.; OTTOMAR, K. W.; NGONYANI, D. M.; LYDDIATT, A. *Influence of System and Molecular Parameters upon Fractionation of Intracellular Proteins from Saccharomyces by Aqueous Two-Phase Partition*, *Enzyme Microb. Technol.*, 13, 24-32, 1991.

HUMPHREY, J. L.; ROCHA, J. A.; FAIR, J. R. *The Essentials of Extraction*, *Chemical Engineering*, September 17, 76-95, 1984.

HUSTEDT, K. H.; KRONER, W.; STACH, W.; KULA, M. R. *Procedure for the Simultaneous Large Scale Isolation of Pullulanase and 1,4- $\alpha$ -glucan phosphorylase from Klebsiella pneumoniae Involving Liquid-Liquid Separations*, *Biotech. Bioeng.*, 20, 1989-2005, 1978.

HUSTEDT, H.; KRONER, K. H.; SCHÜTTE, H.; KULA, M. R. *Extractive Purification of Intracellular Enzymes*, *Enzyme Technol.*, Rotherburg Ferment. Symp., 3<sup>a</sup> ed., 135-145, 1983.

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

ISHII, M.; ZUBER, N., 1979. In: Heyberger, A. *Col. Cze. Chem.*, 48, 989-1000, 1983.

JAFARAD, K. R.; SAWANT, S. B.; JOSHI, J. B.; SIDKAR, S. K. *Enzyme and Protein Mass Transfer Coefficient in Aqueous Two-Phase System. I- Spray Extraction Columns*, *Chem. Eng. Sci.*, 47, 57-68, 1992 a.

JEALOUS, A. C.; JOHNSON, H. F. *Power Requirements for Pulse Generation in Pulse Columns*, *Ind. Eng. Chem.*, 47, 1159-1166, 1955. In: Kumar, A.; Hartland, S., *A unified correlation for the prediction of dispersed-phase hold-up in liquid-liquid extraction columns*, *Ind. Eng. Hem. Res.*, 34, 3925-3940, 1995.

JOHANSSON, G. *Determination of Ionic Charge by Liquid-Liquid Partition*, *J. Chromatography*, 32, 425-432, 1985.

JOSHI, J. B. *Gas Dispersion in Bubble Columns*, *Chem. Eng. J.*, 24, 213-216, 1982.

KANG, C. H.; DANDLER, S. I., *A Thermodynamic Model for Two-Phase Aqueous Polymer Systems*, *Biotechnol. Bioeng.*, 32, 1158-1164, 1988.

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

- KENKARE, P. U.; HALL, C. K. *Modeling of Phase Separation in PEG-Salt Aqueous Two-Phase Systems*; AIChE Journal, 42 (12), 3508-3522, 1996.
- KHEMANGKORN, V.; MOLINIER, J.; ANGELINO, H. *Influence of Mass Transfer Direction on Efficiency of a Pulsed Perforated Plate Column*, Chemical Engineering Science, 33, 501-508, 1978.
- KIM, C. Y.; BREWER, J. W.; BROTHERS, C. E.; FARVER, T. F.; LEE, E. K. *Recovery of Extracellular Enzyme from fermentation Broth by Aqueous Phase Systems*, 3<sup>o</sup> Chem Congress of North America, 1988.
- KING, R.; BLANCH, H. W.; PRAUSNITZ, J. M. *Molecular Thermodynamics of Aqueous Two-Phase Systems for the Phase Separations*, AIChE J., 34, 1585-1594, 1988.
- KULA, M. R. *Extraction and Purification of Enzymes Using Aqueous Two-Phase Systems*. In: Applied Biochemistry and Bioengineering, 2, 71-95, eds. Wingard Jr, L. B. E., Katchalski-Kotzin and L. Goldstein, academic Press, New York, 1979.
- KULA, M. R. *Purification of Enzymes by Liquid-Liquid Extraction*. In: Advances in Biochemical Bioengineering, A. Fiechter (ed), Springer-Verlag, New York, 1982.
- KULA, M. R. Comprehensive Biotechnology, C. L. Cooney, A. E. Humphey (eds), 2, 451-471, Pergamon Press, New York, 1985.
- KUMAR, A.; HARTLAND, S. *Correlations for Dispersed Phase Holdup in Pulsed Sieve-Plate Liquid-Liquid Extraction Columns*, Chem. Eng. Res. Des., 61, 248-250, 1983.

- KUMAR, A.; HARTLAND, S. *Prediction of Dispersed Phase Holdup in Pulsed Perforated Extraction Columns*, Chem. Eng. Proc., 23, 51-59, 1988.
- LADDHA, G. T.; DEGALEESAN, T. E. *Transport Phenomena in Liquid Extraction*, Tata McGraw, New Delhi, 1976. In: Kumar, A.; Hartland, S., A Unified Correlation for the Prediction of Dispersed-Phase Hold-up in Liquid-Liquid Extraction Columns, Ind. Eng. Chem. Res., 34, 3925-3940, 1995.
- LAMARCA, C.; LENHOFF, A. M.; DHURJATI, P. *Partitioning of Host and Recombinant Cells in Aqueous Two-Phase Polymer Systems*, Biotech. Bioeng., 36, 484-492, 1990.
- LO, T. C.; BAIRD, M. H. I. In: Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, v. 9, 3<sup>a</sup> ed., New York, John Wiley, 1980.
- LO, T. CV.; BAIRD, M. H. I.; HANSON, C. *Handbook of Solvent Extraction*. John Wiley & Sons, 1982.
- LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. *Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent*, J. Biol. Chem., 193, 265-275, 1951.
- MARQUARDT, D. W. *Na Algorithm for Least-Squares Estimation of Nonlinear Parameters*, J. Soc. Ind. Appl. Math., 11, 431-441, 1963. In: Kumar, A.; hartland, S., A Unified Correlation for the Prediction of Dispersed-Phase Hold-Up in Liquid-Liquid Extraction Columns, Ind. Eng. Chem. Res., 34, 3925-3940, 1995.

MISHIMA, K.; MATSUYAMA, K.; EZAWA, M.; TARUTA, Y.; TAKARABE, S.; NAGATANI, M. *Interfacial Tension of Aqueous Two-Phase Systems Containing Poly(ethylene glycol) and Dipotassium Hydrogenphosphate*, Journal of Chromatography B, 711, 313-318, 1998.

MISTRY, S. L.; ASENJO, J. A.; ZAROR, C. A. *Mathematical Modelling and Simulation of Aqueous Two-Phase Continuous Protein Extraction*, Bioseparation, 1992.

MIYANAMI, K. *Drop Size Distribution and Holdup in Multistage Vibrating Disk Column*, Chem. Eng. Sci., 30, 1415-1420, 1975.

MIYAUCHI, T.; OYA, H. *Longitudinal Dispersion in Pulsed Perforated Plate Columns*, AIChE J., 11 (3), 395-4023, 1965.

MORO, J. R. *Extração de Tripsina numa Micro-Coluna Agitada por Campânulas Pulsadas*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1999. Tese (Mestrado).

MURPHREE, E., V. *Rectifying Column Calculations-with Particular Reference to N Component Mixtures*, Industrial and Engineering Chemistry, 17 (7), 747-750, 1925.

MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; MAYES, P. A.; RODWELL, P. A. Harper: Bioquímica. Atheneu Editora, São Paulo, 1994.

NEVES, C. F. C. *Desenvolvimento de uma Instalação de Separação de Gases por Adsorção e Modelagem de Processo*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas

OSGSTON, A. G.; PHELPS, C. F. *Biochem. .*, 78, 827-833, 1960. In: Eiteman, M. A.; Gainer, J. L., *Biochim. Biophys. Acta*, 992, 125-127, 1989.

PAPAMICHAEL, N.; BOERNER, B.; Hustedt, H. *Continuous Aqueous Phase Extraction of Proteins: Automated On-line Monitoring of Fumarase Activity and Protein Concentration*, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 50, 457-467, 1991.

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

PAWAR, P. A.; VEERA PARASU, U.; SAWANT, S. B.; JOSHI, J. B. *Enzyme Mass Transfer Coefficient in Aqueous Two-Phase System Using a Packed Extraction Column*, *Can. J. Chem. Eng.*, 69, 548-556, 1991.

PIRES, M. J.; PRAZERES, D. M. F.; CABRAL, J. M. S. *Protein Assay in Reversed Micelle Solutions*, *Biotechnol. Tech.*, 7, 293-294, 1993.

PORTO, A. L. F. *Extração Líquido-Líquido de Proteínas Utilizando Sistemas de Duas Fases Aquosas em Coluna de Discos Perfurados Rotativos*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1998. Tese (Doutorado).

RABELO, A. P. B. *Estudo da Eficiência de Separação numa Coluna de Extração Líquido-Líquido Mecanicamente Agitada por Palhetas Rotativas*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1995. Tese (Mestrado).

RABELO, A. P. B. *Estudo e Desenvolvimento de uma Micro-Coluna de Campânulas Pulsantes para Purificação de Proteínas*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1999. Tese (Doutorado).

SASSI, A. P.; BLANCH, H. W.; PRAUSNITZ, J. M. *Phase Equilibria for aqueous Protein/Polyelectrolyte Gel Systems*, AIChE Journal, 42 (8), 2335-2353, 1996.

SAWANT, S. B.; SIKDAR, S. K.; JOSHI, J. B. *Hydrodynamics and Mass Transfer in Two-Phase Aqueous Extraction Using Spray Column*, Biotechnol. Bioeng., 36, 109-115, 1990.

SEBASTIÃO, M. J.; CABRAL, J. M. S.; AIRES-BARROS, M. R. *Partitioning of Recombinant *Fusarium solani* pisi cutinase in Polyethylene Glycol – Aqueous Salt Solution Two-Phase Systems*, Journal of Chromatography A, 668, 139-144, 1994.

SMOOT, L. D.; BABB, A. L. *Mass Transfer Studies in a Pulsed Extraction Column*, I & EC Fundamentals, 1 (2), 93-103, 1962.

THORNTON *Liquid-Liquid Extraction Part XIII – The Effect of Wave Form and Plate Geometry on the Performance and Throughput of a Pulsed Column*, Trans. Inst. Chem. Eng., 35, p. 316, 1957.

TOOR, H. L.; MARCHELLS, J. M. *Film Penetration Model for mass and Heat Transfer*, Am. Inst. Chem. Eng. J., 4, p. 97, 1958.

- TREYBAL, R. E. *Mass Transfer Operations*, 2<sup>a</sup> ed., McGraw-Hill. New York, 1968.
- VAN BERLO, M.; LUYBEN, K.; VAN DER WIELEN, L. A. M. *Poly (ethylene glycol)-Salt Aqueous Two-Phase Systems with Easily Recyclable Volatile Salts*, *Journal of Chromatography B*, 711 (1-2), 61-68, 1998.
- VEIDE, A. SMEDS, A. L.; ENFORS, S. O. *A Process for Large-Scale Isolation of  $\beta$ -galactosidase from Escherichia coli in an Aqueous Two-Phase Systems*, *Biotechnol. Bioeng.*, 25, 1789-1800, 1983.
- VENÂNCIO, A.; TEIXEIRA, J. A. *Protein Mass Transfer Studies on Spray Column Using the PEG-Reppal PES 100 Aqueous Two-Phase Systems*, *Bioprocess Engineering*, 13, 251-255, 1995.
- VERNAU, J.; KULA, M. R. *Extraction of Proteins from Biological Raw Material Using Aqueous Polyethylene Glycol-Citrate Phase Systems*, *Biotechnol. App. Biochem.*, 12, 397-404, 1990.
- WHITMAN, W. G. *The Two-Film Theory of Absorption*, *Chem. and met. Eng.*, 29, p. 147, 1923.
- WIJFFELS, J. B.; RIETEMA, K. *Flow Patterns and Axial Mixing in Liquid-Liquid Spray Columns*, *Trans. Inst. Chem. Eng.*, 50, 224-239, 1972.
- ZASLAVSKY, B. Y.; BORVSKAYA, A. A.; GUALEVA, N., D.; MIHEEVA, L. M. *Physico-Chemical Features of Solvent Media in the Phases of Aqueous Polymer two-Phase Systems*, *Biotech. Bioeng.*, 40, 1-7, 1992.