

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

**ESTUDO E DESENVOLVIMENTO DE UMA MICRO-
COLUNA DE CAMPÂNULAS PULSANTES PARA A
PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS**

AUTORA : ANA PAULA BRESCANCINI RABELO

ORIENTADOR : PROF. DR. ELIAS BASILE TAMBOURGI

CO-ORIENTADOR : PROF. DR. ROBERTO RODRIGUES DE SOUZA

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

AGOSTO / 1999
CAMPINAS - SÃO PAULO



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
V.	Es.
TAMBO BC/	40258
PREÇO	278/00
	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
	R\$ 11,00
	01/02/00
N.º CPD	

CM-00134430-5

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

R112e Rabelo, Ana Paula Brescancini
Estudo e desenvolvimento de uma micro-coluna de
campânulas pulsantes para a purificação de proteínas /
Ana Paula Brescancini Rabelo.--Campinas, SP: [s.n.],
1999.

Orientadores: Elias Basile Tambourgi, Roberto
Rodrigues de Souza.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Extração por solventes. 2. Massa - Transferência.
3. Extração - Equipamento. 4. Proteínas - Separação. I.
Tambourgi, Elias Basile. II. Souza, Roberto Rodrigues
de. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Engenharia Química. IV. Título.

Tese de Doutoramento defendida e aprovada em 24 de agosto de 1999 pela Banca
Examinadora constituída pelos Professores Doutores :



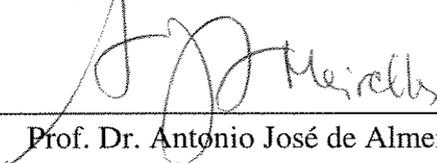
Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi



Profª Drª Jane Sélia dos Reis Coimbra



Profª Drª Maria Elizabeth Brotto



Prof. Dr. Antonio José de Almeida Meirelles



Profª Drª Elizabeth Jordão

Este exemplar corresponde à redação final da Tese de Doutorado em Engenharia Química defendida por Ana Paula Brescancini Rabelo e aprovada pela Comissão Julgadora em 24 de agosto de 1999.



Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi

Aos meus pais Frederico Rabelo e Ione Brescancini Rabelo

À minha irmã Viviane Brescancini Rabelo

*Aos meus avós Bracial Brescancini (in memoriam) e
Ida Zandona Brescancini*

AGRADECIMENTOS

A Deus

Ao professor Elias Basile Tambourgi, pela orientação, incentivo, amizade e confiança que estiveram sempre presentes durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Roberto Rodrigues de Souza pela orientação e amizade, que foram muito importantes durante a execução deste trabalho.

Aos amigos do laboratório de processos de separações Douglas, Joseane, Arlan, Dorival, Sérgio e Eliana pelo companheirismo, dedicação, amizade e colaboração na execução deste trabalho.

Aos alunos Dinis, Johannes, Fabíola, Anelise, Rafael, Mônica e Mônica Bim pelo incentivo e colaboração nos trabalhos experimentais.

Ao professor João Alexandre Ferreira da Rocha Pereira pela ajuda no desenvolvimento do equipamento experimental e pelo interesse e incentivo sempre demonstrados durante a realização deste trabalho.

À professora Telma Teixeira Franco e ao professor Pedro Volpe pela disponibilidade, atenção, ajuda e valiosas colaborações.

À professora Ana Lúcia Figueiredo Porto, cuja ajuda e valiosas colaborações foram fundamentais para a realização deste trabalho. Agradeço a disponibilidade, dedicação e boa vontade que sempre foram a mim dispensados.

À Rosa, ao técnico Sandro Piola, e às analistas de sistemas Andreia e Joseane, pela colaboração, boa vontade e paciência a mim dispensados.

Aos professores e funcionários da Faculdade de Engenharia Química pelo apoio e amizade dispensados durante a realização deste trabalho.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

A todos os amigos da Pós-Graduação e que compartilharam este período junto a mim, pelos momentos de companheirismo, amizade, apoio e estímulo.

À minha família pelo incentivo, apoio, amizade, interesse e paciência que foram a mim dispensados.

A todos os amigos que direta ou indiretamente colaboraram na realização deste trabalho.

*“Talvez não tenhamos conseguido
fazer o melhor, mas lutamos para que
o melhor fosse feito ...
Não somos o que deveríamos ser,
Não somos o que iremos ser,
mas, graças a Deus,
Não somos o que éramos ”*

Martin Luter King

RESUMO

A viabilidade da produção e comercialização de biomateriais está relacionada aos custos do produto final. A etapa de separação e purificação (“downstream processing”) é a principal responsável pelos altos custos de produção dos biomateriais. Assim, é evidente a necessidade do desenvolvimento de novos processos de separação que sejam economicamente mais interessantes. A partição em sistemas aquosos bifásicos é uma alternativa aos processos de separação existentes, que vem sendo muito estudada nos últimos anos. Sistemas aquosos bifásicos formam um meio adequado à preservação das propriedades dos biomateriais e permitem a utilização de equipamentos de extração líquido-líquido que operam em contínuo.

Neste trabalho, foi desenvolvida uma micro-coluna agitada por campânulas pulsantes. Este sistema de agitação promove um eficiente contato entre as fases, aumenta o tempo de contato entre elas e também evita a desnaturação de enzimas e proteínas. Os estudos foram realizados com sistemas de duas fases aquosas formados por PEG (polietileno glicol) e sal (fosfato de potássio mono e bibásico). As proteínas usadas foram o citocromo b5, em pH 7,3 e a enzima ascorbato oxidase, em pH 6,0, a partir de seus extratos brutos. Realizou-se o estudo da extração em descontínuo, a fim de encontrar-se as concentrações de equilíbrio e o melhor sistema 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.

Verificou-se que a micro-coluna desenvolvida teve operação estável e que altas eficiências foram alcançadas. Os parâmetros estudados no equipamento foram a frequência de pulsação e a vazão total das fases que entram na coluna. Nas melhores condições de operação, que foram alta frequência de pulsação (1 pulso/segundo) e baixa vazão total das fases (cerca de 4,7 mL/min), chegou-se a obter eficiências de aproximadamente 100%. Os valores da fração de retenção da fase dispersa variaram entre 0,09 e 0,425. As condições de inundação não foram atingidas. Assim, o principal objetivo deste trabalho, que era o desenvolvimento de uma coluna de extração que aumentasse o tempo de contato entre as fases e a obtenção de altas taxas de transferência de massa, sem desnaturar as enzimas e proteínas, foi alcançado com sucesso.

ABSTRACT

Viability of biomaterials production and commercialization depends on product costs. Biomaterials separation and purification steps, from the fermentation broth (downstream processing) is the main factor that contributes to high production costs of these products. So, it's clear the need of developing new separation processes that are economically more interesting. Partition in aqueous two-phase systems is an alternative for the separation processes, that has been studied extensively on late years. In aqueous two-phase systems, the high water content makes it an environment adequate for preservation of biomaterials properties. Other favorable factor is the possibility of using liquid-liquid extraction equipments that operate continuously.

In this work, it was developed a micro-column agitated by pulsed caps. This agitation system promotes an efficient contact between the phases in the column and also avoids enzyme denaturation and the loss of main proteins properties. It had been analysed the influence of various operational and solutions parameters in the system behaviour. The aqueous two-phase systems studied were formed by PEG (polyethylene glycol) and salts (Potassium Phosphate monobasic and dibasic). Proteins used were cytochrome b5, at pH 7,3 and the enzyme ascorbic oxidoreductase, at pH 6,0, from their extract. It was done batch 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.

It was observed that the micro-column developed in this work had a stable operation and that high efficiencies values were reached. Parameters studied in the equipment were pulse frequency and overall flowrate. At better operational conditions, that were high pulse frequency (1 pulse/second) and low overall flowrate (approximately 4,7 mL/min), it could be obtained separation efficiencies close to 100%. Hold up values varied between 0,09 and 0,425. Flooding conditions were not reached. So, the main objective of this work, that was the development of an extraction column that rises the contact time between the phases and the mass transfer rates, avoiding the proteins and enzymes denaturation, was sucessfully get.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	ix
NOMENCLATURA	xi
ABREVIATURAS	xv
CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 2 - REVISÃO DA LITERATURA E FUNDAMENTOS TEÓRICOS	9
2.1. INTRODUÇÃO.....	11
2.2. PROTEÍNAS	11
2.2.1. Desnaturação das Proteínas	13
2.2.2. Proteínas de Estudo	14
2.2.2.1. Citocromo b5	14
2.2.2.2. Ascorbato Oxidase	14
2.3. ETAPAS DE SEPARAÇÃO EM PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS	15
2.4. EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO	16
2.4.1. Conceitos Básicos	18
2.4.2. Equipamentos usados nos Processos de Extração	20
2.4.3. Colunas Pulsadas	24
2.5. TRANSFERÊNCIA DE MASSA EM UM PROCESSO DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO.....	26
2.5.1. Princípios da Transferência de Massa	27
2.5.2. O Coeficiente de Transferência de Massa.....	28
2.5.3. Eficiência de Extração	31
2.5.4. Características da Transferência de Massa em Processos de Extração Líquido-Líquido.....	32
2.6. FRAÇÃO DE RETENÇÃO DA FASE DISPERSA (“HOLDUP”).....	33
2.6.1. As Regiões de Operação	34
2.6.2. Definição e Equações de Predição da Fração de Retenção da Fase Dispersa	35
2.6.3. Velocidade Relativa e Velocidade Característica	40
2.6.4. Análise da Literatura sobre a Fração de Retenção da Fase Dispersa	41
2.7. SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS	45
2.7.1. Tipos de Sistemas de Duas Fases Aquosas.....	48
2.7.2. Polietileno glicol.....	49
2.7.3. Características dos Sistemas de Duas Fases Aquosas	50
2.7.4. Diagramas de Fases.....	52
2.7.5. Sistemas PEG/Sal	54
2.7.6. Recuperação de Sais e Polímeros	55
2.7.7. Partição de Proteínas em Sistemas de Duas Fases Aquosas	56
2.7.7.1. Modelos para a Partição de Proteínas entre as Fases	59
2.7.7.1.1. Teoria de Brønsted	59
2.7.7.1.2. Modelo de Albertsson	60

2.7.7.1.3. Teorias Termodinâmicas.....	61
2.7.8. Extração em Sistemas de Duas Fases Aquosas.....	63
2.7.8.1. Extração Contínua com Sistemas de Duas Fases Aquosas.....	66
2.7.9. Métodos de Isolamento das Proteínas a partir das Fases rica em PEG e rica em sal.....	70
CAPÍTULO 3 - EQUIPAMENTO E PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	71
3.1. INTRODUÇÃO.....	73
3.2. CAMPÂNULAS.....	73
3.3. DESCRIÇÃO DO EQUIPAMENTO	74
3.4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL - OPERAÇÃO DA MICRO-COLUNA.....	77
3.4.1. Procedimento Experimental para a obtenção da Fração de Retenção da Fase Dispersa	80
3.4.2. Procedimento Experimental usado no estudo da Transferência de Massa	81
3.4.2.1. Citocromo b5	81
3.4.2.2. Ascorbato Oxidase	82
3.5. VARIÁVEIS ESTUDADAS.....	82
CAPÍTULO 4 - MATERIAIS E MÉTODOS	85
4.1. INTRODUÇÃO.....	87
4.2. PREPARAÇÃO DOS SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS.....	87
4.2.1. Processos de Extração em Descontínuo.....	87
4.2.2. Processos de Extração em Contínuo.....	88
4.3. PROCEDIMENTO PARA OS EXPERIMENTOS DE PARTIÇÃO EM SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS (EXTRAÇÃO EM DESCONTÍNUO).....	89
4.4. MÉTODOS ANALÍTICOS.....	90
4.4.1. Determinação da Concentração de Citocromo b5	90
4.4.2. Determinação de Proteína Total - Método de Lowry Modificado	90
4.4.3. Determinação da Atividade da Ascorbato Oxidase	92
4.4.4. Tampão Citrato - pH 6,0	92
4.4.5. Produção de Citocromo b5	93
4.4.6. Produção de Ascorbato Oxidase	94
4.5. MATERIAIS	94
4.5.1. Proteínas	94
4.5.1.1. Citocromo b5.....	94
4.5.1.2. Ascorbato Oxidase.....	94
4.5.1.3. Albumina de Soro Bovino	94
4.5.2. Outros Reagentes	95
4.5.2.1. Polímeros.....	95
4.5.2.2. Sais	95
4.5.2.3. Produção de Citocromo b5	95
4.5.2.4. Extração de Ascorbato Oxidase.....	95
4.5.2.5. Determinação de Proteínas - Método de Lowry Modificado.....	95
4.5.2.6. Determinação da Atividade de Ascorbato Oxidase	96
4.6. CÁLCULOS.....	96
4.6.1. Determinação da Fração de Retenção da Fase Dispersa.....	96
4.6.2. Determinação do Coeficiente de Partição das Proteínas (K).....	96
4.6.3. Determinação do Coeficiente de Transferência de Massa (k_a).....	97
4.6.4. Determinação do Fator de Purificação (FP).....	97
4.6.5. Cálculo da Eficiência de Extração e do Índice de Recuperação do Solutu.....	98

4.6.6. Massa Específica e Viscosidade dos Sistemas PEG/Sal.....	99
CAPÍTULO 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	101
5.1. INTRODUÇÃO.....	103
5.2. EXTRAÇÃO EM DESCONTÍNUO (PARTIÇÃO DE PROTEÍNAS)	104
5.2.1. Extração de Citocromo b5	104
5.2.1.1. Influência da Massa Molecular do PEG no Coeficiente de Partição	106
5.2.1.2. Influência do Comprimento da Linha de Amarração no Coeficiente de Partição	109
5.2.1.3. Escolha do Sistema para a Extração Contínua na Micro-Coluna de Campânulas Pulsantes	111
5.2.1.4. Estudo da Partição em Sistemas de Duas Fases Aquosas usando PEG 1500.....	113
5.2.2. Extração de Ascorbato Oxidase	116
5.3. EXTRAÇÃO CONTÍNUA NA MICRO-COLUNA DE CAMPÂNULAS PULSANTES	121
5.3.1. Hidrodinâmica.....	121
5.3.1.1. Fração de Retenção da Fase Dispersa	122
5.3.1.1.1. Influência da Frequência de Pulsação	122
5.3.1.1.2. Influência da Vazão Total das Fases	128
5.3.1.1.3. Influência da Composição do Sistema de Duas Fases Aquosas	130
5.3.1.1.4. Predição da Fração de Retenção da Fase Dispersa através de Correlações obtidas na Literatura.....	132
5.3.1.2. Velocidade Característica	134
5.3.1.3. Inundação	142
5.3.2. Transferência de Massa.....	144
5.3.2.1. Extração Contínua de Citocromo b5 na Micro-Coluna de Campânulas Pulsantes	146
5.3.2.1.1. Influência da Frequência de Pulsação no Índice de Recuperação do Solute.....	150
5.3.2.1.2. Influência da Vazão Total das Fases no Índice de Recuperação do Solute.....	152
5.3.2.1.3. Influência da Frequência de Pulsação na Eficiência de Separação	154
5.3.2.1.4. Influência da Vazão Total das Fases na Eficiência de Separação	158
5.3.2.1.5. Influência da Frequência de Pulsação no Coeficiente de Transferência de Massa	159
5.3.2.1.6. Influência da Vazão Total das Fases no Coeficiente de Transferência de Massa	161
5.3.2.1.7. Extração de Citocromo b5 em Sistemas de Duas Fases Aquosas formados com PEG 1500	162
5.3.3. Extração de Ascorbato Oxidase	166
5.4. APLICAÇÃO DA METODOLOGIA DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA A ANÁLISE DOS EFEITOS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS.....	170
5.4.1. Fração de Retenção da Fase Dispersa	171
5.4.2. Índice de Recuperação do Solute	174
5.4.3. Eficiência de Separação.....	176
5.4.4. Coeficiente de Transferência de Massa	178
CAPÍTULO 6 - CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	181
6.1. CONCLUSÕES.....	183
6.2. SUGESTÕES.....	185
CAPÍTULO 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	187

APÊNDICES	205
APÊNDICE 1 - CALIBRAÇÕES.....	207
APÊNDICE 2 - RESULTADOS EXPERIMENTAIS OBTIDOS NO ESTADO ESTACIONARIO.....	211
ANEXOS	215
ANEXO 1 - BALANÇO DE MASSA	217
ANEXO 2 - PROPRIEDADES FÍSICAS DE SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS PEG/SAL.....	221
ANEXO 3 - DADOS REFERENTES À PREDIÇÃO DA FRAÇÃO DE RETENÇÃO DA FASE DISPERSA.....	225

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1 - Zimogênio da pepsina A, proteína globular	13
FIGURA 2.2 - Esquema de um sistema de contato e separação em estágios (misturadores-decantadores).....	21
FIGURA 2.3 - Esquema de colunas recheada (a) e “spray” (b).....	23
FIGURA 2.4 - Esquema de colunas de fluxo pulsado (a) e de pratos pulsados (b)	24
FIGURA 2.5 - Diagrama de fases do sistema PEG 4000 - Fosfatos de potássio, a 20°C e pH 7,0 (adaptado de Albertsson, 1986).....	53
FIGURA 3.1 - Agitação através de campânulas pulsantes numa coluna de extração líquido-líquido pulsada	74
FIGURA 3.2 - Esquema da micro-coluna de campânulas pulsantes	75
FIGURA 3.3 - Campânulas soldadas à haste, formando o dispositivo de agitação da micro-coluna	76
FIGURA 3.4 - Micro-coluna de campânulas pulsantes.....	77
FIGURA 3.5 - Montagem Experimental.....	79
FIGURA 5.1 - Comportamento da partição de citocromo b5 em sistemas de duas fases aquosas - PEG/Fosfatos de Potássio, em pH 7,3, na extração descontínua.....	107
FIGURA 5.2 - Comportamento do coeficiente de partição de citocromo b5 com a variação da linha de amarração do sistema PEG 1500/Fosfatos de Potássio, em pH 7,3, na extração descontínua	114
FIGURA 5.3 - Influência do comprimento da linha de amarração no Fator de Purificação para a extração descontínua de citocromo b5 com sistema PEG 1500/Fosfato de potássio, em pH 7,3	115
FIGURA 5.4 - Influência do comprimento da linha de amarração no coeficiente de partição da enzima ascorbato oxidase em sistemas PEG 1500/Fosfatos de potássio, em pH 6,0, na extração descontínua	118
FIGURA 5.5 - Influência do comprimento da linha de amarração no Fator de Purificação para a extração descontínua de ascorbato oxidase com sistemas PEG1500/Fosfato de potássio, em pH 6,0	119

- FIGURA 5.6 - Influência da vazão total das fases na fração de retenção da fase dispersa, para o sistema PEG 1000/Fosfato de potássio, em pH 7,3, com a linha de amarração 2 (17,7% de PEG e 15,7% de sal) 125**
- FIGURA 5.7 - Comportamento do sistema PEG 1000/Fosfato de potássio, em pH 7,3 e linha de amarração 2 (17,7% PEG e 15,7% sal), em relação à fração de retenção da fase dispersa nas condições experimentais estudadas..... 130**
- FIGURA 5.8 - Influência da composição do sistema PEG 1000/Fosfatos de potássio, em pH 7,3, na fração de retenção da fase dispersa. Vazão total das fases - 6,5 mL/min e frequência de pulsação - 0,1 pulsos/segundo 131**
- FIGURA 5.9 - Influência da frequência de pulsação e da vazão total das fases na velocidade característica calculada pela equação proposta por Gayler et al (1953)... 137**
- FIGURA 5.10 - Influência da frequência de pulsação na velocidade característica calculada pela equação proposta por Baird e Shen (1984), para o sistema PEG 1000/Fosfato de potássio, em pH 7,3 e com a linha de amarração 2 (17,7% de PEG e 15,7% de sal) 138**
- FIGURA 5.11 - Regressão linear dos resultados obtidos nos experimentos sendo X e Y obtidos pela equação proposta por Gayler et al (1953), para o sistema PEG 1000/Fosfato de potássio, em pH 7,3 e com a linha de amarração 2 (17,7% de PEG e 15,7% de sal) 140**
- FIGURA 5.12 - Regressão linear dos resultados obtidos nos experimentos sendo X e Y obtidos pela equação proposta por Baird e Shen (1984), para o sistema PEG 1000/Fosfato de potássio, em pH 7,3 e com a linha de amarração 2 (17,7% de PEG e 15,7% de sal) 141**
- FIGURA 5.13 - Comportamento da extração de citocromo b5 nas fases rica em PEG 1000 e rica em sal durante o tempo de operação da micro-coluna. Condições de operação usadas: vazão total das fases - 4,7 mL/min e frequência de pulsação - 0,14 pulsos/segundo 147**
- FIGURA 5.14 - Comportamento da extração de citocromo b5 nas fases rica em PEG 1000 e rica em sal durante o tempo de operação da micro-coluna. Condições de operação usadas: vazão total das fases - 4,7 mL/min e frequência de pulsação - 0,2 pulsos/segundo 148**
- FIGURA 5.15 - Comportamento da extração de citocromo b5 nas fases rica em PEG 1000 e rica em sal durante o tempo de operação da micro-coluna. Condições de operação usadas: vazão total das fases - 4,7 mL/min e frequência de pulsação - 1 pulso/segundo..... 149**
- FIGURA 5.16 - Influência da frequência de pulsação e da vazão total das fases no Índice de Recuperação do Soluta, no estado estacionário..... 150**

FIGURA 5.17 - Influência da frequência de pulsação e da vazão total das fases na Eficiência de Separação, no estado estacionário.....	157
FIGURA 5.18 - Influência da frequência de pulsação e da vazão total das fases no Coeficiente de Transferência de Massa, no estado estacionário.....	160
FIGURA 5.19 - Comportamento da extração de citocromo b5 a partir do seu extrato bruto, durante o tempo de operação da micro-coluna. Condições de operação empregadas: frequência de pulsação - 1 pulso/segundo e vazão total das fases - 5,2 mL/min	164
FIGURA 5.20 - Comportamento da extração de ascorbato oxidase a partir do seu extrato bruto, durante o tempo de operação da micro-coluna. Condições de operação empregadas: frequência de pulsação - 1 pulso/segundo e vazão total das fases - 5,2 mL/min	167
FIGURA 5.21 - Comportamento da extração de proteína total a partir do extrato bruto da ascorbato oxidase, durante o tempo de operação da micro-coluna. Condições de operação empregadas: frequência de pulsação - 1 pulso/segundo e vazão total das fases - 5,2 mL/min	168
FIGURA 5.22 - Comportamento da fração de retenção da fase dispersa para sistemas de duas fases aquosas PEG 1000/Fosfatos de potássio, em pH 7,3, em relação às variáveis: frequência de pulsação e vazão total das fases.....	174
FIGURA 5.23 - Comportamento do Índice de Recuperação do Solute na extração contínua de citocromo b5 com sistemas de duas fases aquosas PEG 1000/Fosfatos de potássio, em pH 7,3, em relação às variáveis: frequência de pulsação e vazão total das fases	176
FIGURA 5.24 - Comportamento da Eficiência de Separação na extração contínua de citocromo b5 com sistemas de duas fases aquosas PEG 1000/Fosfatos de potássio, em pH 7,3, em relação às variáveis: frequência de pulsação e vazão total das fases.....	177
FIGURA 5.25 - Comportamento do Coeficiente de Transferência de Massa na extração contínua de citocromo b5 com sistemas de duas fases aquosas PEG 1000/Fosfatos de potássio, em pH 7,3, em relação às variáveis: frequência de pulsação e vazão total das fases	179
FIGURA AP1 - Curva de calibração do espectrofotômetro para a medida da concentração de proteína através do método de Lowry modificado (Pires et al, 1993)	210

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1 - Comparação de correlações para a predição da fração de retenção da fase dispersa e da velocidade relativa em colunas de pratos perfurados pulsados	40
TABELA 2.2 - Exemplos de sistemas de duas fases aquosas (Albertsson, 1986).....	43
TABELA 2.3 - Exemplos de purificação de proteínas em larga escala por passos subsequentes de extração (Departamento de Tecnologia enzimática do GBF)	65
TABELA 3.1 - Variáveis estudadas neste trabalho relativas à operação da micro-coluna	83
TABELA 4.1 - pH das soluções de sais fosfatos de razões [(mol/L)/(mol/L)], sal 1 : monobásico; sal 2 : bibásico	87
TABELA 4.2 - Composição dos sistemas de duas fases aquosas PEG/Fosfatos de potássio usados na extração de proteínas.....	88
TABELA 5.1 - Recuperação de citocromo b5 e proteína total em sistemas PEG 1500/Fosfatos de potássio, na extração descontínua	116
TABELA 5.2 - Recuperação de ascorbato oxidase e proteína total em sistemas PEG 1500/Fosfatos de Potássio.....	120
TABELA 5.3 - Comparação entre os valores da fração de retenção da fase dispersa preditos com os obtidos experimentalmente para o sistema PEG 1000/Fosfato de potássio, em pH 7,3, com a linha de amarração 2 (17,7% de PEG e 15,7% de sal) ...	133
TABELA 5.4 - Velocidades característica calculadas pelas equações 2.19 e 2.20, para o sistema PEG 1000/Fosfato de potássio, em pH 7,3, com a linha de amarração 2 (17,7% de PEG e 15,7% de sal).....	135
TABELA 5.5 - Cálculo da velocidade característica média	142
TABELA 5.6 - Variação do Índice de Recuperação do Solute com a vazão total das fases	153
TABELA 5.7 - Variação da Eficiência de Separação com a vazão total das fases	155
TABELA 5.8 - Comparação entre a extração contínua e descontínua de citocromo b5.....	165
TABELA 5.9 - Comparação entre a extração contínua e descontínua de ascorbato oxidase	169

TABELA AP2.1 - Resultados experimentais no estado estacionário, obtidos na extração de citocromo b5 com sistemas formados com PEG 1000/Fosfatos de potássio.....213

TABELA A2.1 - Propriedades físicas de sistemas de duas fases aquosas PEG/Fosfatos de potássio (adaptado de Porto, 1998)223

NOMENCLATURA

A - amplitude de pulsação (cm ou m)

(A . f) - velocidade de pulsação (cm/s ou m/s)

C_b - concentração de proteína na fase do fundo (fase pesada) (M/L^3)

C_{ent} - concentração de proteína na corrente de entrada da fase dispersa (M/L^3),
(equação 2.5)

c_f - fração mássica de soluto na alimentação

C_{fc} - valor médio entre a concentração de proteína inicial e final na fase contínua, neste trabalho, é a metade da concentração de proteína na fase rica em sal na saída da coluna (M/L^3), (equação 2.5)

C_i - concentração de proteína na entrada da fase rica em PEG no equipamento (M/L^3)

C_o - concentração de proteína na saída da fase rica em PEG do equipamento (M/L^3)

C_p - concentração de proteína na fase rica em PEG (M/L^3)

c_r - fração mássica de soluto na fase refinado

C_s - concentração de proteína na fase rica em sal (M/L^3)

C_{sai} - concentração de proteína na corrente de saída da fase dispersa (M/L^3), (equação 2.5)

C_t - concentração de proteína na fase do topo (fase leve), (M/L^3)

Da - daltons

dH - altura diferencial da coluna

e - área livre fracional do prato (nas colunas de extração)

E^* - Eficiência de Separação (%)

f - frequência de pulsação (pulsos/segundo)

FP - fator de purificação

g - aceleração da gravidade = $9,81 \text{ m/s}^2$

h - espaçamento entre os pratos (cm ou m)

H - altura da coluna (cm ou m)

H_D - altura da fase contínua na coluna (altura da dispersão), (cm ou m)

I_R - Índice de Recuperação do Solute

K - coeficiente de partição

k_c - coeficiente de transferência de massa parcial da fase contínua ($1/L^2T$)

k_d - coeficiente de transferência de massa parcial da fase dispersa ($1/L^2T$)

K_d - coeficiente de transferência de massa global da fase dispersa ($1/L^2T$)

k_{da} - Coeficiente de Transferência de Massa na fase dispersa (min^{-1})

k_E - coeficiente parcial de transferência de massa na fase extrato ($1/L^2T$)

K_E - coeficiente global de transferência de massa na fase extrato ($1/L^2T$)

K_R - coeficiente global de transferência de massa na fase refinado ($1/L^2T$)

k_R - coeficiente parcial de transferência de massa na fase refinado ($1/L^2T$)

l - altura de um compartimento ou estágio, também chamada comprimento característico (cm ou m)

N - número de experimentos realizados (repetições)

N_B - velocidade molar de difusão por unidade de área

pI - ponto isoelétrico

Q - vazão da fase dispersa que entra na coluna (mL/min), (equação 2.5)

s - desvio padrão

s_{efeito} - desvio padrão dos efeitos (calculados no planejamento fatorial)

V - volume da fase contínua contida no interior da coluna (mL), (equação 2.5)

V_o - velocidade característica (cm/min)

v_c - velocidade de escoamento da fase contínua (cm/min ou m/min)

V_c - vazão da fase contínua (mL/min)

v_d - velocidade de escoamento da fase dispersa (cm/min ou m/min)

V_d - vazão da fase dispersa (mL/min)

V_p - velocidade instantânea de pulsação (cm/min)

V_s - velocidade relativa (cm/min)

x_{exp} - medida experimental

x_i - grandeza medida no experimento i

x_{im} - média entre os resultados obtidos nos experimentos

$x_{predito}$ - valor da grandeza predito pelas equações propostas

y_E - concentração molar de soluto na fase extrato (fração molar)

y_E^* - concentração molar de soluto na fase extrato no equilíbrio (fração molar)

y_{Ei} - concentração molar de soluto da fase extrato na interface (fração molar)

y_f - fração molar de soluto na alimentação

y_R - concentração molar de soluto na fase refinado (fração molar)

y_R^* - concentração molar de soluto na fase refinado no equilíbrio (fração molar)

y_{Ri} - concentração molar de soluto na fase refinado na interface (fração molar)

LETRAS GREGAS

ϕ - fração de retenção da fase dispersa

$\Delta\rho$ - diferença entre as massas específicas das fases rica em PEG e rica em sal (kg/m^3)

ε - dissipação de energia por unidade de massa

ρ_c - massa específica da fase contínua (kg/m^3)

ρ_d - massa específica da fase dispersa (kg/m^3)

μ_c - viscosidade da fase contínua (mPa.s)

μ_d - viscosidade da fase dispersa (mPa.s)

μ_w - viscosidade da água a $20\text{ }^\circ\text{C} = 10^{-3}\text{ Pa.s}$

γ - tensão interfacial (mN/m)

ABREVIATURAS

mmol - milimol (10^{-3} mol)

PEG - polietileno glicol

PRDC - coluna de discos perfurados rotativos

RDC - coluna de discos rotativos

RDCS - coluna de discos rotativos com saia perfurada

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Os significativos avanços tecnológicos na Biotecnologia, especialmente devido a manipulações genéticas de microorganismos, tornam possíveis a produção de proteínas e outros biomateriais de interesse industrial, por meio de processos fermentativos. Porém, a viabilidade de produção e comercialização desses produtos em escala industrial dependem do custo de produção. Assim, o desenvolvimento de métodos de extração e purificação de biomateriais (“downstream processing”) é importante, já que esta é uma etapa limitante nestes processos de produção.

Cerca de 50 % a 90 % do custo de produção de um bioproduto concentra-se na purificação. Portanto, para o processamento em larga escala, é necessário empregar técnicas de bioseparação, que sejam eficientes e econômicas e que atinjam altos graus de recuperação e pureza, preservando a atividade biológica da molécula (Diamond et al., 1992). Algumas características dos biomateriais, como : baixa concentração inicial, o elevado grau de pureza dos produtos, a sensibilidade térmica e a necessidade de preservar as principais propriedades dos compostos, tornam esta etapa complexa e onerosa em relação aos custos globais de produção (Coimbra, 1995).

Os métodos de purificação, comumente utilizados nos processos de recuperação dos produtos obtidos por fermentação, envolvem vários procedimentos. Estes métodos geralmente requerem muito tempo, são onerosos e podem levar a baixos rendimentos de recuperação do produto, principalmente em operações em larga escala. Assim, vêm sendo estudados e desenvolvidos novos processos de purificação, que visam a redução dos custos e do tempo de processo, diminuição do número de etapas necessárias e aumento da eficiência de separação e grau de pureza dos produtos. Entre estes processos está a extração líquido-líquido, que pode ser usada como uma etapa de pré-purificação, substituindo um outro método de separação que seja mais caro ou reduzindo o número de etapas necessárias no processo.

A extração líquido-líquido vem sendo usada há muitos anos como uma importante técnica laboratorial de separação. A sua aplicação, em larga escala, iniciou em meados deste século. A partir de então, teve um grande desenvolvimento na indústria, abrangendo os mais diversos setores, desde a extração de metais nobres até a purificação de antibióticos.

A extração líquido-líquido é uma técnica promissora de extração e purificação que envolve a partição de biomoléculas entre duas ou mais fases imiscíveis ou parcialmente miscíveis. Entretanto, no processamento de biomoléculas, o número de solventes capazes de conjugar solubilidade e estabilidade é muito limitado (Diamond et al, 1992). Isso faz com que outros sistemas líquidos sejam usados na extração líquido-líquido para a separação de biomateriais. Entre esses sistemas estão as soluções de micelas reversas e os sistemas de duas fases aquosas. O uso de solventes orgânicos é, normalmente, limitado pelas características hidrofílicas dos produtos de fermentação. Além disso, os solventes orgânicos são geralmente tóxicos para as proteínas e provocam a desnaturação das mesmas.

Os sistemas de duas fases aquosas, que vêm sendo usados com sucesso, são sistemas de extração constituídos por duas fases aquosas imiscíveis ou parcialmente miscíveis, obtidas pela adição em água 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 em concentrações acima de suas concentrações críticas. Os polímeros podem ser sintéticos, como é o caso do PEG que é um éter polimérico, ou naturais, como é o caso da dextrana que é uma cadeia de açúcar (Coimbra, 1995).

A extração líquido-líquido utilizando sistemas de duas fases aquosas tem sido uma área de grande interesse nos últimos anos. Muitos estudos têm sido desenvolvidos visando a aplicação destes sistemas na separação, em escala laboratorial, de vários biomateriais, como proteínas e organelas celulares, entre outros (Porto, 1998). Os sistemas de duas fases aquosas mais freqüentemente estudados e utilizados na purificação de biomoléculas são os sistemas PEG/Dextrana/Água e PEG/Sal/Água (Diamond et al, 1992). Devido ao alto conteúdo de água presente nestes sistemas, é possível separar e purificar bioprodutos sob condições suaves, em um ambiente adequado à preservação de suas principais propriedades (Kula, 1982; Albertsson, 1986).

Os sistemas de duas fases aquosas podem ser facilmente ampliados da escala de laboratório para a planta piloto. Às vezes, muito pouco tempo é requerido para que a maioria dos sistemas de duas fases aquosas formados por polímero e sais alcance o equilíbrio e o transporte entre as fases é rápido. Além disso, as fases são compatíveis com

muitas proteínas conhecidas. Portanto, o uso de sistemas de duas fases aquosas são uma alternativa extremamente atrativa para a separação e purificação de proteínas, em larga escala.

Segundo Albertsson (1986), vários fatores influenciam a partição de proteínas e o coeficiente de partição. Os principais fatores são : a hidrofobicidade, a carga da proteína, o pH do meio, a distribuição de íons e a carga dos polímeros envolvidos, o tamanho da proteína e do polímero, entre outros. Isto torna estes sistemas bastante versáteis.

Outro fator favorável ao emprego de sistemas de duas fases aquosas em processos de extração líquido-líquido, é a possibilidade de usar-se equipamentos que operam em contínuo. Assim, há a necessidade do estudo da operação e de transferência de massa na extração líquido-líquido aplicada a processos de separação de biomateriais, com a finalidade de projeto ou simplesmente para um melhor entendimento do processo. Contudo, a maioria das pesquisas nesta área concentra-se na determinação do equilíbrio de fases, do coeficiente de partição e na extração em batelada, sendo necessário um maior número de trabalhos visando o estudo de equipamentos de extração que operam em contínuo, aplicados a bioseparações (Coimbra, 1995).

Operações contínuas em extrações líquido-líquido com sistemas convencionais já são bem desenvolvidas. Alguns estudos com duas fases aquosas em colunas de extração já foram realizados. Esta técnica, entre outras vantagens, reduz os custos fixos e variáveis, possibilita a automação do processo, reciclagem contínua dos produtos químicos (Greve e Kula, 1991), diminui o tempo de processamento, já que o sistema alcança o equilíbrio mais rapidamente. A separação das fases é rápida, não sendo necessário usar centrífugas, além da minimização do espaço físico ocupado, já que as unidades não são volumosas (Coimbra, 1995).

Apesar de certas propriedades dos sistemas de duas fases aquosas, tais como a baixa tensão interfacial, pequena diferença entre as densidades e maiores viscosidades, principalmente para sistemas contendo biomassa, o emprego de sistemas de duas fases aquosas para a purificação contínua de proteínas, em diferentes tipos de extratores, já foi demonstrada com sucesso por vários autores como Hustedt et al (1985), Jafarabad et al (1992 a,b), Coimbra (1995), Pawar et al (1997) e Porto (1998), entre outros.

Assim, este trabalho teve como objetivo principal o estudo da extração de proteínas em um equipamento de extração que opera continuamente e com escoamento em contracorrente. Com esta finalidade, desenvolveu-se uma micro-coluna agitada por campânulas pulsantes, visando promover um eficiente contato entre as fases através de uma agitação suave, obter um maior tempo de contato entre as fases no interior da coluna e evitar a desnaturação e perda das principais propriedades das proteínas, devido a agitações muito fortes ou sistemas extratores muito agressivos. Além disso, teve-se como objetivo também, evitar a formação de emulsões estáveis, o que facilmente ocorre em sistemas biológicos e obter uma rápida separação entre as fases. Não há referência na literatura do uso de colunas pulsantes com sistemas de duas fases aquosas, na extração de proteínas ou outros biomateriais, nem no emprego de campânulas como dispositivo que promove a agitação. Este equipamento foi desenvolvido neste trabalho.

Neste estudo é feita a análise da influência de vários parâmetros operacionais e das propriedades físicas das fases sobre a eficiência de extração. Os sistemas de duas fases aquosas empregados foram formados por PEG e sal (fosfato de potássio mono e bibásico). As proteínas usadas nos experimentos foram o citocromo b5 e a ascorbato oxidase obtidas a partir de *Escherichia coli* e *Curcubita maxima*, respectivamente, em seus extratos brutos.

Foram realizados, primeiramente, experimentos em descontínuo (tubos de ensaio), a fim de encontrar as melhores condições de extração, relacionadas ao sistema de duas fases aquosas, como por exemplo, massa molecular e concentrações de PEG e de sal (fosfatos de potássio). A melhor condição, obtida em descontínuo, 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 vazão total das fases que entram na coluna (carga total). Quanto à hidrodinâmica, foram avaliados a fração retida da fase dispersa (“hold up”), a velocidade característica e o ponto de inundação. Quanto à transferência de massa, foram avaliados o Índice de Recuperação do Solute, a Eficiência de Separação e o Coeficiente de Transferência de Massa. Assim, com os dados obtidos, foram encontradas as melhores condições de extração para as faixas de operação estudadas. Foi feita também uma análise da influência de cada parâmetro de

operação e da combinação dos parâmetros nas grandezas relacionadas ao estudo da hidrodinâmica e da transferência de massa.

Objetivos

* Estudar a aplicação da extração líquido-líquido em processos biotecnológicos, visando diminuir o número de etapas e os custos do processo e obter produtos de boa qualidade e alto grau de pureza,

* Desenvolver uma micro-coluna agitada por campânulas pulsantes, que promova uma agitação eficiente, mas suave, para emprego na separação e purificação de biomateriais, como proteínas,

* Analisar a possibilidade de aplicação de sistemas de duas fases aquosas neste equipamento,

* Estudar a transferência de massa através da análise da eficiência de separação, percentagem de proteína transferida e coeficiente de transferência de massa na operação contínua da coluna e coeficiente de partição e fator de purificação em descontínuo,

* Estudar a hidrodinâmica através da análise da fração de retenção da fase dispersa, da velocidade característica e do ponto de inundação,

* Estudar a extração e purificação de extratos brutos, visando o estudo de casos reais,

* Aplicar a metodologia de Planejamento Experimental para avaliar a influência das variáveis do processo de extração contínua no comportamento do sistema escolhido.

CAPÍTULO 2

REVISÃO DA LITERATURA

E

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1. Introdução

Neste capítulo são apresentados uma revisão de literatura sobre os principais tópicos relacionados a este trabalho e os fundamentos teóricos relacionados ao tema estudado. Os assuntos abordados neste capítulo são: proteínas, processos de separação aplicados à biotecnologia, extração líquido-líquido, transferência de massa, fração de retenção da fase dispersa e sistemas de duas fases aquosas.

A micro-coluna com campânulas pulsantes é um equipamento desenvolvido neste trabalho e por isso a revisão sobre equipamentos de extração de operação contínua abrangeu todos os equipamentos usados para extração de proteínas com sistemas de duas fases aquosas. Não foi encontrada nenhuma publicação referente ao uso de colunas pulsadas na extração de biomateriais com sistemas de duas fases aquosas ou outros sistemas.

2.2. Proteínas

As proteínas são macromoléculas cuja estrutura é constituída de polipeptídeos, que são cadeias extremamente longas de muitas unidades de aminoácidos, unidas por ligações peptídicas (Lehninger, 1986). As proteínas não são apenas as macromoléculas mais abundantes, mas também são extremamente versáteis em suas funções. Atualmente, elas são comercialmente muito importantes, principalmente nas indústrias de alimentos e farmacêutica. Todos os vinte aminoácidos encontrados em proteínas têm em comum um grupo carboxila e um grupo amina, ligados ao mesmo átomo de carbono.

A cadeia polipeptídica de diferentes proteínas pode ter um número qualquer de resíduos de aminoácidos, de um mínimo de aproximadamente 100 até um máximo próximo a 1800. O peso molecular das proteínas pode variar de cerca de menos de 12000 Da, para pequenas proteínas, a pesos moleculares maiores que 10^6 Da, no caso de proteínas com cadeias polipeptídicas muito longas ou com várias cadeias polipeptídicas (Lehninger, 1986).

As proteínas podem ter quatro tipos de estruturas. As definições de Murray et al (1994) encontram-se a seguir.

- **Estrutura Primária** - refere-se à sequência dos aminoácidos na cadeia e à localização das pontes dissulfeto, se existirem.

- **Estrutura Secundária** - são as relações no espaço entre os aminoácidos componentes da estrutura primária. Estas estruturas podem ser regulares, por exemplo, α -hélice, ou exibir algumas irregularidades, por exemplo, enovelamento.

- **Estrutura Terciária** - para uma proteína, contendo uma única cadeia polipeptídica, refere-se ao arranjo global e relações entre as várias regiões e aminoácidos individuais. A estrutura terciária considera as relações espaciais entre resíduos de aminoácidos que, geralmente, podem estar distanciados quando considera-se a estrutura primária.

- **Estrutura Quaternária** - as proteínas apresentam a estrutura quaternária quando são constituídas por duas ou mais cadeias polipeptídicas unidas por pontes de hidrogênio e ligações eletrostáticas formadas entre resíduos da superfície das cadeias polipeptídicas.

Pode-se identificar várias classes de proteínas de acordo com as suas funções biológicas (Lehninger, 1986), entre elas estão, por exemplo, as enzimas, que são proteínas com atividade catalítica.

As proteínas também podem ser divididas em duas classes, baseadas em sua forma e certas características físicas, em Proteínas Globulares e Proteínas Fibrosas. Nas proteínas globulares, a cadeia, ou cadeias, polipeptídicas estão enroladas, de modo compacto, em uma forma globular ou esférica. Elas são usualmente solúveis em sistemas aquosos e difundem-se facilmente. Proteínas fibrosas são moléculas insolúveis em água, compridas e filamentosas, que tem a cadeia polipeptídica estendida ao longo de um eixo.

Na figura 2.1, encontra-se uma fotografia obtida através de uma determinação por difração de raios-X, com uma resolução de 1,8 Angstroms, do precursor, zimogênio, da pepsina A, de origem suína. Esta enzima tem estrutura globular de aproximadamente 70 nm.



Figura 2.1 - Zimogênio da pepsina A, proteína globular.

2.2.1. Desnaturação das Proteínas

Além da estrutura primária, termo usado para designar a estrutura covalente das proteínas, as estruturas secundárias, terciárias e quaternárias das proteínas são muito importantes, já que estão relacionadas com sua atividade biológica e, ainda, com a especificidade da espécie à qual pertencem. As mudanças provocadas por agentes agressores em uma proteína são conhecidas como desnaturação. Essas mudanças podem ocorrer em qualquer um dos quatro níveis estruturais e são, geralmente, irreversíveis. Uma importante consequência da desnaturação de uma proteína, é que ela quase sempre perde sua atividade biológica característica.

A desnaturação de proteínas pode ser provocada pelo efeito da temperatura, por valores inadequados de pH, por solventes orgânicos, por solutos como a uréia, pela exposição da proteína a alguns tipos de detergentes, pela agitação extremamente vigorosa da solução protéica, presença de certos íons ou sais caotrópicos na solução que contém as proteínas, oxidação, força iônica, entre outros. A desnaturação pode ocorrer também em condições amenas, não sendo obrigatória a ocorrência de condições extremamente agressivas. Testes mostram que quando as proteínas sofrem desnaturação, não ocorre

necessariamente o rompimento de ligações covalentes da cadeia polipeptídica. Conclui-se que a atividade biológica das proteínas depende de todos os quatro níveis estruturais. As moléculas de proteínas são, portanto, frágeis e facilmente desorganizadas. Na purificação e isolamento das proteínas, precisa-se tratá-las com cuidado, a fim de evitar a desnaturação (Lehninger, 1986).

2.2.2. Proteínas de Estudo

Neste trabalho, são estudadas a partição e a extração, em sistemas de duas fases aquosas, de duas proteínas a partir de seus respectivos extratos brutos. Estas proteínas são: citocromo b5 e ascorbato oxidase, que é uma enzima. Estas proteínas foram escolhidas pela disponibilidade dos seus extratos brutos.

2.2.2.1. Citocromo b5

O citocromo b5 faz parte de um complexo enzimático que catalisa a insaturação de ácidos graxos. Trata-se de uma proteína de membrana constituída por uma única cadeia polipeptídica e cuja estrutura terciária apresenta dois domínios distintos. Um deles, de natureza globular e hidrofílica, contém um grupo heme que está envolvido nas reações de oxi-redução nas reações de insaturação de ácidos graxos. Pelo contrário, o outro possui natureza hidrofóbica e é responsável pela ligação da proteína à membrana do retículo endoplasmático (Porto, 1998).

O domínio hidrofílico do citocromo b5 de rato foi clonado em *Escherichia coli* (TB1) através da síntese de novo do gene e da sua introdução no plasmídeo pUC 13 (von Bodman, 1986), o que permite a sua produção por fermentação, acumulando-se esta no espaço intracelular. A proteína assim obtida possui uma massa molecular de 13600 Da e um ponto isoelétrico de 4,4. Ao longo deste trabalho, o domínio hidrofílico do citocromo b5 de rato é designado apenas por citocromo b5 (Porto, 1998).

2.2.2.2. Ascorbato Oxidase

A ascorbato oxidase é uma cupro-proteína contendo aproximadamente 0,46% de cobre, o que corresponde a 10 átomos de cobre por molécula de enzima. Esta enzima pode

ser extraída da *Curcubita maxima*, conhecida regionalmente como abóbora e possui uma massa molecular de 150000 Da (Sthothkmp e Dalson, 1977).

Uma análise conformacional em tampão fosfato (10 mM e pH 7,6) demonstrou que a enzima existe predominantemente em estado β -conformacional, não sendo encontradas formas helicoidais. A ascorbato oxidase é constituída de duas subunidades idênticas ligadas por duas pontes dissulfeto, cada subunidade tem uma massa molecular de 70000 Da e consiste de duas cadeias polipeptídicas com massas moleculares de aproximadamente 30000 e 40000 Da (Sthothkmp e Dalson, 1977).

O principal interesse no estudo da ascorbato oxidase consiste no fato da enzima exibir alto grau de especificidade para o ácido ascórbico, o que torna bastante atraente sua utilização em sensores analíticos para determinação do teor de ácido ascórbico em sucos de frutas, iogurtes, alimentos em geral e também em fluidos biológicos (Porto, 1998).

2.3. Etapas de Separação em Processos Biotecnológicos

Na obtenção de substâncias através de técnicas biotecnológicas é necessário separar misturas de várias proteínas, além de outros contaminantes. Existem várias técnicas com esta finalidade. Entre elas estão a diálise, a eletroforese, a filtração em gel e cromatografia, entre outros. Alguns fatores que limitam o uso de algumas destas técnicas são os baixos rendimentos, alto custo e dificuldades de utilização em larga escala. Uma sequência geral tradicional para a purificação de proteínas intracelulares é mostrada a seguir (Hustedt et al, 1985):

- Quebra das células
- Remoção dos fragmentos de células :
 - Centrifugação
 - Filtração
- Concentração :
 - Ultrafiltração
 - Tratamentos Térmicos e/ou de pH

- Precipitação por sal, solventes ou polímeros
- Remoção seletiva de ácidos nucleicos e outras frações
- Alta Purificação : • Cromatografias (por exemplo, cromatografia em gel, de troca iônica, de adsorção, de afinidade, por hidrofobicidade)
- Concentração Final

A purificação de proteínas, do ponto de vista técnico, encontra muitas dificuldades e exige um elevado número de etapas. Por exemplo, a remoção dos fragmentos da célula é difícil devido ao pequeno tamanho das partículas e à viscosidade da solução. As etapas de precipitação podem levar a baixos rendimentos e reprodutibilidade limitada. O uso de procedimentos cromatográficos, em muitos casos, é limitado pela escala das operações e pelo custo das resinas (Hustedt et al, 1985). Por isso, a extração líquido-líquido tem despertado o interesse de pesquisadores como mais uma etapa no processo de purificação e separação de proteínas. Deve ser lembrado que a extração líquido-líquido é usada como uma etapa intermediária de separação, que substitui métodos de separação mais caros ou diminui o número de etapas de separação necessárias no processo.

Durante os últimos anos, a purificação e separação de proteínas fundamentadas nos princípios de partição em sistemas de duas fases aquosas têm sido desenvolvidas. Esta técnica de extração parece ser especialmente adequada para as primeiras etapas dos procedimentos de separação, mas pode substituir etapas cromatográficas ou ser aplicada antes da cromatografia (Hustedt et al, 1985).

2.4. 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 do processo 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 na solução, o solvente, no qual o componente a ser extraído da solução, o soluto, é preferencialmente 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 as duas fases e na miscibilidade parcial dos líquidos.

O conhecimento das relações de equilíbrio de fases é fundamental para análises quantitativas de processos 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 empregada 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 desenvolvimento, projeto e aumento de escala dos processos 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 das fases. Esta separação das fases comumente ocorre pelo processo de decantação (Rabelo, 1995).

2.4.1. 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 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 da 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 da 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 “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 o 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 de 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 na 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 a separação das fases. Em geral, quanto menor o tamanho das gotas, mais lenta 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).

2.4.2. 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 são mais rápidos 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 da 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 2.2.

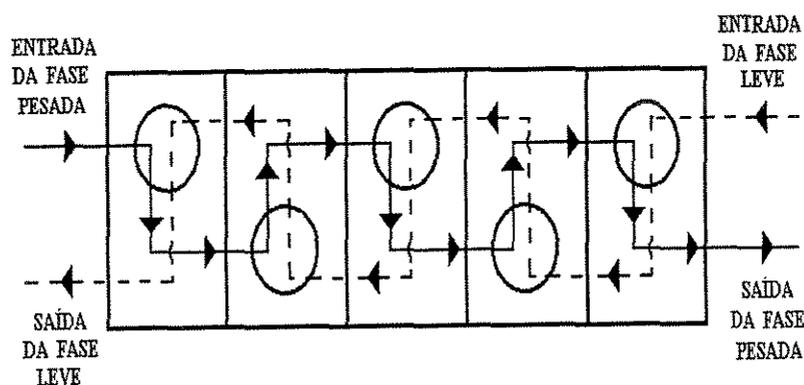


Figura 2.2 - Esquema de um sistema de contato e separação em estágios (misturadores-decantadores).

Nestes equipamentos, obtém-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 pode ainda ser subdividida em outras classes, de acordo com a maneira de promover a mistura 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 2.3 são mostrados os esquemas de colunas recheada e “spray”.

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 dos extratores diferenciais usados na extração líquido-líquido. Eles apresentam baixo custo de instalação e manutenção e ocupam reduzido espaço físico. 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.

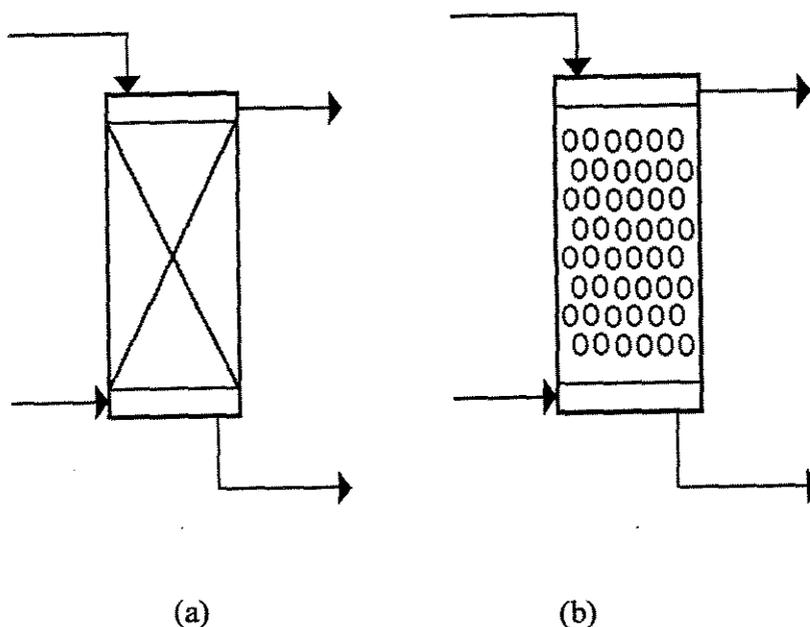


Figura 2.3 - Esquema de colunas recheada (a) e “Spray” (b).

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 através 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 2.4 são mostrados esquemas de colunas pulsadas.

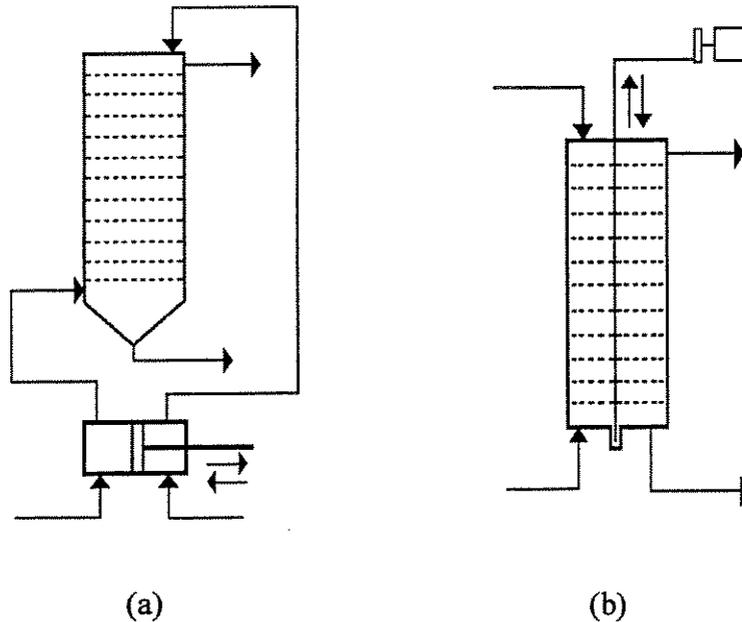


Figura 2.4 - Esquema de colunas de fluxo pulsado (a) e de pratos pulsados (b).

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.

2.4.3. 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 Dijk (1935). Neste trabalho, o autor propôs um novo tipo de equipamento para extração líquido-líquido, com a principal finalidade de se obter o máximo contato entre duas correntes líquidas. O princípio de funcionamento desta coluna consta basicamente do seguinte: as correntes líquidas são introduzidas na coluna em contracorrente, formando porções de cada uma delas nos vários compartimentos da coluna. Assim, em cada estágio (cada seção da coluna formada por um prato) são formadas duas camadas líquidas distintas, a superior de líquido leve (de menor densidade) e a inferior de líquido pesado (de maior densidade). Com o movimento alternativo dos pratos, quando estes se movem para cima, o líquido pesado atravessa os furos dos pratos na forma de jatos, sendo disperso como gotas na camada de líquido leve do estágio anterior. De forma análoga, quando os pratos se movem para baixo, o líquido leve é injetado nos furos do prato superior, se dispersando na camada de líquido pesado.

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

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

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 da 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.

Góis (1995) estudou o desempenho de um extrator de pratos perfurados pulsantes, analisando para isso, a dispersão axial, a retenção da fase dispersa e a transferência de massa. No estudo da transferência de massa, a eficiência de separação definida por Kawase (1990) foi analisada. Estes estudos foram realizados com o sistema ternário: água-ácido acético-butanol. Nestes estudos obteve-se elevados índices de extração (aproximadamente 89%), o que mostrou que este tipo de equipamento é bastante eficiente e opera de modo estável. Foi verificado, em geral, um aumento da eficiência de separação, da fração de retenção da fase dispersa e do número de dispersão com o aumento da agitação na coluna, até certo ponto. Acima de certos limites, o excesso de agitação faz com que essas grandezas diminuam. Isto pode ocorrer pelo arraste de uma das fases e maior facilidade (rapidez) de escoamento das fases na coluna, o que diminui o tempo de contato entre as fases. Valores da fração de retenção da fase dispersa de aproximadamente 0,70 (70%) foram obtidos.

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.

Não foi encontrado nenhum trabalho que apresente o uso de sistemas de duas fases aquosas em colunas pulsadas, nem o uso de colunas pulsadas em processos de extração e purificação de proteínas.

2.5. 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 de 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.

2.5.1. Princípios da Transferência de Massa

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

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. 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 da transferência de massa molecular e os dois outros casos são característicos da transferência de massa convectiva.

2.5.2. 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 (Whitmann, 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 de 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 da maneira 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 que a da 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 menor do que na 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 hidrodinâmicas 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^2/s , T é a temperatura em K, μ_D é a viscosidade da fase em Pa.s e M_p é a massa molecular da proteína 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 duas 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:

$$QdC_p = k_{da} \cdot (C_p - KC_s) \cdot dH \quad (2.5)$$

onde k_{da} é o coeficiente de transferência de massa da fase dispersa (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 dividido 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 pistão é válida. A integração da equação 2.5 acima e a substituição das condições de contorno ($H=0$, $C_{p1}=C_{ent}$ e $H=H_D$, $C_{p0}=C_{sai}$) fornece a seguinte equação (Pawar et al, 1997):

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

Esta equação para o k_{da} foi desenvolvida para processos de operação semi-contínua (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.

2.5.3. Eficiência de Extração

Dois aspectos distintos sobre a 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. Baseados 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 e

c_r é a fração mássica de soluto no refinado.

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

O desempenho de um extrator de discos rotativos com “saia” perfurada (RDSC) 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 no topo e no 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 através de uma modelagem, fazendo-se uso de conhecimentos de análise dimensional. Esta equação representa a relação entre a eficiência obtida no equipamento (eficiência real) e a que seria obtida se o tempo de contato entre as fases fosse suficiente para se atingir o equilíbrio (eficiência ideal), 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 o 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.

2.5.4. 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 através 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 da 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 essas 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, 1966).

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 (através da diminuição no 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-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.

2.6. Fração de Retenção da Fase Dispersa (“Holdup”)

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 contínua 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. Como a coluna agitada por campânulas pulsantes é um equipamento desenvolvido pelos autores deste trabalho e que está sendo estudado pela primeira vez, não há nenhuma publicação sobre ela. 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.

2.6.1. 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 a 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 de 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 ingressaram na coluna.

3- Região de operação de mistura-decantação : A operação de mistura-decantação, segundo Sege e Woodfield (1954), ocorre a 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 as da operação mistura-decantação, sendo caracterizada pelo pequeno tamanho de gota produzido. É uma dispersão uniforme da fase leve na fase 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.

2.6.2. Definição e Equações de Predição da Fração de Retenção da Fase Dispersa

A fração de retenção da fase dispersa, que é a fração volumétrica da fase dispersa retida no interior do equipamento, é dada pela seguinte expressão :

$$\phi = (\text{Volume da fase dispersa}) / (\text{Volume total da coluna}) \quad (2.9)$$

Griffith et al (1952) foram os primeiros a sugerirem uma correlação para a fração de retenção da fase dispersa em colunas pulsadas, que é válida somente para a região de

mistura-decantação. A correlação proposta por Griffith et al (1952) para colunas com fluxo pulsado é citada em trabalhos mais recentes, como o de Kumar e Hartland (1988). Contudo, de acordo com esta equação, a fração de retenção não é afetada por variáveis como a amplitude de pulsação ou pelas propriedades físicas do sistema líquido utilizado.

Kumar e Hartland (1983, 1988, 1995), Miyauchi e Oya (1965), Burkhart et al (1979), Miyayami et al (1975), Baird e Lane (1973) e Rama Rao et al (1983) desenvolveram trabalhos onde diferentes correlações foram apresentadas e comentadas. As correlações propostas englobam variáveis do processo e propriedades físicas dos sistemas líquidos. Dentre os trabalhos, destacam-se os de Kumar e Hartland (1988 e 1995).

Kumar e Hartland (1988) usaram resultados experimentais publicados para a fração de retenção da fase dispersa em colunas de extração de pratos perfurados pulsados no desenvolvimento de uma correlação para prever a fração de retenção da fase dispersa, nas regiões de operação de mistura-decantação, transição e emulsão, a partir de propriedades físicas e variáveis de operação. Adicionalmente, foi proposta uma correlação que prediz os limites entre as regiões de operação de mistura-decantação e de transição.

Neste trabalho (Kumar e Hartland, 1988), os autores elaboraram uma revisão da literatura existente sobre correlações para prever a fração de retenção da fase dispersa e a velocidade característica.

A equação 2.10 representa a correlação proposta pelos autores para a predição da fração de retenção da fase dispersa, em colunas de pratos perfurados pulsados. Esta equação considera as condições de operação da coluna e as propriedades físicas do sistema e foi originada nos dados publicados com e sem transferência de massa para 23 sistemas líquido-líquido a partir de 15 diferentes fontes de dados. Nestes dados, o algoritmo de Marquardt (Marquardt, 1963) foi aplicado para calcular os parâmetros das equações desenvolvidas.

$$\phi = k_1 \exp[k_2 |A_c f - (A_c f)_i|] \cdot v_d^{0,86} \cdot (v_c + v_d)^{0,28} \cdot \Delta\rho^{-0,30} \cdot \rho_d^{-0,93} \cdot \mu_d^{0,77} \cdot \alpha^{-0,56} \cdot h^{-0,56} \quad (2.10)$$

É assumido que o valor do produto amplitude-frequência $(A_c f)_i$, pode ser descrito pela relação:

$$(A \cdot f)_t = 9,69 \times 10^{-3} \left(\frac{\gamma \cdot \Delta\rho^{1/4} e}{\mu_d^{3/4}} \right)^{0,33} \quad (2.11)$$

$(A \cdot f)_t$ marca a transição da região de mistura-decantação para a região de transição.

Os valores das constantes k_1 e k_2 para os três casos : sem transferência de massa, transferência de massa da fase contínua para a dispersa (c→d) e na direção oposta (d→c) são dadas a seguir.

	k_1	k_2
sem transferência de massa	$2,10 \times 10^6$	44,53
transferência : c→d	$2,14 \times 10^6$	44,53
transferência : d→c	$1,10 \times 10^6$	50,56

A equação 2.10 prediz a fração de retenção da fase dispersa com um erro médio de 17,8%.

Kumar e Hartland (1995) estudaram a fração de retenção da fase dispersa e a velocidade característica apresentando dados referentes a oito tipos de extratores. Com esses dados desenvolveram uma correlação para o cálculo da fração de retenção da fase dispersa, para cada uma dessas colunas e também uma correlação unificada, para todos os extratores. Adicionalmente, outras correlações foram testadas para os dados disponíveis e seus erros médios calculados.

Segundo os autores, a forma integrada da equação proposta por Jealous e Johnson (1955) para ε (dissipação de energia por unidade de massa), como obtida por Hafez e Baird (1978), em colunas de pratos perfurados pulsados, para uma onda senoidal, é:

$$\varepsilon = \frac{2\pi^2(1-e^2)}{3HC_0^2e^2} (A \cdot f)^3 \quad (2.12)$$

O valor do coeficiente, C_0 , é assumido como sendo 0,6.

A fração de retenção da fase dispersa, ϕ , é considerada como sendo uma função de ε , das velocidades da fase contínua e dispersa (v_c e v_d), das propriedades físicas (ρ_c , $\Delta\rho$, μ_c , μ_d , γ), da área livre da seção transversal fracional (e), do comprimento característico (l) e da constante da gravidade (g). O comprimento característico, l , é considerado como a altura de um compartimento para colunas agitadas em estágios.

Diferentes combinações dessas propriedades foram consideradas para formar os grupos adimensionais. Análises de regressão foram realizadas usando-se o algoritmo de Marquardt (1963). A forma final da correlação que descreve a fração de retenção da fase dispersa como função de vários grupos adimensionais é:

$$\phi = \Pi \Phi \Psi \Gamma \quad (2.13)$$

Os grupos usados na equação são definidos a seguir:

$$\Pi = C_{\Pi} + \left[\frac{\varepsilon \left(\frac{\rho_c}{g\gamma} \right)^{1/4}}{g} \right]^{n_1} \quad (2.14)$$

$$\Phi = \left[v_d \left(\frac{\rho_c}{g\gamma} \right)^{1/4} \right]^{n_2} \exp \left(n_3 v_c \left(\frac{\rho_c}{g\gamma} \right)^{1/4} \right) \quad (2.15)$$

$$\Psi = C_{\Psi} \cdot \left(\frac{\Delta\rho}{\rho_c} \right)^{n_4} \cdot \left(\frac{\mu_d}{\mu_w} \right)^{n_5} \quad (2.16)$$

$$\Gamma = C_{\Gamma} \cdot e^{n_6} \cdot \left[l \cdot \left(\frac{\rho_c g}{\gamma} \right)^{1/2} \right]^{n_7} \quad (2.17)$$

Os parâmetros na equação 2.13 foram otimizados para cada tipo de coluna, pois estas apresentam diferentes características de escoamento.

Para colunas de pratos perfurados pulsados, as constantes têm os seguintes valores:

$C_{\Pi} = 0,13$	$n_1 = 0,80$	$n_5 = 0,88$
$C_{\Psi} : c \rightarrow d = 1$	$n_2 = 1,18$	$n_6 = 0$
$d \rightarrow c = 0,64$	$n_3 = 7,51$	$n_7 = - 0,54$
$C_{\Gamma} = 153,2$	$n_4 = - 0,25$	Erro médio = 19 %

O erro foi calculado de acordo com a equação abaixo:

$$Erro = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \left(\frac{|x_{predito} - x_{exp}|}{x_{exp}} \right) \quad (2.18)$$

Kumar e Hartland (1995) desenvolveram uma correlação unificada para todas as colunas. Esta correlação reproduziu os dados experimentais com um erro relativo de 29,3 %. Para a equação 2.13, o erro relativo foi de 18,1 %, que é bem menor. Isso mostra que o comportamento de cada tipo de coluna é muito importante, porque o movimento da gota e padrões de escoamento da fase contínua são significativamente influenciados pelo tipo de agitação e características geométricas da coluna.

Na tabela 2.1, encontra-se uma comparação entre algumas correlações publicadas, para colunas de pratos perfurados pulsados. Um grande número de correlações para a fração de retenção da fase dispersa estão disponíveis na literatura (Kumar e Hartland, 1988). Kumar e Hartland (1995) escolheram algumas correlações a fim de serem comparadas.

Os altos valores do erro mostram que muitas dessas correlações não predizem satisfatoriamente os dados experimentais, o que pode ser visto na tabela 2.1. A melhor correlação foi a de Kumar e Hartland (1988), equação 2.10, que prediz a fração de retenção da fase dispersa com um erro relativo médio de 16,5 %, que é menor do que o erro obtido pela correlação 2.13 que foi de 19,0 %.

As propriedades físicas dos sistemas cujos dados foram considerados para o desenvolvimento das equações de Kumar e Hartland (1988, 1995) encontram-se no anexo 3.

Tabela 2.1 - Comparação de correlações para a predição da fração de retenção da fase dispersa e da velocidade relativa em colunas de pratos perfurados pulsados, de acordo com o erro relativo - número total de dados - 12591 (adaptado de Kumar e Hartland, 1995).

Correlação	ϕ	Erros (%)	V_{relativa}
Thornton (1957)	70,8		259,6
Steiner (1988)	71,7		189,0
Hussain et al (1988) ($d_{\text{max}} / D_0 < 1$)	48,3		45,3
Misek (1963) e Misek e Marek (1970, 1983) ($c \rightarrow d$ e sem transferência)	46,7		72,1
Ishii e Zuber (1979)	47,4		61,5
Kumar e Hartland (1985)	51,3		59,6
Baird e Lane (1973)	55,5		49,5
Pilhofer (1974)	53,1		79,2
Kumar e Hartland (1989)	20,1		15,6
Miyauchi e Oya (1965)	54,5		37,5
Miao (1978)	49,8		27,5
Tung e Luecke (1986) ($\rho_c(A.f)^3/(2e^2) > 0,06 \text{ kg/m}^3$)	29,4		40,6
Kumar e Hartland (1988)	16,5		16,2
Steiner (1988)	33,7		41,6
Kumar e Hartland (1995)	19,0		16,3

2.6.3. Velocidade Relativa e Velocidade Característica

O conceito de velocidade relativa foi primeiramente abordado por Dell e Pratt (1951), para um escoamento bifásico em contracorrente, através da seguinte correlação :

$$V_s = (V_d/\phi) + [V_c/(1-\phi)] \quad (2.19)$$

Nesta correlação, a velocidade relativa, V_s , é o resultado da ação de forças externas e internas sobre as fases contínua e dispersa, sujeitas ao campo gravitacional (Heyberger, 1983). A velocidade relativa é importante no estudo da transferência de massa entre as fases, porque ela exerce grande influência sobre o coeficiente de transferência de massa (Kumar e Hartland, 1989).

A velocidade característica, V_0 , segundo Heyberger (1983), é derivada da velocidade relativa, na condição em que a fração de retenção da fase dispersa tende a zero. Assim, pode-se interpretá-la como sendo a velocidade de sedimentação ou ascensão de gotas da fase dispersa, no seio da fase contínua, desprezando os efeitos de interações envolvendo as gotas, como por exemplo, a coalescência.

Uma série de relações foram propostas para a função δ , que relaciona a velocidade relativa com a velocidade característica. Dentre as mais importantes, pode-se citar as de: Richardson e Zuki (1954), Mises (1953), Ishii e Zuber (1979) e Thornton (1957). Estas relações foram utilizadas em estudos experimentais com colunas de fluxo pulsado (Heyberger, 1983).

Gayler et al (1953) propuseram a equação 2.20, uma das mais simples, para a relação entre as velocidades relativa e característica:

$$V_s = V_0 \cdot (1 - \phi) \quad (2.20)$$

Baird e Shen (1984) propuseram uma relação para a função δ , para colunas com pratos pulsantes. De acordo com esta função e a equação 2.19, obtém-se uma expressão adequada para o cálculo da velocidade característica em função da fração de retenção da fase dispersa e das velocidades superficiais das fases, em colunas com pratos pulsantes:

$$(V_d/\phi) + [V_s/(1-\phi)] = V_0(1-\phi)/\phi^{1/3} \quad (2.21)$$

2.6.4. Análise da Literatura sobre a Fração de Retenção da Fase Dispersa

Alguns pontos a considerar, de acordo com a análise da literatura sobre a fração de retenção da fase dispersa são as seguintes:

- A fração de retenção da fase dispersa, normalmente, é medida pelo método da interrupção instantânea das correntes de entrada e de saída da coluna (método do estancamento). A inundação é obtida, através do ajuste da vazão da fase dispersa até a visualização de um “selo interfacial” na base da coluna.

- Quanto aos estudos sobre a velocidade característica, cita-se como trabalho mais interessante, o de Baird e Shen (1984), onde é apresentado um modelo para a determinação da velocidade característica em função dos dados de fração de retenção da fase dispersa para colunas com pratos pulsantes.

- As equações de Kumar e Hartland (1988 e 1995) foram escolhidas para serem testadas na predição da fração de retenção da fase dispersa. Deve-se ressaltar que essas equações foram obtidas para colunas de pratos perfurados pulsados e com sistemas aquoso-orgânico, com propriedades diferentes das apresentadas pelos sistemas de duas fases aquosas usados neste trabalho. Além disso, a energia de pulsação neste trabalho é transferida ao sistema através das campânulas, o que muda a geometria da parte interna da coluna.

A seguir, são apresentados alguns trabalhos relacionados ao comportamento da fração de retenção da fase dispersa em função das variáveis operacionais, em extratores líquido-líquido.

Baird e Lane (1973) concluíram em seu trabalho com colunas pulsadas, que a fração de retenção da fase dispersa crescia com o aumento das vazões das fases e da viscosidade da fase contínua e decrescia com o aumento da tensão interfacial, da diferença de densidades entre as fases e do diâmetro das perfurações dos pratos.

Rama Rao et al (1983) constataram que a coluna de pratos pulsantes por eles utilizada apresentava um comportamento similar ao das colunas de fluxo pulsado. Estes autores observaram a existência dos regimes de mistura-decantação e emulsão, semelhantes aos que tinham sido encontrados por Sege e Woodfield (1954), em colunas com fluxo pulsado. Deste trabalho, observou-se que a fração de retenção dependia fortemente da vazão da fase dispersa, do número de pratos e da velocidade de pulsação ($A \cdot f$), mas era pouco influenciada pela vazão da fase contínua e pela geometria dos pratos, principalmente no regime de operação de emulsão que é o de maior interesse prático nos estudos de retenção em colunas pulsadas.

Coimbra (1995) estudou o desempenho de um extrator tipo Graesser, que é um equipamento horizontal, na separação de proteínas do soro de queijo usando sistemas

aquosos bifásicos. A autora determinou a fração de retenção da fase dispersa (fase rica em PEG) pelo método do estancamento rápido, após o estado estacionário ter sido atingido. Observou-se a independência da fração de retenção da fase dispersa tanto em relação à velocidade de rotação quanto em relação à razão de velocidades das fases. Assim, a capacidade e desempenho do extrator não foram reduzidos pela operação em baixas velocidades de agitação, o que leva a condições de mistura favoráveis a produtos lábeis, como as proteínas.

Góis (1995) estudou o comportamento de operação de uma coluna de extração com pratos pulsantes, usando o sistema ternário água-ácido acético-butanol. Neste trabalho, foi verificado que a fração de retenção da fase dispersa aumentava com o aumento da frequência de pulsação, da vazão da fase dispersa, do número de pratos e da amplitude de pulsação e diminuía com o aumento da área livre dos pratos e da vazão da fase contínua, embora esta tenha exercido pouca influência na fração de retenção da fase dispersa. O sistema apresentou um regime de operação estável. Em alguns casos, observou-se o arraste da fase dispersa pela fase contínua, o que provocou uma redução na fração de retenção da fase dispersa, quando a agitação atinge níveis elevados. Nestes casos, houve uma condição ótima de operação, acima da qual, o aumento das variáveis de operação provocou uma queda da fração de retenção da fase dispersa, em determinadas condições. Isto ocorreu para as variáveis: frequência, amplitude de pulsação e número de pratos. Os valores da fração da fase dispersa encontrados variaram de aproximadamente 0,05 até 0,70. Góis (1995) concluiu que o modelo proposto por Baird e Shen (1984), aplicado ao conceito de velocidade relativa descrito por Dell e Pratt (1951), era o que mais se aproximava das condições experimentais empregadas.

Coimbra et al (1998) estudaram a fração de retenção da fase dispersa e a velocidade característica em um extrator de discos rotativos perfurados (PRDC) usando sistemas de duas fases aquosas compostos por PEG 6000 e fosfato de potássio bibásico. Foi verificado que a área livre de escoamento dos discos exerceu uma pequena influência nos valores da fração de retenção da fase dispersa (o aumento da área livre reduziu a fração de retenção da fase dispersa) e que o aumento da velocidade de rotação e da razão entre os volumes das fases faziam com que a fração de retenção da fase dispersa aumentasse também. Valores da

fração de retenção da fase dispersa da ordem de 20% (0,2) foram obtidos. Os autores compararam os valores de fração de retenção da fase dispersa preditos pelo modelo apresentado por Kumar e Hartland (1995) e os obtidos experimentalmente, verificando que eram bastante diferentes. Essa diferença, segundo os autores, pode estar associada à presença tanto dos discos perfurados quanto às propriedades físicas dos sistemas aquosos bifásicos, principalmente à baixa tensão interfacial. Foi verificado que a equação proposta por Gayler et al (1953) correlaciona satisfatoriamente a velocidade característica com a fração de retenção da fase dispersa, mostrando-se válida. Observou-se uma relação inversa entre a velocidade característica e a velocidade de rotação dos discos.

Porto (1998) realizou um estudo sobre a extração líquido-líquido de proteínas utilizando sistemas de duas fases aquosas (PEG/fosfato de potássio) em uma coluna de discos perfurados rotativos, operando em contínuo. Foi observado que para valores de velocidade de rotação inferiores a 150 rpm, houve um aumento na fração retida da fase dispersa com o aumento da velocidade de rotação, na maioria das vazões de alimentação estudadas. Porém, para valores acima desta velocidade de rotação, ocorreu uma discreta diminuição na fração retida da fase dispersa, para vazões total superiores a 3 mL/min. Este comportamento pode ser explicado pela resistência imposta ao escoamento pelos discos perfurados quando a velocidade de rotação é muito elevada, o que pode impedir a ascensão das gotas da fase dispersa até o topo da coluna e aumentar o arraste.

Os valores encontrados com sistemas bifásicos aquosos em coluna PRDC (Porto, 1998) para a fração retida da fase dispersa (variando de menos de 0,10 a cerca de 0,40) foram muito superiores aos já descritos na literatura para coluna “spray”, utilizando diferentes sistemas bifásicos aquosos com proteínas e enzimas (Sawant et al, 1990; Jafarabad et al, 1992 a e b). Estes resultados estão em concordância com os obtidos por Pawar et al (1997), em coluna “spray”, modificada de modo a gerar maiores valores da fração retida da fase dispersa.

Quanto à influência da velocidade da fase dispersa na fração retida da fase dispersa em diferentes composições dos sistemas aquosos, pode-se verificar que para os vários sistemas com PEG de diferentes massas moleculares (550, 1000, 3350 e 8000), a fração retida da

fase dispersa aumentou com o aumento da velocidade da fase dispersa e diminuiu com o aumento da composição do sistema.

Kumar e Hartland (1982), relataram que o tamanho da gota diminui e o número de gotas aumenta com o aumento da velocidade da fase dispersa, resultando em um aumento dos valores da fração retida da fase dispersa. Efeitos similares foram observados em outros trabalhos (Jafarabad et al, 1992 a; Pawar et al, 1997; Venâncio et al, 1995).

Com o aumento diferença de densidades das fases e da composição dos sistemas de duas fases aquosas, valores menores são observados para a fração retida da fase dispersa para vários sistemas estudados (Sawant et al, 1990; Raghav Rao et al, 1991; Venâncio et al, 1995 e Porto, 1998).

2.7. 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 estes 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;
- deve ter baixo custo e estar disponível comercialmente em grande quantidade;
- 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 orgânicos 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 fosfatos de potássio, em concentrações acima de seus valores críticos, quando separam-se em duas fases, espontaneamente. Nos exemplos citados, a fase mais leve, que tem a menor densidade, é rica em polietileno glicol, enquanto 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 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.

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

Além de ser usado como um método de separação aplicado 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.

Geralmente, considera-se que a separação de moléculas em sistemas de duas fases aquosas é dependente das características da superfície molecular dos compostos a serem particionados, tais como: carga, tamanho e propriedades hidrofóbicas (Albertsson, 1971; LaMarca et al, 1990).

O efeito da massa molecular do polímero, concentração, densidade das fases e a presença de sais em sistemas de duas fases aquosas têm sido estudados por vários autores (Albertsson, 1971, 1986; Johansson, 1985; Bamberger et al, 1984; Zaslavsky et al, 1992; Carlson, 1988; Huddleston et al, 1991; Asenjo et al, 1990; Sarmiento et al, 1994).

A extração com sistemas de duas fases aquosas oferece vantagens para processamento em larga escala. Algumas delas são : elevado rendimento, faixa de trabalho próxima ao equilíbrio, fácil ampliação de escala e a possibilidade de processamento contínuo (Kim et al, 1988). Esses fatores justificam o interesse na aplicação de sistemas de duas fases aquosas. A maioria dos estudos concentram-se na análise dos fundamentos da separação de fases e da partição de proteínas, na redução dos custos do processamento, no aumento da seletividade da extração (por exemplo, pela adição de ligantes), na pesquisa de novos componentes formadores das fases, especialmente para substituir a dextrana, que é um polímero de custo elevado e no desenvolvimento de novos sistemas (Szlak e Giuliano, 1988), na operação em múltiplos estágios (Coimbra, 1995), na ampliação de escala de laboratório para planta piloto ou larga escala (Hustedt et al, 1985; Papamichael et al, 1992) e na modelagem do processo de partição dos componentes (King et al, 1988; Grossmann et al, 1993; Eiteman, 1994).

2.7.1. Tipos de Sistemas de Duas Fases Aquosas

Existe uma grande variedade de polímeros hidrofílicos, naturais ou sintéticos, capazes de gerar a separação de fases ao se misturarem com um segundo polímero ou 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 critérios como 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 estes 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-os dentro da legislação para o trabalho com produtos alimentícios e farmacêuticos. O mesmo pode ser dito para alguns tipos de sais de citratos, fosfatos e sulfatos (Coimbra, 1995).

Tabela 2.2- Exemplos de sistemas de duas fases aquosas (Albertsson, 1986)

Polietilenoglicol -	Dextrana
Polietilenoglicol -	Ficol
Polietilenoglicol -	Fosfatos de Potássio
Polipropilenoglicol -	Polietilenoglicol
Polipropilenoglicol -	Dextrana
Polipropilenoglicol -	Glucose
Polipropilenoglicol -	Fosfatos de Potássio
Metilcelulose -	Dextrana
Polivinil álcool -	Dextrana

2.7.2. Polietilenoglicol

O polietileno glicol, $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, 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 de 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, CaCl_2 , MgCl_2 e 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).

2.7.3. Características dos Sistemas de Duas Fases Aquosas

Os sistemas de duas fases aquosas têm como importante característica, o fato de conterem cerca de 70% a 90% de água em sua composição, o que permite a partição de biomoléculas e de partículas celulares em condições não desnaturantes.

A tensão interfacial entre as fases é muito pequena, algumas ordens de grandeza inferiores às correspondentes aos sistemas convencionais aquoso-orgânico (em torno de 1 a 3 ordens de grandeza), sendo no entanto, mais elevada em sistemas PEG-Sal do que em sistemas PEG-Dextrana (Kula, 1985; Porto, 1998). Esta baixa tensão interfacial minimiza também a tendência à desnaturação de biomoléculas que precipitam na interface, preservando a atividade biológica e permitindo que o equilíbrio seja atingido mais rapidamente, embora prejudique os tempos de separação das fases (Diamond et al, 1992). Elevados tempos de separação poderiam causar a inundação com maior facilidade em equipamentos que operam em contínuo, projetados para sistemas convencionais.

As massas específicas das fases são aproximadamente igual a 1 nos sistemas de duas fases aquosas, devido ao elevado conteúdo de água (Albertsson, 1986). A diferença entre as massas específicas das fases nestes sistemas também é pequena, sendo maior para sistemas PEG-Fosfatos do que para sistemas PEG-Dextrana (Kula, 1985).

A viscosidade das fases está diretamente relacionada ao aumento da massa molecular do polímero. Geralmente, quanto maior for a massa molecular do polímero, mais elevada é a viscosidade das duas fases em equilíbrio (Albertsson, 1986). Entretanto, o aumento da viscosidade com o aumento da massa molecular do polímero pode ser minimizado em alguns casos, já que quando se usam polímeros de alta massa molecular, são necessárias concentrações mais baixas destes polímeros para a formação das fases. Uma alternativa bastante interessante para anular este efeito da viscosidade do polímero é a substituição do polímero pelo sal. A menor viscosidade é uma das principais vantagens dos sistemas PEG-Sal, uma vez que a viscosidade é um dos fatores determinantes na viabilidade da aplicação à escala industrial (Sarmiento et al, 1994).

As propriedades físicas dos sistemas de duas fases aquosas podem ser alteradas por manipulação de sua concentração e composição dos polímeros e sais. Deste modo, a partição de moléculas e de partículas biológicas podem ser exploradas para obtenção de separações que, de outro modo, seriam difíceis ou mesmo impossíveis de serem realizadas (Venâncio e Teixeira, 1996; Porto, 1998).

De acordo com Albertsson (1986), as principais vantagens dos sistemas de duas fases aquosas são:

- facilidade de aumento de escala;
- rápida transferência de massa;
- o equilíbrio é alcançado rapidamente;
- algumas enzimas são estabilizadas pelos polímeros;
- possibilidade de operação em contínuo;
- possibilidade de separação rápida e seletiva;
- possibilidade de operação à temperatura ambiente;
- mais econômico que outros processos de separação.

2.7.4. Diagramas de Fases

Para obter duas fases aquosas imiscíveis ou parcialmente miscíveis a partir de uma solução de dois polímeros ou de um polímero e um sal, é necessário que as concentrações desses componentes estejam acima de determinados valores, chamados de concentrações críticas. Essas concentrações críticas podem ser obtidas através de um diagrama de fases do sistema de interesse.

A figura 2.5 mostra um esquema do diagrama de fases correspondente ao sistema PEG 4000- Fosfato de Potássio, a temperatura de 20 °C e pH 7,0 (adaptado de Albertsson, 1986 e Porto, 1998). Uma solução homogênea (uma única fase) é obtida quando as concentrações de PEG e fosfatos se encontram abaixo da curva, que é chamada curva binodal. Este é o caso do sistema representado pelo ponto H, cujas concentrações obtidas no gráfico são as concentrações totais. Para concentrações situadas acima da curva binodal, ocorre a separação de fases, como por exemplo no caso do sistema com composição total representada pelo ponto M (Sebastião et al, 1996; Porto, 1998).

A composição da fase de topo do sistema M é representada pelo ponto C e as concentrações de equilíbrio de PEG e sal relativas à fase de fundo do mesmo sistema são dadas pelo ponto B, do diagrama de fases. A linha que une o ponto C ao ponto B passando pelo ponto M, chama-se “tie line” ou linha de amarração.

Cada par de concentrações de PEG e sal pertencente a uma mesma linha de amarração originará um sistema bifásico idêntico, diferindo apenas na razão de volumes entre as fases do topo e do fundo (Kula et al, 1982). A razão entre os volumes das fases do sistema, representado pelo ponto M, pode ser obtida do diagrama de fases através da razão entre os segmentos de reta MB e MC (Cabral et al, 1992).

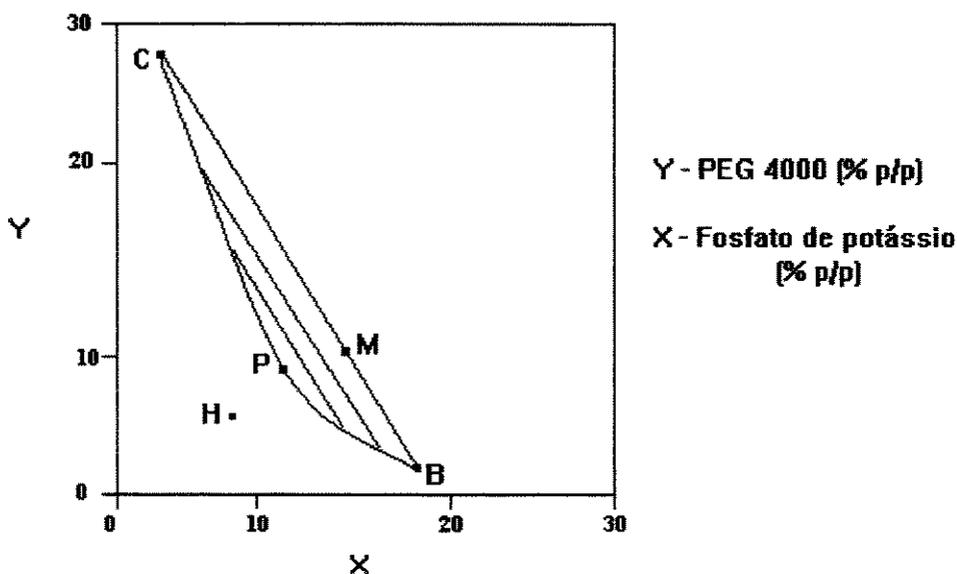


Figura 2.5 - Diagrama de fases do sistema PEG 4000 - fosfatos de potássio, a 20°C e pH 7,0 (adaptado de Albertsson, 1986).

No ponto crítico, que é o ponto que delimita as regiões de duas fases e de uma única fase, uma pequena alteração nas concentrações das fases pode transformar um sistema de duas fases aquosas em uma solução homogênea.

A composição que dá origem à formação de duas fases aquosas varia com a massa molecular dos polímeros, com a temperatura e com os sais presentes. Geralmente,

aumentando-se a massa molecular de um dos polímeros, a separação de fases é obtida com concentrações mais baixas de polímero, ou seja, a curva binodal sofre um deslocamento em direção à origem do diagrama de fases e, portanto, as fases apresentam um maior conteúdo de água (Venâncio e Teixeira, 1996; Porto, 1998).

Nos sistemas de duas fases aquosas formados por dois polímeros, o aumento da temperatura promove uma maior miscibilidade entre os polímeros constituintes do sistema e, conseqüentemente, a curva binodal sofre um deslocamento, afastando-se da origem do diagrama de fases. Estas regras foram, inicialmente, verificadas para o sistema polietileno glicol-dextrana, mas são válidas para outros sistemas de duas fases aquosas formados por dois polímeros (Albertsson, 1986).

Em sistemas de duas fases aquosas constituídos por um polímero e um sal, o efeito da temperatura é oposto. Com o aumento da temperatura ocorre uma diminuição das concentrações de polímero e de sal necessárias para a formação de duas fases.

2.7.5. Sistemas PEG/Sal

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

Esses sistemas foram introduzidos 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 fases aquosas menos agressivos ao meio ambiente. O citrato é biodegradável e atóxico, e poderia ser descartado em uma planta de tratamento de resíduos.

2.7.6. Recuperação de Sais e Polímeros

A possibilidade de reutilização dos constituintes das fases deve ser considerada ao efetuar um projeto em larga escala, pois os custos dos componentes das fases aumentam linearmente com o aumento da escala de produção (Kroner et al, 1984).

A reciclagem de PEG pode ser facilmente integrada ao processo, chegando a níveis de recuperação em torno de 90 % a 95 % (Hustedt et al, 1988). As técnicas de recuperação de PEG mais usadas são a ultrafiltração e a extração com solvente orgânico seguida de evaporação (Coimbra, 1995). O PEG da fase do topo, rica em PEG, pode ser reciclado com sucesso (Kroner e Kula, 1978; Kroner et al, 1982; Hustedt et al, 1985, 1987, 1988; Turner, 1991; Mistry et al, 1992).

O descarte de sais é geralmente mais problemático. Em sistemas contendo células, ácido nucléico, proteínas solúveis e insolúveis, a separação de sais da fase primária por técnicas de separação mecânica, tais como centrifugação ou ultrafiltração é muito difícil de ser conduzida eficientemente. A eletrodialise é considerada um método geral para a reciclagem de sais e para a dessalinização da fase rica em PEG (Hustedt et al, 1988). Sais também podem ser recuperados usando uma mistura de álcool alifático - sal - água (Greve e Kula, 1991). Especificamente para a separação de fosfato de potássio, um resfriamento abaixo de 6 °C provoca a precipitação do sal, possibilitando a sua reutilização (Papamichael et al, 1992; Coimbra, 1995).

Greve e Kula (1991) estudaram maneiras de reciclar a fase rica em fosfato de sistemas PEG/Fosfato para minimizar a poluição ambiental. A reciclagem da fase fosfato foi obtida pela sua separação através do uso de álcoois.

Mais recentemente, outros autores estudaram a reciclagem de polímeros e sais em processos de extração com sistemas de duas fases, mostrando que a reciclagem pode ser integrada ao processo com sucesso, eliminando uma das limitações ao emprego de sistemas de duas fases aquosas em larga escala, que é o consumo de grandes quantidades de compostos formadores das fases (van Berlo, 1998; Rito-Palomares, 1994).

2.7.7. Partição de Proteínas em Sistemas de Duas Fases Aquosas

Os fundamentos de partição de biomoléculas entre duas fases ainda não são totalmente compreendidos, 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 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 compostos de baixo peso molecular, tanto que as energias de interação entre os dois polímeros se sobrepõem à energia de Gibbs do sistema. Estes fatores levam à formação de duas fases em sistemas ternários polímero-polímero-água, em baixas concentrações dos polímeros.

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 :

$$K = C_t / C_b \quad (2.22)$$

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 ressalta-se 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 como 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 $SO_4^{2-} < F^- < Cl^- < I^-$ e $NH_4^+ < Na^+ < K^+$. 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 da partição (Porto, 1998).

O fato da 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).

2.7.7.1. Modelos para a Partição de Proteínas entre as Fases

2.7.7.1.1. Teoria de Brønsted

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 a concentração de proteína na fase mais leve, do topo, C_t , dividida pela concentração de proteína na fase mais pesada, do fundo, C_b :

$$K = C_t / C_b \quad (2.22)$$

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

Se a energia necessária para movimentar as moléculas de proteína de uma fase para outra é ΔE , espera-se que, no equilíbrio, uma relação entre o coeficiente de partição e ΔE seja expressa da seguinte maneira (Baskir et al, 1987):

$$C_t / C_b = e^{-\Delta E/kT} \quad (2.23)$$

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

ΔE 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:

$$C_t / C_b = e^{\lambda M/kT} \quad (2.24)$$

Onde M é a massa molecular e λ , 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:

$$C_t / C_b = e^{\lambda A/kT} \quad (2.25)$$

Onde λ , 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 da partição de Brønsted e seu ponto principal é a relação exponencial entre o coeficiente de partição e as propriedades que entram no fator λ , 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 Brønsted 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 outras variáveis do sistema em um único parâmetro (Franco, 1992).

2.7.7.1.2. Modelo de Albertsson

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

$$\ln K = \ln K_{el} + \ln K_{hidrof} + \ln K_{hifil} + \ln K_{conf} + \ln K_{lig} + \ln K_{tamanho} \quad (2.26)$$

Onde os subíndices el., hidrof., hifil., conf., lig. e tamanho referem-se, respectivamente, às contribuições eletrostáticas, hidrofóbicas, hidrofílicas, de conformação, de interações entre os ligantes e do 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 essas teorias para predizer o comportamento da partição. Elas têm sido usadas 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).

2.7.7.1.3. Teorias Termodinâmicas

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

A teoria de Flory-Huggins é suficiente para descrever o comportamento termodinâmico que leva à separação das fases. Ao misturar polímeros, estes preferem associarem-se a misturarem-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. Assumindo que a partição de proteínas é fortemente dependente deste termo, faz-se necessário considerar as interações de carga e distribuição desigual de íons na

modelagem da separação de fases e do coeficiente de partição em sistemas contendo sais e grupos ionizáveis (Albertsson, 1986, Coimbra, 1995).

Em resumo, alguns modelos desenvolvidos para a representação da separação de fases e predição do coeficiente de partição em sistemas de duas fases aquosas são:

- Brooks et al (1985) - Modelo do Vértice, desenvolvido para sistemas PEG/Dextrana, extendendo a teoria de mistura de solventes polímero-polímero para sistemas multicomponentes.

- Grossman e Gainer (1988) - correlacionaram o coeficiente de partição da proteína com o volume livre das fases. Esses autores introduziram o conceito de “diferença de volume livre” para sistemas PEG/Sulfato analisando o efeito do aumento das concentrações de KCl. Esta diferença de volume livre é a diferença entre o inverso da massa específica da fase e o inverso da massa específica da fase de referência (sem KCl). É sugerido que a partição de proteínas poderia estar relacionada à diferença de volume livre.

- Kang e Sandler (1988) - usaram o modelo UNIQUAC para construir diagramas de equilíbrio com razoável precisão.

- King et al (1988) - Modelo para sistemas polímero-polímero. Assumiram uma forma geral para o potencial químico dos componentes, partindo de uma extensão da teoria de soluções de Edmond e Ogston (1968), usando o modelo de expansão do Virial. É um modelo para sistemas polímero-polímero, que calcula o coeficiente de partição de proteínas.

- Eiteman e Gainer (1989 b) estudaram a influência da diferença de composição entre as fases na partição de álcool e peptídeos. Um modelo para a partição de proteínas foi sugerido, levando em conta a diferença de concentração de PEG entre as fases, a hidrofobicidade relativa do soluto e a diferença hidrofóbica entre as duas fases.

- Kim (citado em Baskir et al, 1989) - Modelo para sistemas polímero-sal. Na estimativa do coeficiente de partição, desconsiderou a influência das interações polímero-sal na fase salina. Já na fase polimérica, as interações polímero-sal foram consideradas significativas. A solubilidade da proteína é expressa pela relação entre a solubilidade da proteína na fase rica

em sal, a concentração molar de sal na fase rica em sal, a solubilidade da proteína na água pura e a constante de “salting out” do sal para a proteína.

- Haynes et al (1989) e Cabezas et al (1990, 1991) - Melhoraram o modelo de King et al (1988), através do desenvolvimento de um modelo termodinâmico molecular e de um modelo de mecanismo estatístico, respectivamente. Consideram interações iônicas nos modelos, mas a base teórica precisa ser refinada.

- Eiteman e Gainer (1991, 1992) - correlacionaram o coeficiente de partição com a hidrofobicidade dos aminoácidos individuais que constituem a molécula, para peptídeos em sistemas PEG-MgSO₄. Tem que ser melhorado para proteínas.

- Grossmann et al (1993) - propuseram, para as espécies iônicas em sistemas PEG-Dextrana, a extensão de uma correlação entre a composição das fases e o coeficiente de partição de aminoácidos e peptídeos.

- Sassi et al (1996) - desenvolveram uma análise da termodinâmica molecular para a partição de proteínas, que leva em conta a exclusão por tamanho, interações eletrostáticas e diferenças de pressão osmótica. Interações eletrostáticas podem ser descritas da teoria de Debye-Hückel, da Aproximação Média Esférica ou do modelo de células de Katchalsky para soluções de polieletrólitos, sendo este o que forneceu os melhores resultados para o citocromo c, em relação aos coeficientes de partição.

- Kenkare et al (1996) - desenvolveram um modelo molecular baseado na equação integral da teoria da termodinâmica estatística para a separação em sistemas PEG/sal. As interações entre os componentes são modeladas com diferentes teorias, como o potencial de Yukawa, potencial Coulômbico. As propriedades de excesso são calculadas. O modelo prediz as tendências observadas experimentalmente e mostra a importância das interações íon-PEG e íon-solvente.

2.7.8. Extração em Sistemas de Duas Fases Aquosas

A extração com sistemas de duas fases aquosas apresenta vantagens sobre outros processos de purificação, como a centrifugação ou a precipitação, quando são consideradas

misturas complexas de proteínas. Para processos em larga escala, a cromatografia de proteínas não é um método facilmente aplicável, embora em escala de laboratório, seja muito efetivo e relativamente simples (Franco, 1992). O emprego dos sistemas de duas fases aquosas em diferentes tipos de extratores para purificação de proteínas tem apresentado bons resultados (Hustedt et al, 1985; Coimbra, 1995; Porto, 1998).

Vários trabalhos têm sido publicados com dados de extração com sistemas de duas fases aquosas em escala laboratorial, com a finalidade de selecionar as propriedades destes sistemas, tais como : tipo de componentes do sistema, massa molecular dos polímeros, comprimento da linha de amarração, composição de sais, força iônica e pH mais adequadas à extração e purificação de uma determinada proteína ou enzima. Muitos destes trabalhos apresentaram resultados bastante satisfatórios. Como exemplo, pode-se mostrar os resultados obtidos com a taumatina (proteína com propriedades adoçantes), que revelaram em um único passo de extração com sistema bifásico PEG 6000-fosfato contendo NaCl, a partir de extrato bruto livre de fragmentos de células, valores de rendimento e fator de purificação de 90-95 % e 20, respectivamente (Cascone et al, 1991).

Sabe-se que a extração de duas fases aquosas apresenta vantagens em relação a outros métodos de separação e recuperação de enzimas e outras proteínas. Dentre essas, já citadas anteriormente, destacam-se as que são comentadas a seguir.

A escala de trabalho com sistemas de duas fases aquosas pode ser facilmente ampliada sem mudança apreciável na natureza ou eficiência do processo. O transporte interfásico é rápido, sendo que apenas alguns segundos são requeridos para levar a maioria dos sistemas de duas fases, formados por PEG/Sal ao equilíbrio. A separação das fases é rápida, especialmente para os sistemas PEG/Sal. Um outro benefício é que as fases são compatíveis com muitas das proteínas conhecidas. Portanto, sistemas de duas fases aquosas são uma alternativa extremamente atrativa para a separação e purificação de proteínas em larga escala (Franco, 1992). Esses fatores estimulam as pesquisas nesta área.

O uso de sistemas PEG-sal aplicados em larga escala constitui uma alternativa, técnica e econômica, aos processos tradicionais de purificação de biomoléculas. Alguns exemplos de

purificação de proteínas em grandes volumes (25 a 500 L) de sistemas PEG-sal estão apresentados na Tabela 2.3 (Porto, 1998).

Tabela 2.3- Exemplos de purificação de proteínas em larga escala por passos subsequentes de extração (Departamento de Tecnologia Enzimática do GBF - Braunschweig - Alemanha, adaptado de Albertsson et al, 1990)

Enzimas	Organismos	Número de passos de extração	Fator de purificação	Rendimento final (%)	Observações	Fonte
Aspartase	<i>E. coli</i>	4	18	82	Remoção de fumarase interferente	Hustedt et al, 1983
Formato desidrogenase	<i>Candida boidinii</i>	3	4,4	78	Remoção de polissacarídeos e ácidos nucléicos	Kroner et al, 1982
Interferon	<i>Fibroblastos humano</i>	1	> 350	75		Menge et al, 1983

- O primeiro passo de extração é realizado para remoção de todos os resíduos celulares, com exceção da purificação do Interferon.

Estudos realizados por Kroner et al (1982) estabeleceram uma comparação entre o processo de purificação utilizando sistemas de duas fases aquosas e o convencional constituído essencialmente por precipitação seguida por dois passos cromatográficos e obtiveram valores de grau de pureza semelhantes, sendo atingido um rendimento superior quando usada a extração líquido-líquido (71 % *versus* 51 %). Uma análise econômica comparativa entre os dois processos, envolvendo custos de pessoal, material e operação revelou que uma unidade de atividade enzimática produzida pelo protocolo clássico tinha um custo de cerca de 40 vezes superior ao de uma unidade de enzima resultante das extrações sequenciais em sistemas de duas fases aquosas (Kroner et al, 1982).

O desenvolvimento de extrações líquido-líquido em larga escala está muito limitado aos sistemas de PEG-Dextrana e PEG-sal. Estes sistemas parecem ter aplicabilidade geral; as propriedades físico-químicas das fases (viscosidade, diferença entre as massas específicas) são relativamente adequadas e os polímeros são atóxicos, biodegradáveis e certificados nas Farmacopéias da maioria dos países. Dextrana purificada é muito cara para processos em larga escala. Por isso, outros polímeros hidrofílicos vêm sendo avaliados (Albertsson, 1971; Hustedt et al, 1985 in Walters, 1985). Tanto o PEG como a Dextrana são substâncias não tóxicas para o meio ambiente (Sarmiento et al, 1994).

A seletividade de sistemas PEG/sal é freqüentemente maior do que a dos sistemas PEG/Dextrana (Hustedt et al, 1985). Para sistemas PEG/sal, espera-se um melhor desempenho na etapa de separação das fases, devido às mais baixas viscosidades, maiores diferenças entre as massas específicas e maiores tensões interfaciais (Hustedt et al, 1985).

O tempo necessário para a separação também depende do tamanho das gotas, que é função da etapa de mistura e da taxa de coalescência, que, por sua vez, é dependente da tensão interfacial. Portanto, espera-se que sistemas PEG/sal separem-se mais rapidamente do que sistemas PEG/Dextrana, ao considerar a taxa de coalescência (Hustedt et al, 1985).

Uma análise econômica detalhada da purificação de biomoléculas, para fins comparativos, entre diferentes processos, não foi encontrada na literatura. Kroner et al (1982) apresentaram um estudo onde calcularam os custos operacionais de algumas técnicas de purificação de FDH - Formiato desidrogenase obtido de *Candida boidinii*. Observa-se que as despesas relativas à aquisição de sais e polímeros, necessários para a formação das fases nos métodos que usam a extração em sistemas de duas fases aquosas PEG/fosfato, são compensadas pelo alto rendimento e o curto tempo desses processamentos em relação aos outros métodos (Coimbra, 1995).

2.7.8.1. Extração Contínua com Sistemas de Duas Fases Aquosas

A extração líquido-líquido é um processo de separação que apresenta vantagens, como baixa perda de atividade do componente, boa reprodutibilidade e fácil aumento de escala, além de ser altamente específica na separação (Coimbra, 1995).

Visando a obtenção de processos de separação mais rápidos e eficientes, equipamentos de extração líquido-líquido de operação contínua vêm sendo estudados.

Alguns estudos já foram apresentados, nos quais sistemas de duas fases aquosas foram usados em vários tipos de colunas de extração com operação semi-contínua (Sawant et al, 1990; Raghav Rao et al, 1991; Patil et al, 1991; Jafarabad et al, 1992 a,b; Pawar et al, 1997) e contínua (Hustedt et al, 1987 e 1988; Coimbra et al, 1995 e 1998; Porto, 1998). A tensão interfacial em sistemas de duas fases aquosas é de 1 a 3 ordens de grandeza abaixo daquelas encontradas em sistemas água-solvente orgânico. Portanto, o problema da inundação deve ser contornado para se empregar sistemas de duas fases aquosas em equipamentos projetados para sistemas clássicos, já que a inundação pode ser atingida mais rapidamente com estes sistemas. Outra dificuldade surge da viscosidade das fases, que é especialmente elevada para sistemas contendo biomassa (Kula, 1990).

A seguir, são apresentados, mais detalhadamente, alguns estudos sobre a extração contínua e semi-contínua de biomateriais com sistemas de duas fases aquosas.

Kula et al (1982) pesquisaram a extração de formiato desidrogenase (FDH) com sistemas PEG-sal.

Albertsson (1986) descreveu a operação de uma unidade Craig, em modo contra-corrente, empregando sistemas PEG-Dextrana.

Hustedt et al (1987) desenvolveram em processo contínuo e totalmente automatizado composto por dois passos de extração em contra-corrente, o qual foi implementado à escala piloto para purificação de fumarase a partir de um homogenato de células de *Saccharomyces cerevisiae*. Neste caso, também foram utilizados misturadores estáticos (em número de dois) e dois separadores à escala piloto. O processo descrito acima foi realizado com controle por microcomputador idealizado por Papamichael et al (1991), através da monitorização da pressão dos fluxos dos diversos componentes. A monitorização “on line” da concentração de proteína total e atividade da fumarase proporcionou o controle da eficiência de extração.

Hustedt et al (1988) analisaram o processo contínuo em uma coluna Kühni, em um extrator graesser, em uma coluna Podbielniak e em uma unidade misturadora-decantadora usando sistemas de duas fases aquosas.

Papamichael et al (1992) estudaram um esquema com um único estágio teórico para purificação de proteínas.

Jafarabad et al (1992 a) realizaram o estudo da fração de retenção da fase dispersa e do coeficiente de transferência de massa para BSA (albumina do soro bovino) e AMG (amiloglucosidase) em colunas “spray”, em operação semi-contínua, com sistemas PEG/sal. Eles verificaram que o tamanho médio das gotas é menor quando a fase rica em PEG (fase leve) é a fase dispersa. A fração de retenção da fase dispersa e o coeficiente de transferência de massa aumentaram com o aumento da velocidade superficial da fase dispersa, do número de orifícios e com a diminuição no tamanho dos orifícios. Com o aumento na composição do sistema, a tensão interfacial, a diferença de densidades e as viscosidades das fases aumentam. O efeito combinado dessas propriedades faz com que o tamanho médio das gotas e a velocidade das gotas aumentem com um aumento na composição do sistema (Clift et al, 1978). Portanto, a fração de retenção da fase dispersa e o coeficiente de transferência de massa diminuem com o aumento na composição do sistema. Os coeficientes de transferência de massa (entre 10^{-5} e 10^{-4} s^{-1}) e a fração de retenção da fase dispersa (entre 0 e 4%) foram bem pequenos.

Jafarabad et al (1992 b) realizaram um estudo da fração de retenção da fase dispersa e do coeficiente de transferência de massa para a extração de BSA e AMG em uma coluna York-Scheibel para sistemas PEG-sal. A fração de retenção da fase dispersa aumenta com a diminuição na composição das fases, porque a tensão interfacial e a diferença de densidade diminuem com a redução na composição das fases. Com isso, o tamanho médio das gotas diminui, a velocidade de ascensão das gotas diminui e a fração de retenção da fase dispersa aumenta. A fração de retenção da fase dispersa e o coeficiente de transferência de massa aumentam com o aumento da velocidade de rotação dos agitadores e com o aumento da velocidade superficial da fase dispersa.

Os valores do coeficiente de transferência de massa e da fração de retenção da fase dispersa são de 2 a 3 vezes maiores nas colunas York-Scheibel do que nas colunas “spray”. A fração de retenção da fase dispersa entre 2% e 15% e coeficiente de transferência de massa entre 4×10^{-5} e $1,6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, para sistemas PEG/fosfato e entre 7×10^{-5} e $5,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, para sistemas PEG/sulfato foram obtidos.

Coimbra (1995) estudou a separação das proteínas do soro do queijo, com sistemas de duas fases aquosas PEG-fosfato, em um extrator Graesser, em modo contínuo. Com tempo de residência de 1 hora, a recuperação de 63 % da α -lactoalbumina na fase rica em PEG foi obtida, isenta de β -lactoglobulina (proteína responsável pelas reações alérgicas) que transferiu-se totalmente para a fase rica em sal.

Pawar et al (1997) realizaram um estudo da fração de retenção da fase dispersa e dos coeficientes de transferência de massa medidos em colunas “spray” modificadas, usando sistemas de duas fases aquosas formados por PEG 4000-sulfato de sódio, para a amiloglucosidase e β -galactosidase. Os modos de operação da coluna concorrente e contracorrente, em modo semi-contínuo, foram investigados.

A fração de retenção da fase dispersa e os coeficientes de transferência de massa das fases dispersa e contínua aumentaram com o aumento da velocidade da fase dispersa. Um aumento nas concentrações de sulfato de sódio e PEG faz com que a fração de retenção da fase dispersa e os coeficientes de transferência de massa diminuam. A coluna “spray” modificada mostrou ser melhor do que a coluna “spray”, aumentando a fração de retenção da fase dispersa, os coeficientes de transferência de massa e a carga que a coluna suporta.

Porto (1998) estudou a extração contínua de citocromo b5, protease e ascorbato oxidase, a partir de seus extratos brutos, usando sistemas de duas fases aquosas PEG/fosfato de potássio, em uma coluna PRDC. Os resultados obtidos para o citocromo b5, protease e ascorbato oxidase foram respectivamente, 44 %, 38,5 % e 48 % para a proteína total; 78 %, 112 %, 112 % para a recuperação em atividade e 2, 3 e 22 para o fator de purificação.

Coimbra et al (1998) realizaram um estudo da fração de retenção da fase dispersa e da velocidade característica em uma PRDC, com sistemas de duas fases aquosas formado por

PEG 6000 e fosfato de potássio bibásico. A área livre de escoamento dos discos apresentou uma pequena influência na fração de retenção da fase dispersa. Observou-se valores da fração de retenção da fase dispersa que variaram de aproximadamente 0,05 a 0,25.

De acordo com a análise desses trabalhos, pode-se concluir que a aplicação da extração líquido-líquido com sistemas de duas fases aquosas na purificação de biomateriais é uma alternativa extremamente interessante e promissora. Os resultados gerados mostram que altos valores de eficiência de extração e de fatores de purificação podem ser obtidos. Isso faz com que haja a necessidade de mais pesquisas que possibilitem uma melhor compreensão e desenvolvimento desses processos, visando a obtenção de melhores resultados. Além disso, o melhor entendimento do processo, pode colaborar na obtenção de correlações para predição da partição das proteínas e do comportamento de equipamentos de extração de operação contínua.

2.7.9. Métodos de Isolamento das Proteínas a partir das Fases rica em PEG e rica em Sal

Quanto ao isolamento das proteínas após a extração, esta pode ser realizada por diálise, quando se tratar da fase rica em sal, como é o caso do citocromo b5 e da ascorbato oxidase. Isto permite que estas proteínas sejam facilmente purificadas e concentradas, além deste processo ser economicamente mais interessante.

Quando a proteína de interesse estiver concentrada na fase rica em PEG, necessita-se empregar processos tais como: precipitação com sais, ultrafiltração e cromatografia, para o seu isolamento (Porto, 1998).

CAPÍTULO 3

EQUIPAMENTO

E

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.1. Introdução

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

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 (fosfatos de potássio) e água deionizada, para a extração de 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 de biomoléculas, que ocorre quando é introduzida ao sistema excessiva energia mecânica e agitação extremamente vigorosa.

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

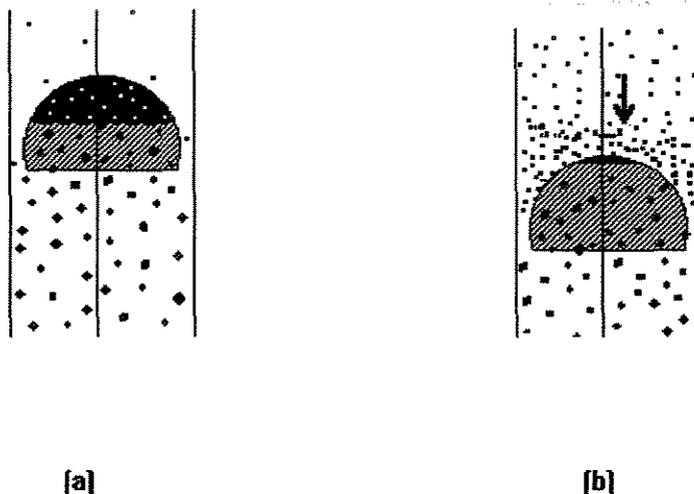


Figura 3.1 - Agitação através de campânulas pulsantes numa coluna de extração líquido-líquido pulsada. (a) campânula parada durante o intervalo entre os pulsos. (b) movimento descendente durante um pulso.

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 através do uso das 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. Quando a campânula sobe, o movimento ascendente faz com que as fases misturem-se ainda mais.

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

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

3.3. Descrição do equipamento

Um esquema da micro-coluna de campânulas pulsantes 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.

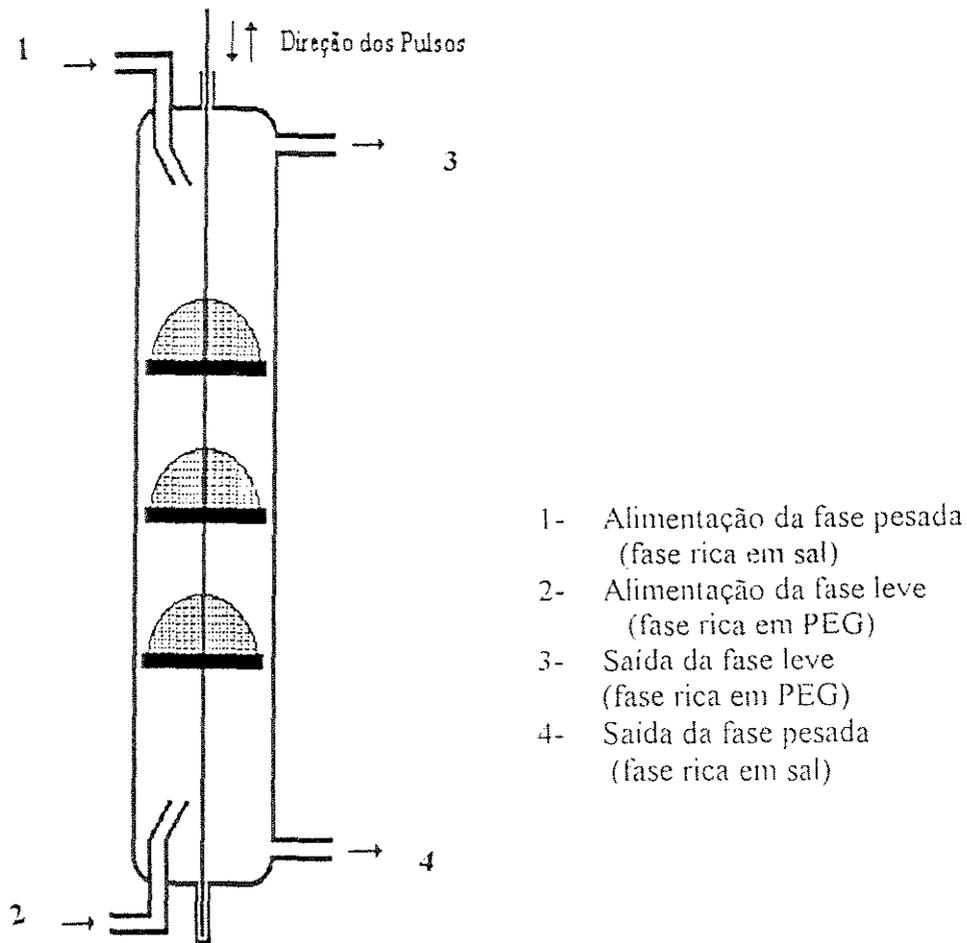


Figura 3.2 - Esquema da micro coluna de campânulas pulsantes.

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 inox, da qual a campânula é construída, tem MESH 24 e, portanto, possui uma área livre para o 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 cm 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 mm e 6,85 mm de diâmetro externo. Na figura 3.4, é mostrada uma fotografia da micro-coluna desenvolvida 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 da 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 $(24 \pm 3) ^\circ\text{C}$.

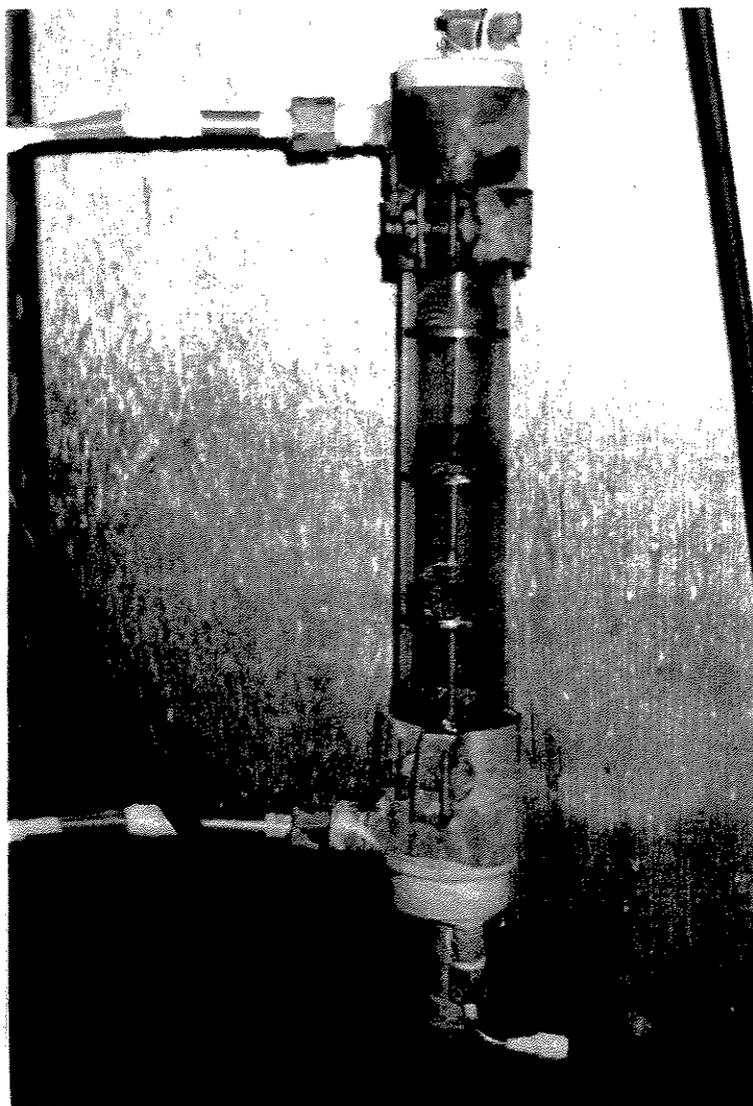


Figura 3.4 - Micro-coluna de campânulas pulsantes.

Na figura 3.5, encontra-se uma fotografia da montagem experimental, composta pela bomba peristáltica, 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, enche-se a micro-coluna com a fase contínua (neste caso, fase rica em sal). Após preenchida toda a micro-coluna, ajusta-se as vazões, através da bomba peristáltica no valor desejado. Ajusta-se também a vazão de saída ou, neste caso, abre-se a saída da fase contínua, já que as entradas e saídas da micro-coluna são controladas pela mesma bomba peristáltica. 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 de líquido na coluna constante. Para controle do nível de líquido no topo da coluna, que deve manter-se 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-se 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 através da visualização das fases no interior do equipamento.

A seguir, aciona-se o sistema de pulsação e ajusta-se a sua frequência no valor desejado. Posteriormente, abre-se a entrada da fase dispersa e inicia-se a alimentação desta fase (neste caso, fase rica em PEG), com a vazão controlada pela bomba peristáltica. Abre-se a saída da fase dispersa, que também é controlada pela bomba peristáltica.

Após este procedimento, inicia-se a contagem do tempo de operação do equipamento e deixa-se a micro-coluna operando por setenta 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). Considerou-se interessante observar o comportamento do sistema por um período de tempo maior, principalmente no estudo da extração de enzimas, onde há a possibilidade de ocorrer a desnaturação.

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 ou outros compostos das células que estejam presentes nos extratos brutos. Esse efeito é minimizado pela diluição do extrato em uma das fases de alimentação da micro-coluna.

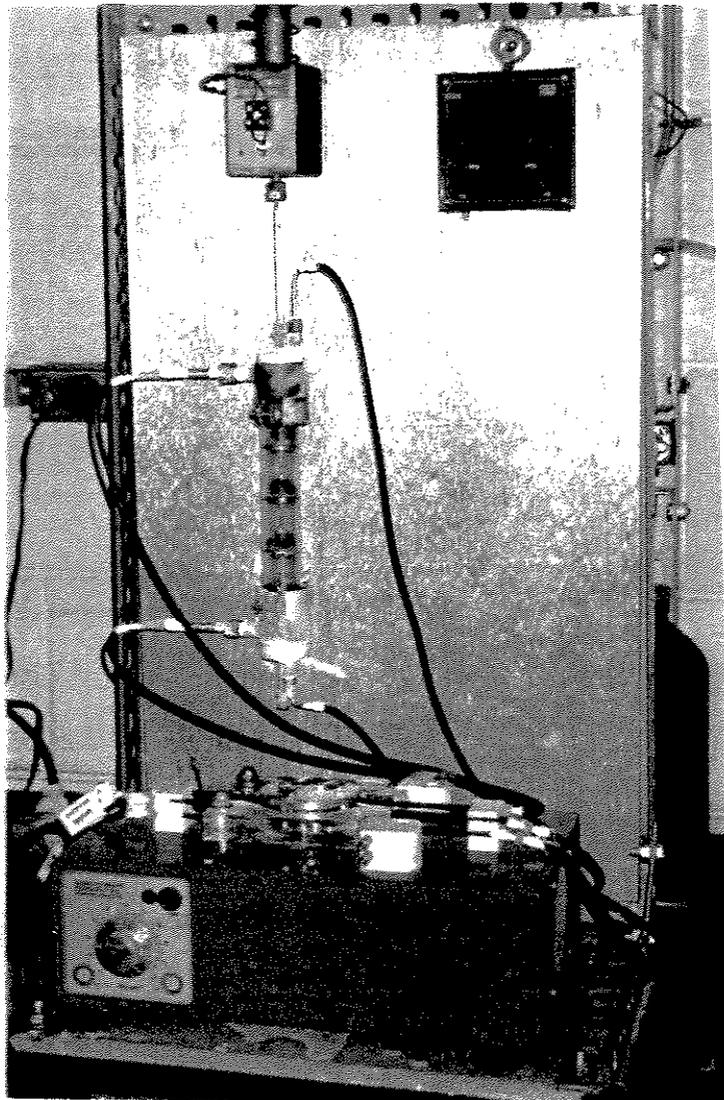


Figura 3.5 - Montagem Experimental

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, através da medida do volume coletado durante um determinado período de tempo. Essas amostras são analisadas posteriormente, para que a concentração de proteína e atividade enzimática sejam obtidas. Com esses dados, pode ser obtido o perfil de concentrações durante a operação do equipamento e os cálculos relativos à transferência de massa podem ser realizados.

Após 70 minutos de operação, termina-se a corrida (tempo de um experimento). Fecha-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 de líquido na coluna. Com este procedimento, calcula-se a fração de retenção da fase dispersa. No próximo item, este procedimento é descrito mais detalhadamente.

Com as medidas das vazões de entrada e de saída das fases de topo e de fundo e concentração de soluto em cada uma destas correntes, faz-se os balanços de massa globais e por componente do sistema. As equações usadas nos balanços de massa encontram-se no Anexo 1.

3.4.1. Procedimento Experimental para a 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 dos seguintes procedimentos:

- Após alcançado o tempo de operação do equipamento e retiradas as amostras, interrompe-se a alimentação das duas fases. Simultaneamente, interrompe-se o mecanismo de pulsação, fecha-se as 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 de líquido e o volume da fase dispersa contidos na micro-coluna, através da drenagem do conteúdo da micro-coluna, que é coletado em uma

proveta graduada. Deixa-se os líquidos em repouso novamente, para que as fases separem-se completamente e posteriormente, anota-se os volumes desejados.

- A fração de retenção da fase dispersa é calculada de acordo com a equação 2.9.

3.4.2. 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 aplicados às equações 2.6, 2.7 e 2.8, que fornecem os valores do coeficiente de transferência de massa, índice de recuperação do soluto e eficiência de separação.

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 foram obtidas através de análises espectrofotométricas, fazendo-se medidas diretas ou usando-se o método de Lowry modificado, ou ainda, medindo-se a atividade enzimática através de métodos específicos.

3.4.2.1. Citocromo b5

Nos experimentos de extração de citocromo b5, a fase na qual o extrato bruto de citocromo b5 entra na coluna, é a fase rica em PEG. Durante a extração, citocromo b5 é transferida para a fase rica em sal. Por isso, neste caso, a corrente que sai pelo topo (fase rica em PEG) é a fase refinado e a fase que sai pelo fundo (fase rica em sal) é a fase extrato. Optou-se por esta direção de transferência, da fase dispersa para a fase contínua, devido aos resultados obtidos nos experimentos em descontínuo, onde verificou-se uma maior tendência do citocromo b5 concentrar-se na fase rica em sal, após atingido o equilíbrio entre as fases.

A fase rica em PEG, na qual se encontra dissolvido o extrato bruto de proteínas, é dispersa na fase contínua, que é constituída pela fase rica em sal.

Devido à disponibilidade de extrato bruto de citocromo b5, a diluição do extrato bruto na fase rica em PEG foi realizada na proporção de 1 g de extrato bruto para 100 mL de fase

rica em PEG. Alguns experimentos foram realizados usando-se a proporção de 10 g de extrato bruto em 100 mL de fase rica em PEG, que é mais utilizada em trabalhos encontrados, como por exemplo Porto (1998). Verificou-se que nesta faixa de concentrações, não houve variação dos resultados de extração, ao comparar experimentos com as duas proporções de diluição.

Escolheu-se a fase rica em PEG como sendo a fase dispersa, com base em trabalhos anteriores que mostram ser esta condição mais favorável ao processo de extração.

Nas corridas de extração de citocromo b5, as amostras foram coletadas aos 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60 e 70 minutos de operação da micro-coluna.

3.4.2.2. Ascorbato oxidase

Nos experimentos de extração da ascorbato oxidase, a fase na qual o extrato bruto contendo a ascorbato oxidase entra na coluna é a fase rica em PEG e é transferida para a fase rica em sal. Assim, a corrente que sai pelo topo da micro-coluna (fase rica em PEG) é a fase refinado e a fase que sai pelo fundo da micro-coluna (fase rica em sal) é a fase extrato. Novamente, a fase rica em PEG é a fase dispersa e a fase rica em sal é a fase contínua. Assim, a transferência de massa também ocorre da fase rica em PEG para a fase rica em sal, isto é, da fase dispersa para a fase contínua.

Devido à maior disponibilidade de extrato bruto contendo a enzima ascorbato oxidase, a proporção usada para a diluição do extrato bruto na fase rica em PEG foi de 10 g de extrato bruto em 100 mL de fase rica em PEG.

Nestas corridas, as amostras foram coletadas aos 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70 minutos de operação da micro-coluna.

3.5. 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 a obtenção de eficiências mais elevadas. A tabela 3.1 apresenta as variáveis que foram avaliadas e seus respectivos valores.

Tabela 3.1 - Variáveis estudadas neste trabalho, relativas à operação da micro-coluna.

Variáveis estudadas	Valores assumidos
Vazão Total de Alimentação (mL/min)	4,7; 6,5; 10,9
Frequência de pulsação (pulsos/segundo)	0,1; 0,143; 0,2; 0,33; 1,0
Razão entre as Vazões das Fases (V_d/V_c)	aproximadamente 1

A razão entre as vazões da fase leve e pesada foi mantida constante porque a entrada de ambas as fases na coluna foi realizada por uma mesma bomba peristáltica.

Nos experimentos em descontínuo, variou-se a composição dos sistemas de duas fases aquosas a fim de 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, item 4.2.1.

Para uma série de experimentos, variou-se as linhas de amarração para sistemas formados com PEG 1000, com a finalidade de verificar a influência da concentração de PEG e dos sais na operação da micro-coluna. Nestes experimentos, foi estudada apenas a hidrodinâmica através da avaliação da fração de retenção da fase dispersa. Os valores das concentrações de PEG e sal usados nestes experimentos foram:

PEG 1000 / fosfatos de potássio (% p/p): 16,2 / 14,3

17,7 / 15,7

19,7 / 17,7

Estes sistemas foram preparados de modo a obter-se pH 7,0. Nestes experimentos, não se avaliou a transferência de massa.

CAPÍTULO 4

MATERIAIS

E

MÉTODOS

4.1. Introdução

No Capítulo anterior, foi apresentado o equipamento e os procedimentos de operação da micro-coluna.

Neste Capítulo, são apresentados os materiais usados no trabalho e os métodos usados para a obtenção dos extratos impuros, métodos analíticos para a obtenção da concentração de proteínas e da atividade enzimática e métodos de preparo dos sistemas de duas fases aquosas e os procedimentos usados nos experimentos em descontínuo.

4.2. Preparação dos Sistemas de Duas Fases Aquosas

4.2.1. Processos de 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 desejadas de PEG, sal e água fossem obtidas. Para obter-se o pH desejado, deve-se colocar as proporções adequadas entre os sais de fosfato mono e bibásico. A relação entre o pH e a proporção entre os sais encontram-se na tabela 4.1.

Tabela 4.1 - pH das soluções de sais 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	0,64
7,4	0,24
8,0	0,06

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

Foram utilizados sistemas de duas fases aquosas com as concentrações de polímeros e sais apresentadas na tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Composição dos sistemas de duas fases aquosas PEG-Fosfatos de Potássio usados na extração de proteínas.

Massa Molecular do PEG (Da)	PEG / Fosfatos de Potássio (%p/p)			
	Linhas	de Amarração		
	0	1	2	3
400	*	16,7 / 14,8	17,7 / 15,7	19,7 / 17,7
1000	*	16,2 / 14,3	17,7 / 15,7	19,7 / 17,7
1500	*	16,2 / 14,3	17,7 / 15,7	19,7 / 17,7
3350	*	14,0 / 11,8	17,7 / 15,7	19,7 / 17,7
8000	11,8 / 9,8	14,0 / 11,8	•	•

- * Sistemas homogêneos - formação de uma única fase.
- Não foi possível a dissolução dos componentes das fases.

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 (1986).

4.2.2. Processos de Extração em Contínuo

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 setenta minutos e o preenchimento da micro-

coluna com a fase rica em sal. A razão de sais mono e bíbásico foi determinada de modo a obter-se um pH 7,0 para os experimentos com o citocromo b5 e pH 6,0 para os experimentos com a ascorbato oxidase. As fases foram deixadas em repouso de um dia para o outro em um decantador e então, cada fase foi cuidadosamente removida e estocada separadamente, para posterior uso na micro-coluna. As fases rica em PEG e rica em sal foram estocadas por aproximadamente 15 dias, no máximo. Os extratos impuros de citocromo b5 e de ascorbato oxidase foram dissolvidos na fase rica em PEG.

4.3. Procedimento para os Experimentos de Partição em Sistemas de Duas Fases Aquosas (Extração em Descontínuo)

Para a determinação da partição nos experimentos em descontínuo, adiciona-se ao sistema preparado da maneira descrita no item 4.2.1, 500 μL (aproximadamente 0,5 g) de uma solução do extrato impuro contendo a proteína ou enzima em estudo, a qual deseja-se extrair. Mistura-se a amostra em “vórtice” por um minuto. Para a extração do citocromo b5, deixa-se a amostra em repouso de um dia para o outro (aproximadamente 18 horas) para que o sistema atinja o equilíbrio. Para a extração da ascorbato oxidase, a amostra é centrifugada por 15 minutos a 1000 rpm, para que o sistema atinja o equilíbrio e as fases sejam separadas. Optou-se pelo uso da centrifugação a fim de minimizar a desnaturação da enzima ascorbato oxidase, já que a separação das fases através do uso da centrífuga é bem mais rápida.

Em seguida, as amostras de ambas as fases foram retiradas cuidadosamente com auxílio de uma seringa ou pipeta de Pasteur. A quantidade de proteína total, de uma proteína em particular e, no caso das enzimas, da atividade enzimática foram determinadas através dos métodos adequados, que são descritos a seguir.

Estes experimentos foram realizados utilizando-se vários comprimentos das linhas de amarração para diferentes massas moleculares de PEG. Essas condições já foram descritas no item 4.2.1. O pH 7,0 foi utilizado para os experimentos de partição de citocromo b5 e o pH 6,0 para os de ascorbato oxidase.

Os experimentos de extração em descontínuo foram realizados a temperatura ambiente, que foi mantida em aproximadamente (24 ± 3) °C.

4.4. Métodos Analíticos

4.4.1. Determinação da Concentração de Citocromo b5

A concentração de citocromo b5 foi determinada diretamente a partir do seu coeficiente de absorção a 411 nm ($\epsilon = 130 \text{ (mmol/L)}^{-1}\text{cm}^{-1}$), uma vez que absorve luz fortemente a este comprimento de onda. Este método foi usado uma vez que é extremamente simples, rápido e não destrutivo, a amostra de citocromo b5 analisada não é inutilizada após a medida da absorbância, podendo ser utilizada em outras análises (Porto, 1998).

$$\text{concentração de citocromo b5 (mg/L)} = (A_{411} \times 13600) / 130$$

$$\text{Massa molecular de citocromo b5} = 13600$$

$$A_{411} = \text{absorbância a 411 nm}$$

$$\epsilon = 130 \text{ m(mol/L)}^{-1}\text{cm}^{-1} \text{ (coeficiente de extinção)}$$

4.4.2. Determinação de Proteína Total - Método de Lowry Modificado

Na medida da concentração de proteína total, usou-se este método a fim de minimizar as interferências dos componentes formadores das fases, nas medidas realizadas. Foi necessária a obtenção da concentração de proteína total para o cálculo do fator de purificação, que é uma medida do grau de purificação da amostra em relação ao extrato protéico impuro.

O método de Lowry modificado foi escolhido porque ele fornece bons resultados, mesmo na presença de certos compostos químicos, o que não acontece com outros métodos.

O método de Lowry (Lowry et al, 1951) é baseado na formação de um complexo de cobre-proteína capaz de efetuar a redução do reagente de fenol de Folin-Ciocalteau através de resíduos de tirosina e triptofano. A presença deste complexo gera um composto de cor azulada podendo ser detectado por um espectrofotômetro usando a faixa de 720 a 750 nm (luz visível), como comprimento de onda. Neste trabalho, usou-se o comprimento de onda igual a 750 nm.

O método, que será aplicado para a determinação protéica, é um método modificado por Pires et al (1993), pela introdução de uma hidrólise prévia com hidróxido de sódio e de uma centrifugação antes da leitura espectrofotométrica.

As soluções utilizadas foram:

- 1- Solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/L;
- 2- Solução de carbonato de sódio a 2% (p/v);
- 3- Solução de tartarato duplo de sódio e potássio a 1% contendo 5% (p/v) de sulfato de cobre;
- 4- Solução de trabalho contendo 50 mL da solução (2) e 1 mL da solução (3);
- 5- Reagente de Folin-Ciocalteau diluído 1:2.

Metodologia aplicada :

Em tubos de ensaio contendo 0,3 mL de amostra é adicionado um volume idêntico de hidróxido de sódio 0,1 mol/L. Após agitação em vórtice, são deixados em repouso, a temperatura ambiente, durante 30 minutos. Em seguida, são adicionados 3 mL da solução de trabalho (4) e após nova agitação em vórtice, mantidos em repouso, a temperatura ambiente, durante 10 minutos. Após este período, são adicionados 0,3 mL do reagente de Folin (solução 5) seguido de nova agitação e mantidos novamente em repouso, nas mesmas condições, durante 30 minutos. Terminado o período de repouso, a mistura é centrifugada a 2397 g durante 10 minutos para separação das fases (Carneiro-da-Cunha, 1995).

4.4.3. Determinação da Atividade da Ascorbato oxidase

A atividade da ascorbato oxidase foi realizada segundo metodologia descrita por Carvalho et al (1981), a qual utiliza o ácido ascórbico 50 $\mu\text{(mol/L)}$ em tampão citrato-fosfato 0,1 mol/L e pH 6,0 como substrato.

O sistema de reação continha 675 μL do tampão contendo o substrato e 25 μL da solução contendo a enzima. O consumo de substrato foi acompanhado em espectrofotômetro durante 15 minutos, sendo a absorbância determinada a 268 nm e registrada de 1 em 1 minuto. Uma unidade de atividade equivale à oxidação de 1,0 μmol de L-ascorbato para dehidroascorbato por minuto a pH 6,0 e a temperatura de 25 °C, acompanhada pela leitura da absorbância a 268 nm, sendo expressa em μmol de ácido ascórbico / minuto. A atividade específica é calculada pela razão entre a atividade total e a quantidade de proteínas contidas em 1 mL de amostra [$\mu\text{(mol/L)/min.mg}$] (Porto, 1998).

Em detalhes, o procedimento de leitura no espectrofotômetro é o seguinte: o aparelho é zerado, com o branco (tampão + extrato enzimático), depois em uma outra cubeta, adiciona-se o substrato (tampão + ácido ascórbico) e o extrato enzimático (solução que contém a enzima) e a cada 1 minuto, faz-se a leitura da absorbância e registra-se esta leitura, em um tempo total de 15 minutos para cada amostra.

Como a ascorbato degrada o ácido ascórbico, a absorbância vai diminuindo ao longo do tempo. Com estas leituras, traça-se uma reta e faz-se uma regressão linear, onde o coeficiente angular da reta multiplicado pela concentração inicial de ácido ascórbico nos dá exatamente a velocidade de degradação do ácido ascórbico por minuto [$\mu\text{(mol/L)/min}$]. Quando determina-se a concentração de proteína total e divide-se a atividade total [$\mu\text{(mol/L)/min}$] pela concentração de proteína, tem-se a atividade específica [$\mu\text{(mol/L)/min.mg}$].

4.4.4. Tampão Citrato - pH 6,0

Pesar 14,239 g de fosfato bibásico de sódio e diluir em água deionizada, obtendo-se 800 mL de solução.

Pesar 6,333 g de ácido cítrico e diluir em água deionizada, obtendo-se 200 mL de solução.

Misturar as duas soluções. A concentração final da solução fosfato e da solução citrato é 0,1 mol/L.

4.4.5. Produção de Citocromo b5

- Meio de manutenção da *E. coli*

O meio de manutenção da estirpe de *Escherichia coli* foi o meio LB - Lurian-Bertani, que quando acrescido de 2,0 % (p/v) ágar, constituiu o meio sólido de crescimento e manutenção da amostra de *E. coli*. Todos os componentes, com exceção da ampicilina, foram esterilizados em autoclave a temperatura de 121 °C e 1 atm de pressão durante 20 minutos. Após o resfriamento dos meios, foi adicionado uma solução de ampicilina (100 mg/ml) esterilizada por filtração com auxílio de filtro 0,22 µm (Milipore), perfazendo uma concentração final de 100 µg/mL.

- Produção de citocromo b5 e ruptura celular

O citocromo b5 foi produzido por fermentação utilizando o meio comercial LB (Lurian-Bertani), suplementado com o antibiótico ampicilina (100 µg/mL). A fermentação foi realizada em erlenmeyers de 2 litros com um volume útil de 1 litro, utilizando um agitador orbital a 200 rpm, a uma temperatura de 37 °C por 24 horas. O inóculo (100 mL de cultura) foi obtido da cultura crescida por 10 horas, a partir de colônias retiradas de uma placa de Petri recente.

A ruptura celular das células foi realizada com um sonicador Labsonic 2000 da Bbraum, a 70 W, em três ciclos intermitentes de 1 minuto. O homogenato assim obtido, contendo fragmentos celulares, foi dividido em alíquotas e armazenado a - 20 °C para subsequente utilização (Porto, 1998).

4.4.6. Produção da Ascorbato oxidase

A extração da ascorbato oxidase foi realizada a partir da *Curcubita maxima*, regionalmente chamada de abóbora, de acordo com a metodologia descrita por Carvalho et al (1981), que se constitui dos seguintes passos :

- a abóbora descascada foi cortada em fatias e pesada, em seguida a amostra foi lavada com água deionizada contendo EDTA 2 mmol/L;

- após esta lavagem, a amostra foi triturada com tampão citrato-fosfato (0,1 mol/L, pH 6,0, EDTA 2 mmol/L), na proporção 1,5 mL por grama de abóbora;

- posteriormente, o homogenato obtido foi filtrado em gaze, o filtrado foi centrifugado a 13000 x g por 5 minutos, com a finalidade de remover os resíduos celulares. O filtrado foi estocado em vidro âmbar a - 20 °C para posterior utilização (Porto, 1998).

4.5. Materiais

4.5.1. Proteínas

4.5.1.1. Citocromo b5

O citocromo b5 foi produzido por fermentação de uma amostra recombinante de *Escherichia coli* (TB1) contendo o gene que codifica para esta proteína no plasmídeo pUC 13 (von Bodman et al, 1986).

4.5.1.2. Ascorbato oxidase

A ascorbato oxidase (ascorbic oxidoreductase, E.C.1.10.3.3) foi extraída da *Curcubita maxima*, conhecida, regionalmente, como abóbora.

4.5.1.3. Albumina de Soro Bovino

A albumina de soro bovino (BSA) foi fornecida pela Sigma. Usou-se BSA nas calibrações do espectrofotômetro com o método de Lowry modificado.

4.5.2. Outros Reagentes

4.5.2.1. Polímeros

Os polímeros usados para a formação dos sistemas de duas fases aquosas são : Polietilenoglicol (PEG) 400, 1000, 3350 e 8000, fornecidos pela Sigma e utilizados sem qualquer purificação parcial. O PEG 1500, também utilizado, é fornecido pela Synth. O PEG 1500 também foi utilizado sem qualquer purificação parcial. Todos os polímeros tinham grau de pureza comercial.

4.5.2.2. Sais

Para a formação dos sistemas de duas fases aquosas, os sais usados são : hidrogenofosfato e di-hidrogenofosfato de potássio, também conhecidos como fosfato de potássio mono e bibásico, respectivamente, de grau analítico, fornecidos pela Ecibra e Synth, respectivamente.

4.5.2.3. Produção de Citocromo b5

- Meio de Lurian-Bertani fornecido pela Sigma,
- Ágar fornecido pela Difco,
- Ampicilina fornecida pela Boehringer Mannheim.

4.5.2.4. Extração de Ascorbato oxidase

- Citrato de sódio fornecido pela Reagen (grau analítico),
- Fosfato de sódio bibásico fornecido pela Cica-Kanto (grau analítico),
- EDTA (ácido etilenodiaminoacético) fornecido pela Vetec (grau analítico).

4.5.2.5. Determinação de Proteínas - Método de Lowry Modificado

- Hidróxido de sódio fornecido pela Synth (grau analítico),

- Carbonato de sódio fornecido pela Ecibra (grau analítico),
- Tartarato duplo de sódio e potássio fornecido pela Ecibra (grau analítico),
- Sulfato de cobre fornecido pela Ecibra (grau analítico),
- Reagente de Folin-Ciocalteu fornecido pela Dinâmica (grau comercial).

4.5.2.6. Determinação da Atividade da Ascorbato oxidase

- Ácido ascórbico é fornecido pela Vetec (grau analítico),
- Di-hidrogenofosfato de sódio (fosfato de sódio bibásico) é fornecido pela Synth (grau analítico),
- Citrato de sódio é fornecido pela Reagen (grau analítico).

4.6. Cálculos

4.6.1. Determinação da Fração de Retenção da Fase Dispersa

Nos experimentos de extração em contínuo, como descrito no item 3.4.1 do Capítulo 3, em condições operacionais pré-estabelecidas, foi determinada a fração de retenção da fase dispersa (fase rica em PEG) pelo método das interrupções simultâneas (método do estancamento). Com esta técnica, obteve-se a fração de retenção da fase dispersa média, que foi calculada usando-se a equação 2.9:

$$\phi = \text{Volume da fase dispersa} / \text{Volume total contido na coluna} \quad (2.9)$$

4.6.2. Determinação do Coeficiente de Partição das Proteínas (K)

A distribuição de proteínas entre as fases de um sistema de duas fases aquosas é caracterizada pelo coeficiente de partição, que é calculado usando-se a equação 2.22:

$$K = C_t / C_b \quad (2.22)$$

Onde : C_t e C_b são as concentrações de proteína nas fases do topo (fase leve) e do fundo (fase pesada), respectivamente.

Para o caso de enzimas, como a ascorbato oxidase, o coeficiente de partição é expresso em termos da atividade enzimática nas fases do topo e do fundo.

4.6.3. Determinação do Coeficiente de Transferência de Massa (k_{da})

O coeficiente de transferência de massa é determinado em termos da concentração de soluto nas fases dispersa e contínua, de acordo com a equação 2.6:

$$k_{da} = \frac{Q}{V} \ln \left[\frac{C_{ent} - KC_{fc}}{C_{sai} - KC_{fc}} \right] \quad (2.6)$$

Onde: k_{da} , Q , V , C_{ent} , C_{sai} e K representam respectivamente, o coeficiente de transferência de massa, a vazão da fase dispersa, o volume da fase contínua que permanece na micro-coluna, a concentração de proteína na corrente de entrada da fase dispersa, a concentração de proteína na corrente de saída da fase dispersa e o coeficiente de partição da proteína. O valor utilizado para C_{fc} , foi o valor médio entre a concentração final da fase contínua e o valor inicial na mesma fase, isto é, o valor de C_{fc} é a metade do valor da concentração de proteína determinada na fase contínua, pois o valor inicial na fase contínua é zero.

4.6.4. Determinação do Fator de Purificação (FP)

O fator de purificação é definido como a razão entre a atividade (U/mL) e a concentração de proteína no produto final (após a purificação), dividido pela mesma razão determinada para o extrato impuro, como é mostrado a seguir:

$$FP = \frac{\left(\text{Atividade enzimática} / \text{concentração de proteína total} \right)_{\text{após a separação/extração}}}{\left(\text{Atividade enzimática} / \text{concentração de proteína total} \right)_{\text{no extrato antes da extração/amostra de alimentação}}}$$

A atividade enzimática ou a concentração da proteína de interesse e a concentração de proteína total, após a purificação, referem-se a uma das duas fases. Nos casos estudados neste trabalho, foram relativas à fase rica em sal, porque esta foi a fase usada como solvente e na qual a proteína de interesse concentrou-se.

Para os ensaios com o citocromo b5, o cálculo do fator de purificação é realizado de acordo com a seguinte expressão:

$$FP = \frac{\left(\text{Concentração de citocromo b5} / \text{concentração de proteína total} \right)_{\text{após a separação/extração}}}{\left(\text{Concentração de citocromo b5} / \text{concentração de proteína total} \right)_{\text{no extrato antes da extração/amostra de alimentação}}}$$

4.6.5. Cálculo da Eficiência de Extração e do Índice de Recuperação do Soluto

A eficiência de extração é obtida pela seguinte equação 2.8:

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

Onde: y_f é a fração molar de soluto na alimentação, y_r é a fração molar de soluto na fase refinado, y_r^* é a fração molar de soluto na fase refinado obtida no experimento em descontínuo, onde o sistema atinge o equilíbrio.

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

$$E^* = (C_f - C_r) / (C_f - C_r^*) \quad (2.8 a)$$

Onde: C_f é a concentração de soluto na alimentação, C_r é a concentração de soluto na fase refinado, C_r^* é a concentração de soluto na fase refinado obtida no experimento em descontínuo, onde o sistema atinge o equilíbrio.

Esta definição de eficiência de separação avalia o quanto o sistema se aproxima do equilíbrio, que supõe-se seja atingido nos experimentos em descontínuo. Portanto, é uma comparação entre a extração em contínuo e em descontínuo.

Também é calculado o “Índice de Recuperação do Solute” ou seja, a percentagem de extração de proteína, de acordo com a equação 2.7:

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

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, a equação usada foi:

$$I_r = (C_f - C_r) / C_f \quad (2.7 a)$$

Onde: C_f é a concentração de soluto na alimentação, C_r é a concentração de soluto na fase refinado.

4.6.6. Massa Específica e Viscosidade dos Sistemas PEG/Sal

No Anexo 2, encontram-se os dados relativos aos sistemas PEG/fosfatos usados neste trabalho. Os valores dessas propriedades foram obtidos da literatura. As medidas não foram realizadas devido à indisponibilidade dos equipamentos necessários.

Os procedimentos para a realização dessas medidas são apresentados a seguir.

A determinação da massa específica para as fases rica em PEG e rica em sal para os diversos sistemas PEG / Sais estudados pode ser realizada em um densitômetro PAAR DMA 6000. A água e o ar são utilizados como fluidos de calibração, de acordo com o procedimento indicado pelo fabricante. As determinações de massa específica são efetuadas com controle de temperatura. Os valores encontrados a partir da literatura foram obtidos a 25 °C.

A viscosidade das fases rica em PEG e rica em sal pode ser determinada com um viscosímetro capilar Tipo Ubbelohde (CANNON INSTRUMENT CO), tamanho 1C cuja constante a 25 °C é de 0,02794 mm²/s² (cSt/s). Para obter a viscosidade cinemática em mm²/s² (cSt/s) multiplica-se o tempo de efluxo em segundos pela constante do viscosímetro. Para obter a viscosidade em mPa.s, multiplica-se a viscosidade cinemática pela massa específica em g/mL.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS

E

DISCUSSÃO

5.1. Introdução

Nos Capítulos anteriores, foram abordados a teoria envolvida no processo estudado, os materiais e métodos usados no trabalho, além de serem apresentados o equipamento desenvolvido e os cálculos realizados.

No Capítulo 2, foram apresentados exemplos do uso de sistemas de duas fases aquosas em processos de extração em colunas que operam em contínuo. Estes processos são, na maioria dos casos, economicamente mais interessantes do que os que operam em descontínuo.

Neste Capítulo, são apresentados os resultados obtidos experimentalmente e as tendências observadas no comportamento do sistema. Dividiu-se este Capítulo em duas partes: a análise da extração em descontínuo (partição de proteínas) e a análise da extração líquido-líquido em contínuo na micro-coluna de campânulas pulsantes, a qual é subdividida em estudos da hidrodinâmica e da transferência de massa. Neste trabalho, avalia-se a influência de diferentes variáveis operacionais e de composição das fases no comportamento do sistema e no desempenho do equipamento estudado. Sistemas PEG-Fosfatos de Potássio foram utilizados, sendo que a fase pesada (fase rica em sal) era a fase contínua e a fase leve (fase rica em PEG) era a fase dispersa.

No estudo da extração em descontínuo, avaliou-se o coeficiente de partição e o fator de purificação.

No estudo da extração contínua, quanto à hidrodinâmica, avaliou-se a fração de retenção da fase dispersa, a velocidade característica e a inundação. Quanto à transferência de massa, avaliou-se o Índice de Recuperação do Solute (percentagem de proteína extraída), Eficiência de Separação e Coeficiente de Transferência de Massa. A transferência de citocromo b5 e de ascorbato oxidase da fase dispersa para a fase contínua foi estudada, analisando o efeito da frequência de pulsação e da vazão total das fases nos resultados experimentais. Estes parâmetros constituem fatores determinantes para a transferência da proteína e desempenho do equipamento. As proteínas foram extraídas a partir de seus extratos brutos.

Todas as equações envolvidas nestas análises já foram apresentadas nos Capítulos anteriores.

A metodologia do planejamento experimental (Barros Neto et al, 1996) foi aplicada a fim de verificar-se a influência de cada variável e da interação entre as variáveis no comportamento do sistema.

5.2. Extração em Descontínuo (Partição de Proteínas)

A extração descontínua foi estudada a fim de encontrar as condições relativas ao sistema de duas fases aquosas, que levassem à obtenção dos melhores resultados de extração. As condições analisadas foram: comprimento da linha de amarração (concentração de PEG e sais - fosfatos de potássio) e massa molecular do polímero usado (PEG). A melhor condição de extração é aplicada na extração de proteínas em contínuo, na micro-coluna de campânulas pulsantes. Além disso, foram obtidos dados da extração em descontínuo, onde o equilíbrio entre as fases foi atingido, visando uma posterior comparação com os resultados da extração em contínuo.

A proteína citocromo b5 e a enzima ascorbato oxidase foram selecionadas como proteínas de estudo, devido à disponibilidade dos extratos impuros destas proteínas e à diferença entre as suas massas moleculares, já que a avaliação das condições de extração e do desempenho da micro-coluna de campânulas pulsantes com proteínas de massas moleculares distintas era um dos objetivos do trabalho. Citocromo b5 é uma proteína pequena de massa molecular 13600 Da e a ascorbato oxidase é uma enzima maior, de massa molecular 150000 Da.

Os experimentos foram realizados em duplicata, na maioria dos casos.

5.2.1. Extração de Citocromo b5

Foram realizados estudos da extração de citocromo b5 em descontínuo, visando encontrar as condições nas quais uma maior extração de citocromo b5 em uma das fases seja alcançada. Isto é, as condições nas quais os maiores ou menores coeficientes de partição sejam obtidos. Adicionalmente, tem-se como objetivo a obtenção de dados de extração em

descontínuo, onde supõe-se que o equilíbrio tenha sido atingido, para a comparação entre os processos de extração líquido-líquido em contínuo e descontínuo.

Neste estudo foram avaliadas a influência do comprimento da linha de amarração (concentração de PEG e Sal - Fosfatos de Potássio) e da massa molecular do PEG. Na tabela 4.2 do Capítulo 4, encontram-se os valores das variáveis usadas neste trabalho.

Nos ensaios com o citocromo b5, usou-se o pH 7,3, que de acordo com Sarmento et al (1994), mostrou-se um dos mais adequados aos processos de extração desta proteína. Em pH 7,3, o citocromo b5 ($pI = 4,4$) está com uma relativa alta carga negativa.

Nos primeiros ensaios, estudou-se a transferência de citocromo b5 a partir de seu extrato impuro, sem avaliar a transferência de proteína total. Há uma grande quantidade de outros compostos e outras proteínas presentes no extrato impuro, além da proteína de interesse.

Outro fator que motivou a escolha de citocromo b5 foi como proteína de estudo, foi a simplicidade de sua análise quantitativa.

Nesta etapa do trabalho, apenas o comportamento da partição de citocromo b5 entre as fases é avaliado. Assim, o coeficiente de partição (K), calculado através da equação 2.22, é a única grandeza analisada.

Para uma melhor visualização do comportamento da partição do citocromo b5 do sistema, optou-se pelo uso de $\log K$ na Figura 5.1. Os valores de $\log K$ negativos indicam a tendência de concentração da proteína de interesse na fase inferior (rica em sal) e os valores de $\log K$ positivos indicam a tendência de concentração da proteína de interesse na fase superior (rica em PEG).

Se a proteína tem partição preferencial para a fase rica em PEG, isto deve-se provavelmente a fortes interações hidrofóbicas entre a proteína e os grupos etílenos do PEG (Porto, 1998). Nos casos em que há uma tendência da partição preferencial da proteína para a fase rica em sal, assume-se que isto ocorre devido à natureza hidrofílica da proteína, sugerindo que esta possui relativamente mais grupos polares, os quais interagem com o sal.

Deve ser ressaltado que com o PEG 400, ao misturar o extrato protéico ao sistema de duas fases aquosas, não foi observada a formação de duas fases, com a linha de amarração 1, que é a mais curta (PEG/Sal - 16,7/14,8). Neste caso, houve o aparecimento de uma única fase homogênea. Os sistemas formados com PEG 400, que foram estudados, formavam duas fases aquosas antes do extrato protéico ser adicionado ao sistema. Contudo, deixavam de formar duas fases, gerando uma única fase homogênea, após a introdução do extrato protéico no sistema, principalmente com a linha de amarração 1, que era a mais curta.

5.2.1.1. Influência da Massa Molecular do PEG no Coeficiente de Partição

A partição do citocromo b5 em sistemas de duas fases aquosas formados por PEG-Sais de fosfatos foi estudada através da adição de 500 μ L de extrato bruto da proteína, nos diferentes sistemas. O procedimento experimental adotado é descrito em mais detalhes no Capítulo 4.

Observa-se na figura 5.1 que ocorre uma diminuição do coeficiente de partição com o aumento da massa molecular do PEG. Com o PEG 400, o citocromo b5 concentra-se principalmente na fase superior (rica em PEG). Com PEG de massas moleculares maiores, o citocromo b5 concentra-se principalmente na fase rica em sal.

A diminuição do coeficiente de partição do citocromo b5 com o aumento da massa molecular do PEG nos sistemas PEG-fosfatos tem sido descrita por vários autores.

A influência da massa molecular do polímero pode ser atribuída ao maior número de grupos hidrofílicos terminais nas cadeias de PEG mais curtas, o que reduz a hidrofobicidade global e aos efeitos de volume excluído, que aumentam com o aumento da massa molecular do polímero (Sarmiento et al, 1994; Huddleston et al, 1991).

Isto justifica os altos coeficientes de partição observados em sistemas formados com o PEG de massa molecular 400. Neste caso, sendo a fase rica em PEG menos hidrofóbica, o citocromo b5, que é uma proteína hidrofílica, torna-se mais solúvel nesta fase.

O PEG é um polímero composto por grupos $-CH_2-CH_2-$ ligados entre si por uma ligação éter (Porto, 1998) e que possui um grupo hidroxila ($-OH$) ligado a cada um dos grupos $-CH_2-CH_2-$ terminais. Assim, é esperado que a sua hidrofobicidade diminua com a diminuição da massa molecular, uma vez que aumenta a representação dos grupos hidrofílicos terminais (Kula, 1985).

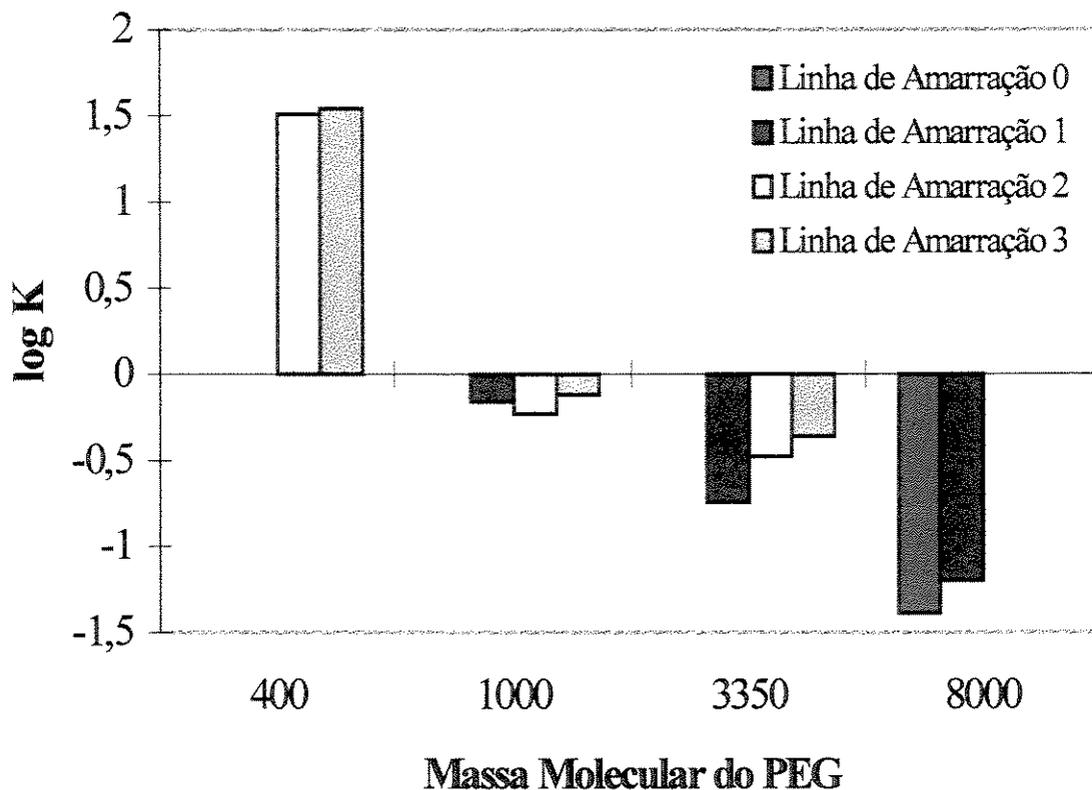


Figura 5.1 - Comportamento da partição de citocromo b5 em sistemas de duas fases aquosas PEG-Fosfatos de potássio, em pH 7,3, na extração em descontínuo.

Segundo Eiteman e Gainer (1989), Ogston e Phelps (1960) observaram que a presença de polímeros em solução cria “cavidades”, nas quais as moléculas de soluto podem se ajustar ou alojar. De acordo com estas observações, pode-se considerar que em sistemas de duas fases aquosas, a partição de um soluto pode estar relacionada ao volume de “cavidades” produzidas pela presença do polímero. Se a massa específica de uma solução formada por uma solução de referência acrescida de PEG, por exemplo, é menor do que a da solução de

referência, as moléculas de água estão mais “livres” e a quantidade de “volume livre” aumenta. Por outro lado, se a massa específica for maior, as moléculas na solução estão mais “empacotadas”, implicando na diminuição do volume livre. Como as fases dos sistemas de duas fases aquosas são compostas predominantemente por água, a diferença de volume livre pode ser uma indicação do número relativo de “cavidades” entre as fases. Se o coeficiente de partição está relacionado ao número dessas “cavidades”, então quanto maior for a diferença de volume livre, maior deveria ser o coeficiente de partição.

A solubilidade das proteínas em soluções de PEG tem sido interpretada por vários autores em termos dos efeitos do volume excluído do polímero (Polson et al, 1964; Atha et al, 1981). Segundo esta teoria, as proteínas são excluídas estericamente de regiões do solvente ocupadas pelo polímero, sendo que as solubilidades são proporcionais ao volume de solvente disponível (solvente sem PEG). Portanto, quanto maior for o volume excluído do PEG, menor é o volume de solvente disponível, o que significa uma diminuição da solubilidade das proteínas na fase rica em polímero e conseqüentemente, uma diminuição do coeficiente de partição (Porto, 1998).

Isto justifica a diminuição do coeficiente de partição com o aumento da massa molecular do polímero.

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

Os efeitos decorrentes de variações da massa molecular do PEG na partição de proteínas podem ser usados para análise da separação de misturas de biomoléculas com diferentes massas moleculares.

5.2.1.2. Influência do Comprimento da Linha de Amarração no Coeficiente de Partição

Pode ser verificado na figura 5.1, que o coeficiente de partição aumenta com o aumento do comprimento da linha de amarração. O aumento do comprimento da linha de amarração ocorre com o aumento das concentrações de PEG e de sal do sistema de duas fases aquosas. O aumento do coeficiente de partição mostra uma tendência do citocromo b5 transferir-se da fase rica em sal para a fase rica em PEG. O coeficiente de partição é o quociente entre a concentração de proteína na fase do topo (rica em PEG) e a concentração de proteína na fase do fundo (rica em sal).

O aumento do coeficiente de partição com o aumento do comprimento da linha de amarração pode ser atribuído, principalmente, ao efeito de “salting out”.

Sarmiento et al (1994) também observaram o aumento do coeficiente de partição com o aumento do comprimento da linha de amarração, na partição de citocromo b5 em sistemas de duas fases aquosas formados por PEG-sal (fosfatos de potássio).

A elevação do coeficiente de partição com o aumento no comprimento da linha de amarração pode ser atribuído a mudanças na composição relativa das fases. Um aumento no comprimento da linha de amarração promove um crescimento na concentração de fósforo na fase inferior enquanto que na fase superior, ela permanece relativamente constante e igual à sua solubilidade limite no PEG. Isso provoca o “salting out” de proteínas da fase rica em sal (fosfato de potássio) para a fase rica em PEG, mediada pelos efeitos de volume excluído do PEG. No limite, as proteínas precipitam (Sarmiento et al, 1994). É devido a esses efeitos que muitas vezes as proteínas precipitam na interface entre as fases.

Segundo Belval et al (1998), em uma região, próxima ao ponto crítico, o sistema se comporta de acordo com as leis de partição clássicas. Em comprimentos da linha de amarração maiores (maiores concentrações de PEG e sal), a partição é dominada por fortes forças de “salting out”, devido às altas concentrações de sal em ambas as fases e por forças de exclusão por volume, devido às altas concentrações de PEG, além da dependência em

relação à razão entre os volumes das fases. Em regiões mais afastadas do ponto crítico, observa-se a ocorrência de um aumento da precipitação e da agregação na interface.

Em sistemas PEG-sal, ocorrem significativas mudanças no comportamento da partição com o aumento no comprimento da linha de amarração.

Segundo Sebastião et al (1994), mudanças no volume livre estão correlacionadas com mudanças no coeficiente de partição de proteínas em sistemas de duas fases aquosas PEG-sal. O volume livre, que é simplesmente a diferença entre o volume específico da fase e o da água pura, representa a redução na quantidade de água disponível para a dissolução das moléculas.

Na formação das duas fases aquosas quando solutos são adicionados a baixas concentrações (abaixo do ponto crítico), mudanças no volume livre das misturas PEG-fosfato aproximam-se da soma das mudanças no volume livre dos componentes individuais. Em uma concentração característica, a separação das fases ocorre quando o fosfato alcança seu limite de solubilidade em PEG. A concentrações maiores (acima do ponto crítico), mudanças no volume livre permanecem relativamente constantes na fase rica em PEG. Contudo, na fase rica em sal, o volume livre diminui rapidamente em resposta ao aumento da concentração dos componentes formadores das fases. As contribuições de PEG e fosfato às mudanças do volume livre indicam que a concentração total de fosfato aumenta na fase rica em sal, com o aumento do comprimento da linha de amarração, mas permanece relativamente constante na fase rica em PEG.

Verifica-se então, que o aumento do comprimento da linha de amarração promove o aumento da concentração de sal (fosfato de potássio) na fase inferior, o que causa um aumento do “salting out” das proteínas quando seus limites de solubilidade são alcançados. Com isso, há um aumento na partição da proteína para a fase rica em PEG. Esta partição está sujeita aos efeitos de volume excluído de PEG e aos seus limites de solubilidade naquela fase. No limite, as proteínas precipitam.

Este comportamento foi verificado nos resultados experimentais obtidos neste trabalho.

Outro fator importante na partição é a carga da proteína, que está relacionada ao pH da solução. Abaixo do pI, a proteína está carregada positivamente e acima do pI, ela está carregada negativamente. Devido à presença de sais no sistema, as interações eletrostáticas também são importantes para a partição das proteínas entre as fases.

Neste trabalho, não foi analisada a influência do pH na partição porque foram encontradas na literatura referências que indicam os melhores pHs para o trabalho com as proteínas de estudo. Além de favorecer a partição, o pH deve manter as moléculas estáveis e conservar as propriedades das proteínas e a atividade enzimática.

5.2.1.3. Escolha do Sistema para a Extração Contínua na Micro-Coluna de Campânulas Pulsantes

Sarmiento et al (1994) realizaram um estudo da partição de citocromo b5 em sistemas PEG-sais de fosfatos, com diferentes massas moleculares de PEG, diferentes comprimentos da linha de amarração e pH. Contudo, a pesquisa foi realizada com citocromo b5 purificado. Assim, optou-se por estudar a partição de citocromo b5 a partir do extrato bruto, a fim de verificar se as impurezas presentes no extrato afetavam o coeficiente de partição significativamente.

Sarmiento et al (1994), encontraram resultados similares aos obtidos neste trabalho. Em alguns casos, houve uma variação entre os valores do coeficiente de partição dos dois estudos. Em geral, os valores foram semelhantes.

A temperatura durante os experimentos foi mantida aproximadamente constante, em (24 ± 3) °C. Sabe-se que variações significativas de temperatura também influenciam a partição em sistemas de duas fases aquosas.

De acordo com os ensaios de extração em descontínuo, verificou-se que muitas vezes ao acrescentar o extrato protéico ao sistema composto com PEG 400, este não mais formava duas fases, gerando uma única fase homogênea. Este comportamento também foi verificado por Sarmiento et al (1994).

Os sistemas formados com PEG 1000 são mais versáteis, podendo-se com pequenas alterações na composição das fases, manipular a partição de citocromo b5 para a fase rica em sal ou para a fase rica em PEG. Esta versatilidade torna-os atrativos para a separação e purificação de citocromo b5, a partir de um extrato impuro (Sarmiento et al, 1994).

Além disso, o PEG 1000 é economicamente viável, suas propriedades físicas, como a massa específica e a viscosidade, não oferecem problemas à sua aplicação em processos extrativos contínuos.

O PEG 3350 e PEG 8000 são mais caros e possuem maiores viscosidades, principalmente o PEG 8000. Segundo Porto (1998), a recuperação em atividade e em proteína total muitas vezes foi reduzida em sistemas com PEG de massas moleculares mais altas.

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho e da análise da literatura, optou-se pela escolha do sistema formado por PEG 1000-Fosfatos de potássio e da linha de amarração 2, PEG/Sal - 17,7/15,7 (% p/p), pH 7,3. Escolheu-se a linha de amarração 2, devido ao menor valor do coeficiente de partição ($K = 0,595$) quando comparado aos demais coeficientes de partição obtidos com os outros sistemas formados por PEG 1000. Isso mostra a tendência de uma maior quantidade de citocromo b5 concentrar-se na fase rica em sal. Outro fator importante, é a relação entre os volumes das fases ricas em PEG e em sal. Selecionou-se o PEG 1000 devido a fatores econômicos, às propriedades físicas destes sistemas, à relação entre os volumes das fases (aproximadamente 1), ao coeficiente de partição obtido e à versatilidade desses sistemas, que foi demonstrada no trabalho de Sarmiento et al (1994).

Com o uso de sistemas de duas fases aquosas, foi possível recuperar o citocromo b5, além de remover fragmentos celulares, os quais precipitaram na interface.

Sarmiento et al (1994) consideraram o sistema PEG 1000-Fosfatos de Potássio, pH 7,3 nas concentrações 18% e 16% (p/p) respectivamente, como sendo o sistema mais adequado para a extração de citocromo b5. Este resultado é semelhante ao resultado obtido no presente trabalho.

Assim, o sistema usado para a extração contínua de citocromo b5 foi PEG 1000-Fosfatos de potássio e linha de amarração 2 - 17,7% de PEG e 15,7% de fosfatos de potássio, com pH 7,3.

5.2.1.4. Estudo da Partição em Sistemas de Duas Fases Aquosas usando PEG 1500

No estudo da partição de citocromo b5 realizado anteriormente, foram analisadas a influência da massa molecular do PEG e do comprimento da linha amarração na partição de citocromo b5, a partir de seu extrato impuro. Avaliou-se apenas a relação entre a concentração de citocromo b5 nas fases ricas em PEG e em sal.

Neste item, avalia-se o comportamento da partição de citocromo b5 a partir de seu extrato impuro, de maneira mais completa. Foram analisados o fator de purificação, que mede a quantidade de outros componentes do extrato bruto que foram extraídos junto com a proteína de estudo e a recuperação total de citocromo b5 e de proteína total obtidas no processo de extração.

Com o PEG 1000, realizou-se a escolha das melhores condições de operação da micro-coluna e com o PEG 1500, testou-se essas melhores condições de operação.

Optou-se pelo uso de PEG 1500, por ser um polímero disponível no mercado nacional, ser de fácil aquisição e economicamente mais acessível. Além disso, PEG 1500 foi o polímero de fabricação nacional, de características mais próximas ao PEG 1000, que foi o polímero anteriormente escolhido como mais adequado para a extração contínua de citocromo b5. A partição de citocromo b5 usando sistemas formados com PEG 1500 difere pouco da obtida com PEG 1000.

Avaliou-se o comportamento da partição em PEG 1500, variando-se o comprimento da linha de amarração. Usou-se as três linhas de amarração estudadas na partição em sistemas com PEG 1000.

O fator de purificação foi calculado de acordo com a equação apresentada no item 4.6.4 do Capítulo 4.

O comportamento da partição de citocromo b5 em sistemas formados com PEG 1500 pode ser visto na figura 5.2. Os experimentos foram realizados em duplicata, na maioria dos casos. Observa-se que há um aumento do coeficiente de partição com o aumento da linha de amarração, como já era esperado. O aumento do coeficiente de partição observado entre as linhas de amarração 2 e 3 é pequeno.

Este comportamento é justificado pelo efeito de “salting out” que ocorre na fase rica em sal, como já foi comentado anteriormente.

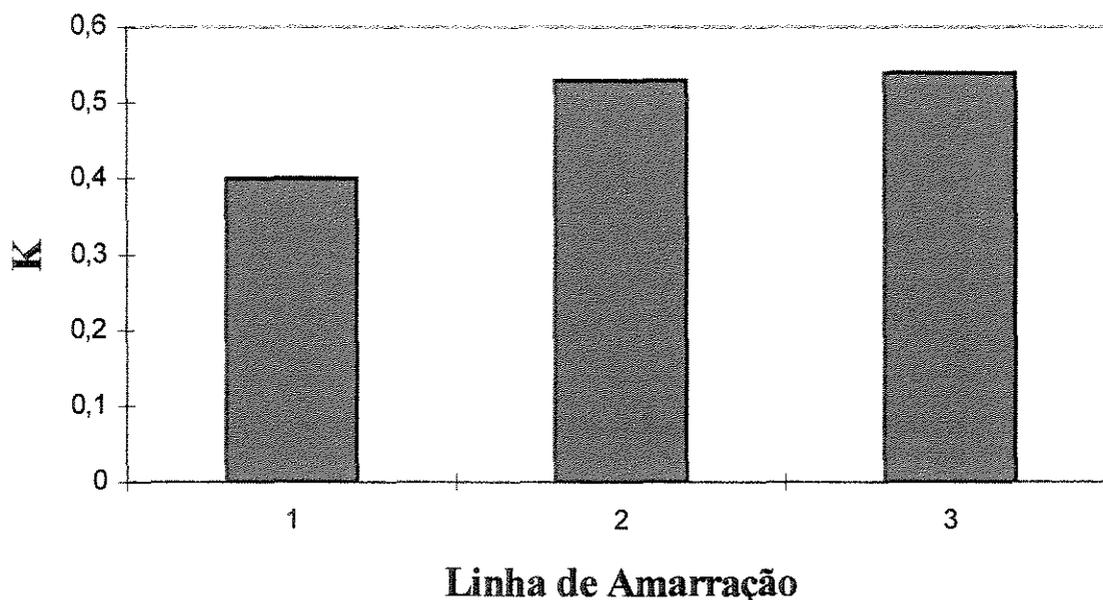


Figura 5.2 - Comportamento do coeficiente de partição de citocromo b5 com a variação da linha de amarração do sistema PEG 1500-Fosfatos de potássio, pH 7,3, na extração em descontínuo.

O comportamento do fator de purificação pode ser visto na figura 5.3. Observou-se uma diminuição do fator de purificação (FP) com o aumento da linha de amarração.

Na tabela 5.1, encontram-se os valores do Fator de Purificação (FP) e da Percentagem de Recuperação de citocromo b5 e de proteína total no sistema. Verifica-se que a Percentagem de Recuperação de proteína total aumenta e que a Percentagem de

Recuperação de citocromo b5 diminui com o aumento do comprimento da linha de amarração, porém esta diminuição é pequena.

Com isso, pode-se concluir que com o menor comprimento da linha de amarração, ocorre a obtenção de um maior grau de pureza do citocromo b5 extraído, já que um alto valor do Fator de Purificação na fase rica em sal, que é a fase na qual o citocromo b5 preferencialmente se concentra, foi obtido. Além disso, uma menor quantidade de proteína total e uma maior quantidade de citocromo b5 foram recuperadas com esta linha de amarração.

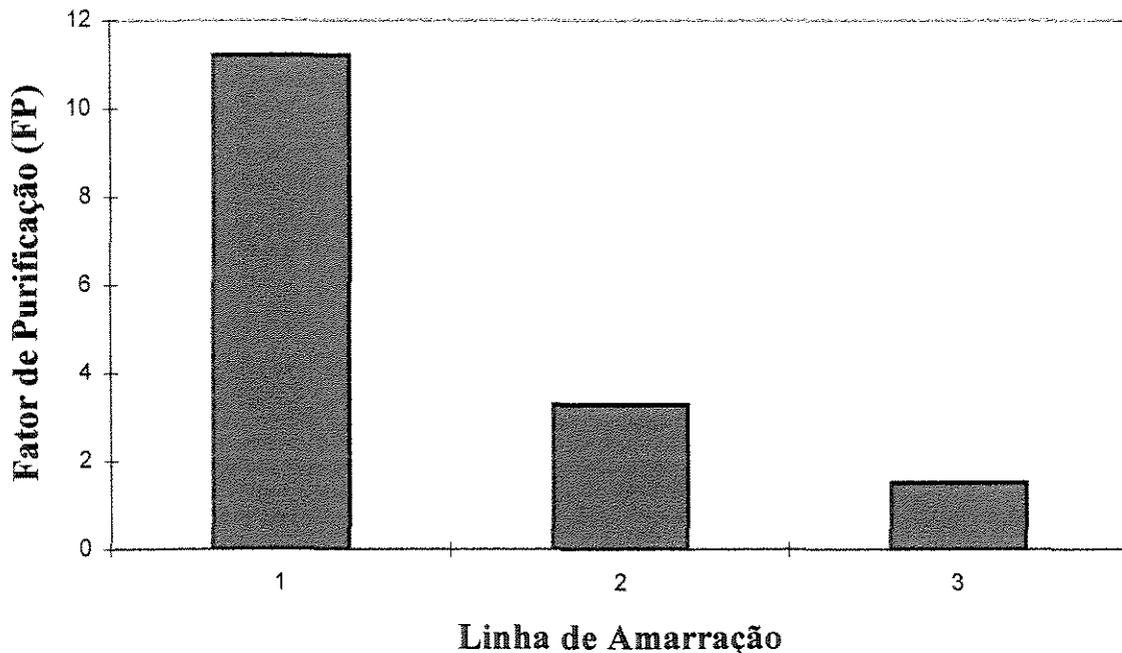


Figura 5.3- Influência do comprimento da linha de amarração no Fator de Purificação para a extração descontínua de citocromo b5 com sistema PEG 1500-Fosfato de potássio, em pH 7,3.

Assim, pode-se considerar que a melhor condição de extração encontrada nesta série de experimentos foi encontrada com a linha amarração 1, ou seja 16,2% de PEG 1500 e 14,3% de Fosfatos de potássio (% p/p). Nesta condição, obteve-se um coeficiente de

partição de 0,4; um Fator de Purificação de 11,2 e uma Percentagem de Recuperação global de citocromo b5 de 58,8%.

Esta condição foi escolhida para ser usada na micro-coluna de campânulas pulsantes, a fim de verificar o comportamento da extração contínua com este sistema, nas melhores condições de operação da micro-coluna. Estas condições de operação foram obtidas com o sistema escolhido na etapa anterior do trabalho (sistema formado por PEG 1000/Fosfatos de Potássio).

Tabela 5.1 - Recuperação de citocromo b5 e proteína total em sistemas PEG 1500 - Fosfatos de potássio, na extração em descontínuo.

Linha de Amarração (PEG/Sal - % p/p)	Fator de Purificação (fase rica em sal)	Recuperação global de citocromo b5 (%)	Recuperação global de proteína total (%)
1 - (16,2/14,3)	11,2	58,8	7,8
2 - (17,7/15,7)	3,3	52,8	16,1
3 - (19,7/17,7)	1,5	51,7	34,4

5.2.2. Extração da Ascorbato oxidase

A análise da extração descontínua da ascorbato oxidase foi realizada com o PEG de massa molecular 1500 e com os comprimentos das linhas de amarração usados no item 5.2.1.4 (linhas de amarração 1, 2 e 3). O PEG 1500 foi escolhido pelos fatores já apresentados anteriormente, como: boa recuperação de atividade de enzimas, polímero de fácil aquisição no mercado nacional, economicamente mais acessível e propriedades físicas adequadas à operação de equipamentos em contínuo. Assim, neste estudo foi analisado o efeito do comprimento da linha de amarração, no pH ótimo da enzima, que é 6,0. O coeficiente de partição foi calculado em relação à atividade enzimática da ascorbato oxidase em cada uma das fases.

Porto (1998) verificou que os sistemas PEG 1000-Fosfatos foram os que apresentaram melhores resultados em termos de recuperação da atividade das enzimas ascorbato oxidase e protease. PEG 1500 é o polímero de fabricação nacional que mais se

aproxima do PEG 1000, que é um polímero importado e de custo bem mais elevado. Este é um dos fatores que justificam o estudo apenas da partição em sistemas formados com o PEG 1500, nos experimentos realizados. Contudo, de acordo com os resultados apresentados por Porto (1998), houve uma recuperação de atividade superior a 100%, o que não foi verificado no presente trabalho. Possivelmente, esta menor recuperação de atividade da ascorbato oxidase pode ter ocorrido devido à utilização de um polímero de maior massa molecular (PEG 1500), como polímero formador das fases.

Na figura 5.4, observa-se o comportamento do coeficiente de partição da ascorbato oxidase em relação à variação do comprimento da linha de amarração. Através dos valores do coeficiente de partição, que foram menores que 1, exceto para a linha de amarração 3, que é a mais longa entre as estudadas, verificou-se uma tendência da ascorbato oxidase em se concentrar na fase rica em sal. Este mesmo comportamento foi observado por Porto (1998). Esta preferência pela fase rica em sal, pode ser explicado pela natureza hidrofílica da enzima, sugerindo que esta possui relativamente mais grupos polares que interagem com o sal (Porto, 1998).

Observa-se também que ocorreu um aumento do coeficiente de partição da enzima com o aumento do comprimento da linha de amarração (aumento das concentrações de PEG e sal no sistema). Como comentado anteriormente para a partição do citocromo b5, este comportamento pode ser explicado pelos efeitos de “salting out” da fase rica em sal, que forçam a partição da enzima em direção à fase rica em PEG. Assim, ocorreu um aumento do coeficiente de partição da ascorbato oxidase. Os efeitos de “salting out” tornam-se mais fortes com o aumento da concentração de sal no sistema.

Segundo Schmidt et al (1996), a solubilidade de proteínas na fase rica em PEG é governada pelo efeito de exclusão e pela interação hidrofóbica entre a proteína e o grupo etileno do PEG. Proteínas hidrofóbicas são altamente solúveis na fase rica em PEG. O PEG tem natureza hidrofóbica e tende a interagir fortemente com as regiões apolares das proteínas.

Na fase rica em sal, o efeito de “salting out” governa a solubilidade das proteínas. A diminuição desta solubilidade na fase rica em sal, motivada pelo aumento na concentração

de sal (fosfatos de potássio), induz à transferência de proteínas da fase rica em sal para a fase rica em PEG, aumentando o coeficiente de partição. Apenas proteínas que possuem grupos mais polares interagem com sais em altas concentrações (Sarmiento et al, 1994).

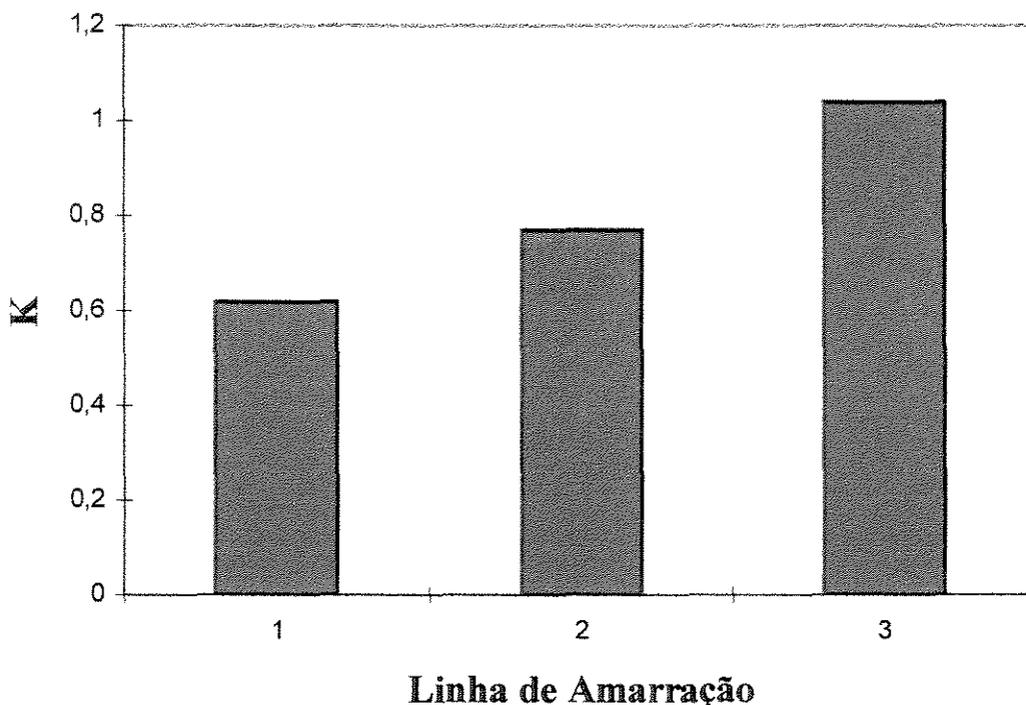


Figura 5.4 - Influência do comprimento da linha de amarração no coeficiente de partição da enzima ascorbato oxidase em sistemas PEG 1500-Fosfatos de potássio, pH 6,0, na extração em descontínuo.

Segundo Porto (1998), houve uma diminuição no rendimento em termos de recuperação de atividade das enzimas com o aumento da massa molecular do polímero, a partir do PEG 1000. Este comportamento foi descrito por Atha et al (1981), provavelmente como consequência do volume excluído.

Verifica-se na figura 5.5 e na tabela 5.2, que o Fator de Purificação e a percentagem de recuperação de atividade da ascorbato oxidase e de proteína total diminuíram com o aumento do comprimento da linha de amarração.

Estes resultados estão em concordância com os obtidos por Sebastião et al (1994), no trabalho de extração de cutinase em sistemas PEG-Fosfatos, onde o decréscimo do rendimento em proteína total observado com o aumento do comprimento da linha de amarração resultou na diminuição da atividade total recuperada.

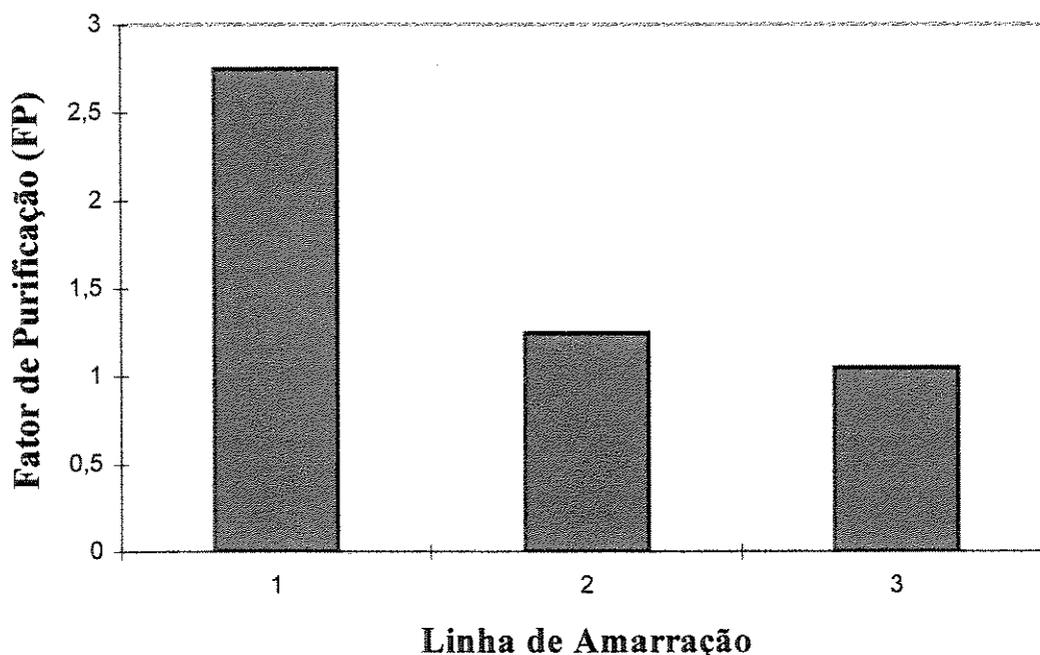


Figura 5.5 - Influência do comprimento da linha de amarração no Fator de Purificação para a extração descontínua da ascorbato oxidase com sistemas PEG 1500-Fosfato de potássio, em pH 6,0.

Nota-se na tabela 5.2, que a recuperação de atividade da ascorbato oxidase com a linha de amarração 1 foi muito maior do que para os demais comprimentos de linhas de amarração estudados.

Observa-se na figura 5.5 e na tabela 5.2, que o Fator de Purificação com a linha de amarração 1 foi maior do que com os demais comprimentos de linhas de amarração estudados.

Verifica-se na tabela 5.2, que a percentagem de proteína total recuperada foi inferior à percentagem de atividade enzimática recuperada. Isso contribui positivamente para o Fator de Purificação das enzimas, isto é, torna mais evidente a tendência de obter-se maiores valores do Fator de Purificação.

Valores máximos do Fator de Purificação, de aproximadamente 2,75, foram obtidos com a linha de amarração 1, que é a mais curta.

Tabela 5.2 - Recuperação de ascorbato oxidase e proteína total em sistemas PEG 1500 - Fosfatos de potássio.

Linha de Amarração (PEG/Sal - % p/p)	Fator de Purificação (fase rica em sal)	Recuperação global de ascorbato oxidase (%)	Recuperação global de proteína total (%)
1 - (16,2/14,3)	2,75	57,8	11,6
2 - (17,7/15,7)	1,25	29,4	12,8
3 - (19,7/17,7)	1,05	24,0	9,8

Foi observada a formação de um precipitado alaranjado na interface entre as fases em todos os ensaios realizados. Este precipitado era provavelmente formado por impurezas insolúveis em ambas as fases e por proteínas que precipitaram na interface devido aos seus limites de solubilidade em ambas as fases terem sido atingidos.

Os resultados obtidos neste trabalho diferiram dos obtidos por Porto (1998), em relação ao Fator de Purificação e à percentagem de atividade recuperada. Segundo Porto (1998), houve a recuperação de mais de 100% da atividade enzimática e o Fator de Purificação foi de 22,0; para a linha de amarração 3. Talvez este comportamento tenha ocorrido devido à diferença entre as massas moleculares dos polímeros, que formavam os sistemas aquosos bifásicos usados nos experimentos. Os resultados de Porto (1998), referem-se a sistemas formados com PEG 1000 e os do presente trabalho, com PEG 1500. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 5.2.

Assim, analisando-se os resultados obtidos, o sistema formado por PEG 1500- Fosfatos de potássio, pH 6,0 e a linha de amarração 1 (PEG/Sal - 16,2/14,3 - % p/p) foi

considerado o mais adequado para a extração de ascorbato oxidase a partir de seu extrato bruto. Este sistema foi aplicado na extração líquido-líquido contínua de ascorbato oxidase na micro-coluna de campânulas pulsantes.

Tendo em vista que a etapa de estudo da extração líquido-líquido em descontínuo tinha como objetivo a seleção do melhor sistema para a recuperação da atividade enzimática da ascorbato oxidase e a purificação desta enzima, para ser utilizado na extração contínua, atribuiu-se uma maior importância à percentagem de atividade enzimática recuperada e ao fator de purificação elevados, além de baixo coeficiente de partição (concentração da enzima na fase rica em sal).

5.3. Extração Contínua na Micro-Coluna de Campânulas Pulsantes

Em processos de extração contínua, a fase líquida escolhida para ser a dispersa é, geralmente, aquela que possui maior tensão superficial e, na grande maioria dos casos, também a que possui a menor massa específica. Neste trabalho, a fase rica em PEG atuou como a fase dispersa, escoando ascendentemente na coluna, em contracorrente com a fase rica em sal (fase contínua).

Neste trabalho, a transferência da energia de pulsação às fases líquidas é realizada por meio do movimento alternativo das campânulas no interior da micro-coluna.

A seguir, os resultados experimentais são analisados. A análise dos resultados foi dividida em duas partes: hidrodinâmica e transferência de massa.

5.3.1. Hidrodinâmica

O estudo da hidrodinâmica nesta micro-coluna de campânulas pulsantes é feito através da análise da fração de retenção da fase dispersa, da velocidade característica do escoamento e da inundação.

5.3.1.1. Fração de Retenção da Fase Dispersa

Determinou-se a fração de retenção da fase dispersa (ϕ) através da relação entre o volume da fase dispersa retido na micro-coluna e o volume total da micro-coluna, como é mostrado a seguir:

$$\phi = \text{volume da fase dispersa na coluna} / \text{volume total da coluna}$$

A seguir, é apresentada uma análise da influência de variáveis operacionais e da composição das fases na fração de retenção da fase dispersa, através dos resultados obtidos experimentalmente.

A fração de retenção da fase dispersa está diretamente relacionada com a quantidade de gotas existentes no interior da coluna, em uma dada condição operacional. A formação de gotas não é um processo simples e está relacionada às condições de agitação, isto é, a frequência de pulsação imposta às fases no interior do equipamento (Souza, 1997). Além da frequência de pulsação, a geometria do sistema de agitação e a forma de introduzir esta agitação no sistema são importantes.

A influência de variáveis operacionais na fração de retenção da fase dispersa foi avaliada em uma micro-coluna de câmpulas pulsantes através da operação em contínuo com sistemas de duas fases squosas, utilizando os seguintes valores de frequência de pulsação: 0,1; 0,14; 0,2; 0,33 e 1 pulso/segundo e os seguintes valores da vazão total da alimentação ($V_d + V_c$): 4,7 mL/min, 6,5 mL/min e 10,9 mL/min, aproximadamente. Os experimentos foram realizados utilizando-se sistemas de PEG 1000-Sais de fosfatos, pH 7,3, nas concentrações de 17,7 % e 15,7 % (p/p), respectivamente.

5.3.1.1.1. Influência da Frequência de Pulsação

De acordo com a literatura, verificou-se uma tendência de aumento da fração de retenção da fase dispersa com o aumento da frequência de pulsação, ou seja, da agitação imposta ao sistema. Este comportamento foi observado em trabalhos realizados em colunas de pratos ou fluxo pulsados, além de outros tipos de colunas, tais como: coluna de discos rotativos (RDC) e coluna de discos perfurados rotativos (PRDC).

Teoricamente, a eficiência de separação está ligada à fração de retenção da fase dispersa porque com o crescimento desta, o tempo de contato entre as fases aumenta e com isso, a transferência de massa é elevada.

A energia transferida ao líquido depende fortemente da amplitude e da frequência de pulsação, cujo produto representa a velocidade de pulsação. Quanto maior for essa velocidade, maior é a energia transferida ao sistema líquido. A absorção dessa energia na fragmentação de gotas não é ilimitada e portanto, deve existir uma condição, além da qual, o fornecimento desta energia torna-se indesejável. Nestes casos, a fração de retenção da fase dispersa diminui com o aumento da agitação imposta ao sistema. Esta condição, foi verificada em vários trabalhos, como por exemplo, Góis (1995), com colunas pulsadas e Porto (1998), com coluna PRDC e sistema de duas fases aquosas.

A manifestação da agitação se reflete na formação de gotas da fase dispersa que entram em contato com a fase contínua. Sabe-se também que o mecanismo de geração de gotas depende, dentre outros fatores, da passagem do líquido através dos orifícios dos pratos, ou neste caso, dos orifícios da rede que forma a campânula. O arraste da fase dispersa pela fase contínua pode ocorrer devido à diminuição excessiva do tamanho das gotas da fase dispersa resultante de elevadas frequências de pulsação ou pela elevada carga líquida da coluna (vazão total das fases).

O tipo de pulsação escolhida para a realização dos experimentos do presente trabalho foi o senoidal, cuja expressão matemática para o deslocamento do eixo pulsante, em função do tempo, pode ser escrita na seguinte forma:

$$Y(t) = (A/2) \cdot \text{sen}(\omega \cdot t) \quad (5.1)$$

Onde, $Y(t)$ é a posição de um dado ponto do eixo pulsante em um tempo, t ; A , a amplitude de pulsação, já definida, " f " é a frequência de pulsação e ω é dada pela equação 5.2:

$$\omega = 2 \cdot \pi \cdot f \quad (5.2)$$

A partir da equação 5.1, pode-se deduzir uma expressão para a velocidade instantânea de pulsação, derivando-se a equação 5.1 em relação ao tempo. Assim, para uma dada frequência de pulsação, obtém-se a seguinte equação:

$$V_p(t) = (\omega.A/2).\cos(\omega.t) \quad (5.3)$$

Substituindo-se a expressão 5.2 na equação 5.3, obtém-se:

$$V_p(t) = (\pi.f.A).\cos(2\pi f t) \quad (5.4)$$

Considerando que a velocidade de pulsação é um dos fatores responsáveis pela transformação da fase dispersa em gotas, de acordo com a equação 5.4, verifica-se claramente a influência da frequência de pulsação sobre a fração de retenção da fase dispersa.

A transferência da energia de pulsação à massa líquida é realizada por meio do movimento alternativo das campânulas no interior da coluna. A manifestação da agitação se reflete na formação de gotas da fase dispersa que são contactadas com as da fase contínua.

A natureza do escoamento das fases através das campânulas é bastante complexa, pois além de ser utilizado o fluxo em contracorrente, deve-se considerar o movimento das campânulas em relação ao líquido. A combinação das forças associadas ao movimento do dispositivo de pulsação e ao escoamento das fases forçam a passagem do líquido através dos orifícios das campânulas. No momento em que os líquidos atravessam as campânulas, ocorre uma intensa dispersão na micro- coluna.

O aumento da energia de pulsação deve produzir uma dispersão mais fina. Nestes casos, além da quebra de gotas devido à turbulência na região próxima às campânulas ser mais intensa, adiciona-se também o efeito causado na massa líquida no momento em que ela atravessa os orifícios das campânulas.

Observando os resultados experimentais, verificou-se que na maioria dos casos, a fração de retenção da fase dispersa cresce com o aumento da frequência de pulsação. Observou-se ainda que este crescimento é menos intenso para baixas vazões das fases

dispersa e contínua. O comportamento mostrado nas figuras 5.6 e 5.7, relativo às vazões baixa (4,7 mL/min) e alta (10,9 mL/min) indicou a ocorrência de um regime de operação estável, onde a fração de retenção da fase dispersa mostra uma tendência de crescimento tanto com a frequência de pulsação quanto com a vazão total das fases, exceto para a vazão total das fases de 6,5 mL/min. Neste caso, observou-se uma diminuição da fração de retenção da fase dispersa com o aumento da frequência de pulsação, para frequências superiores a 0,2 pulsos/segundo. Pode ser considerado que o arraste da fase dispersa pela fase contínua tenha provocado este comportamento. Com frequências de pulsação de 1 pulso/segundo, observa-se um ligeiro aumento da fração de retenção da fase dispersa, podendo-se considerar que a fração de retenção da fase dispersa manteve-se praticamente constante entre 0,33 pulsos/segundo e 1 pulso/segundo. Pode-se considerar que a diminuição da fração de retenção da fase dispersa com o aumento da frequência de pulsação ocorre devido ao arraste das gotas da fase dispersa, pela fase contínua. Com as vazões e frequências maiores, o arraste pode tornar-se mais intenso.

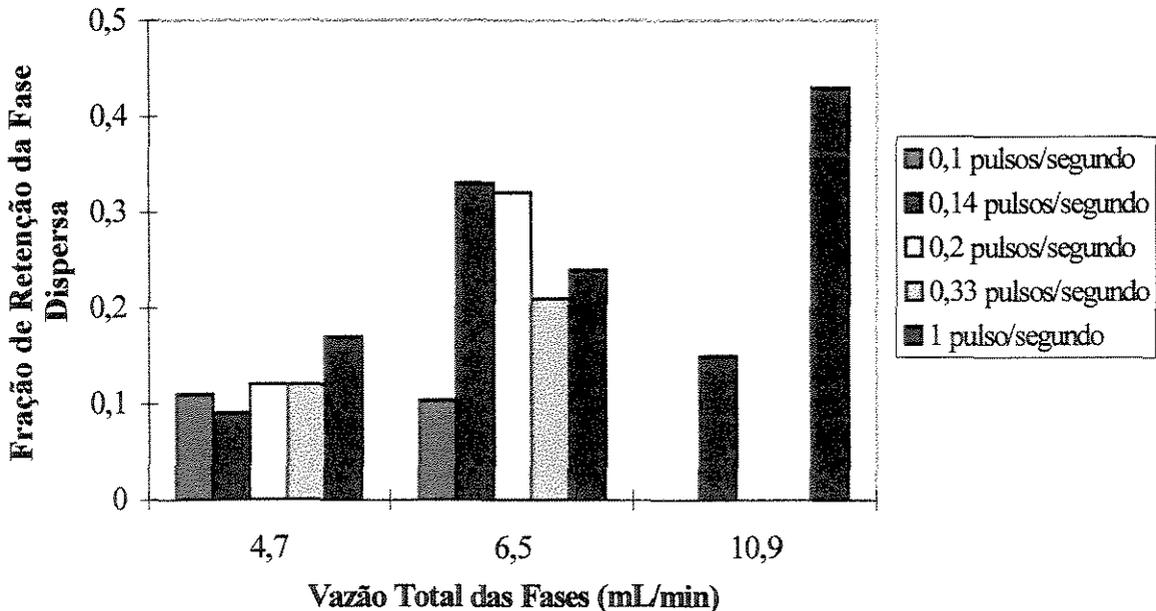


Figura 5.6 - Influência da vazão total das fases na fração de retenção da fase dispersa, para o sistema PEG 1000-Fosfato de potássio, em pH 7,3, com a linha de amarração 2 (17,7% de PEG e 15,7 % de Sal).

O aumento da frequência de pulsação faz com que as gotas da fase dispersa tornem-se menores e assim, sejam mais facilmente arrastadas pela fase contínua. Experimentalmente, nota-se a ocorrência de arraste, nas frequências de pulsação mais elevadas.

A energia de pulsação, em certos casos, pode favorecer o arraste da fase dispersa pela fase contínua. Estes casos normalmente, acontecem quando a frequência de pulsação atinge níveis elevados, ultrapassando valores considerados como críticos e provocando, assim, uma redução da fração de retenção da fase dispersa.

O arraste é indesejável nas operações de contato entre fases líquidas, pois o mesmo pode provocar a queda da eficiência de operação. Além disso, pode ser necessário a introdução de um processo de separação adicional, para que não haja problemas nas operações posteriores. O mecanismo de arraste consiste basicamente na incorporação de material de uma fase líquida na corrente de saída reservada à outra fase. Assim, no caso que se discute, isto equivale à corrente da fase rica em sal arrastar uma quantidade significativa de fase rica em PEG, através da saída da fase pesada da coluna.

Os valores da fração de retenção da fase dispersa encontrados no presente trabalho foram muito superiores aos já descritos na literatura para coluna “spray”, usando diferentes sistemas de duas fases aquosas (Sawant et al, 1990; Jafarabad et al, 1992 a e b; Venâncio et al, 1995). Resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho foram obtidos por Porto (1998) em uma coluna de discos perfurados rotativos e por Pawar et al (1997), que descreve o comportamento da extração de amiloglucosidase e β -galactosidase em uma coluna “spray” modificada de modo a obter maiores valores da fração de retenção da fase dispersa.

O erro experimental nas medidas da fração de retenção da fase dispersa é de aproximadamente 10 % do valor obtido experimentalmente. Este erro leva em consideração variações na leitura dos volumes usados nos cálculos da fração de retenção da fase dispersa.

Foi observado que a baixas frequências de pulsação, entre 0,1 pulsos/segundo e 0,33 pulsos/segundo, e a baixa vazão total das fases (4,7 mL/min), a fração de retenção da fase dispersa variou pouco. Nesta faixa, observou-se que os valores da fração de retenção da fase dispersa variavam dentro da margem de erro. Por isso, pode-se considerar que a fração de

retenção da fase dispersa independe da frequência de pulsação, nesta faixa de frequência de pulsação e para esta vazão total das fases. Quando a frequência de pulsação aumenta para 1 pulso/segundo, na mesma vazão, a fração de retenção da fase dispersa aumenta. Isto ocorre porque, como já comentado, o aumento da frequência de pulsação faz com que aumente a energia de pulsação transferida ao sistema, e conseqüentemente a turbulência no sistema. O tamanho das gotas da fase dispersa diminui, já que uma fina dispersão das gotas é formada. Sabe-se que quanto menor o diâmetro médio das gotas, menor é a velocidade de ascensão das gotas e portanto, maior é o tempo de residência da fase dispersa na coluna. Sendo as gotas menores, o tempo de residência das gotas na coluna aumenta e assim, a fração de retenção da fase dispersa também aumenta. A maior turbulência também aumenta o tempo de residência das fases na micro-coluna e, conseqüentemente, a fração de retenção da fase dispersa.

À vazão total elevada (10,9 mL/min), observou-se que a fração de retenção da fase dispersa aumentou significativamente com o aumento da frequência de pulsação de 0,14 pulsos/segundo para 1 pulso/segundo. Com a vazão elevada, observou-se um arraste bem maior da fase dispersa pela fase contínua do que nos casos anteriores. Mesmo assim, os valores da fração de retenção da fase dispersa foram bem superiores aos observados anteriormente. Mesmo com o aumento do arraste, a tendência de aumento da fração de retenção da fase dispersa foi bastante significativa.

Assim, pode-se concluir que com vazões totais das fases baixa e alta, o sistema mostrou uma tendência de comportamento semelhante à esperada, ou seja, a fração de retenção da fase dispersa aumentou com o aumento da frequência de pulsação. Pode-se afirmar, através da observação da fração de retenção da fase dispersa, que a operação da coluna com este sistema é estável. Com a vazão intermediária, pode-se concluir que ocorreu o arraste acentuado da fase dispersa pela fase contínua.

Outra conclusão é que o efeito da interação entre as duas variáveis (frequência de pulsação e vazão total das fases) foi importante.

5.3.1.1.2. Influência da Vazão Total das Fases

Nas figuras 5.6 e 5.7, pode-se observar que a frequências de pulsação elevadas (1 pulso/segundo), há um aumento da fração de retenção da fase dispersa com o aumento da vazão total das fases.

Isto ocorre, principalmente, porque a elevação da vazão total das fases faz com que cresça a turbulência no interior da coluna e, assim, aumente também a mistura das fases. Com isso, o tempo de residência das gotas da fase dispersa na coluna é maior e, conseqüentemente, a fração de retenção da fase dispersa aumenta também. Além disso, a velocidade de escoamento das fases na micro-coluna é maior.

Para o caso da frequência de 0,14 pulsos/segundo, houve o aparecimento de um ponto de máximo, ou seja, a fração de retenção da fase dispersa aumentou com a elevação da vazão total das fases até certo ponto, a partir do qual as gotas da fase dispersa foram mais facilmente arrastadas pela corrente de fase contínua. Este arraste causou a diminuição da fração de retenção da fase dispersa.

Provavelmente, este ponto de máximo observado na vazão total das fases de 6,5 mL/min, não foi observado a altas frequências de pulsação (1 pulso/segundo), devido ao efeito da agitação. A maior agitação faz com que aumentem a turbulência e a mistura das fases na coluna. Estes fatores são mais intensos quanto maior for a frequência de pulsação. Por isso, para frequências de pulsação elevadas, este aumento da energia introduzida ao sistema faz com que a fração de retenção da fase dispersa aumente. Para frequências de pulsação menores (0,14 pulsos/segundo), o efeito da pulsação é pequeno, tornando mais evidente o efeito do aumento da vazão total das fases, provocando a diminuição da fração de retenção da fase dispersa. Uma das causas deste comportamento, provavelmente, foi o arraste da fase dispersa pela fase contínua.

O aumento da vazão total das fases muitas vezes pode provocar o arraste da fase dispersa pela fase contínua. O arraste pode ser provocado tanto pelo pequeno tamanho das gotas da fase dispersa formada, devido à elevada frequência de pulsação utilizada, como pela elevação da carga líquida da coluna. Experimentalmente, observou-se um pequeno arraste, a

vazão total das fases e frequências de pulsação mais elevadas. Contudo, isto não alterou o comportamento do sistema nestas condições. Observou-se um aumento da fração de retenção da fase dispersa com o aumento da vazão total das fases. Provavelmente, o arraste não é tão significativo devido às baixas vazões envolvidas neste estudo.

Para vazões elevadas (10,9 mL/min) verificou-se que a fração de retenção da fase dispersa apresentou uma tendência de crescimento, com o aumento da frequência de pulsação, quando esta variou de 0,14 para 1 pulso/segundo. Contudo, para esta vazão, apenas estes dois pontos foram analisados. Assim, não se pode afirmar como o sistema se comporta com a variação da frequência de pulsação, nesta faixa. Não é possível prever se a fração de retenção da fase dispersa é crescente nesta faixa de frequências ou se existe um ponto de máximo, como para a vazão total das fases de 6,5 mL/min.

Para os demais experimentos, foi observada a tendência de aumento da fração de retenção da fase dispersa com o aumento da vazão total das fases.

Outro fator que deve ser ressaltado, é que os procedimentos envolvidos na determinação da fração de retenção da fase dispersa podem estar sujeitos a muitos erros. Portanto, qualitativamente, os resultados são confiáveis e adequados para a análise do comportamento do sistema. Contudo, quantitativamente, esses resultados devem ser considerados com certas reservas, podendo não corresponderem aos valores reais.

Devido ao aumento da vazão total das fases (carga líquida) na coluna, ocorre uma maior turbulência e mistura das fases. Além disso, a velocidade de escoamento das fases na coluna é maior. Assim, tendo em vista estes fatores, pode-se concluir que o aumento da vazão total das fases faz com que a fração de retenção da fase dispersa aumente. Em todos os experimentos, a razão entre as vazões das fases dispersa e contínua foi mantida constante em aproximadamente 1.

O aumento da velocidade de escoamento que ocorre com o aumento da vazão total das fases, pode ser a causa da queda da fração de retenção da fase dispersa com o aumento da vazão total das fases de 6,5 mL/min para 10,9 mL/min, para a frequência de pulsação de 0,14 pulsos/segundo. Contudo, essa queda não ocorre para a frequência de pulsação de 1

pulso/segundo, onde pelo contrário, ocorre um aumento da fração de retenção da fase dispersa com a elevação da vazão total, ou seja, da velocidade de escoamento. Isto pode, possivelmente, ocorrer devido aos efeitos da maior agitação imposta ao sistema, que provoca um aumento no tempo de residência e na mistura das fases na coluna.

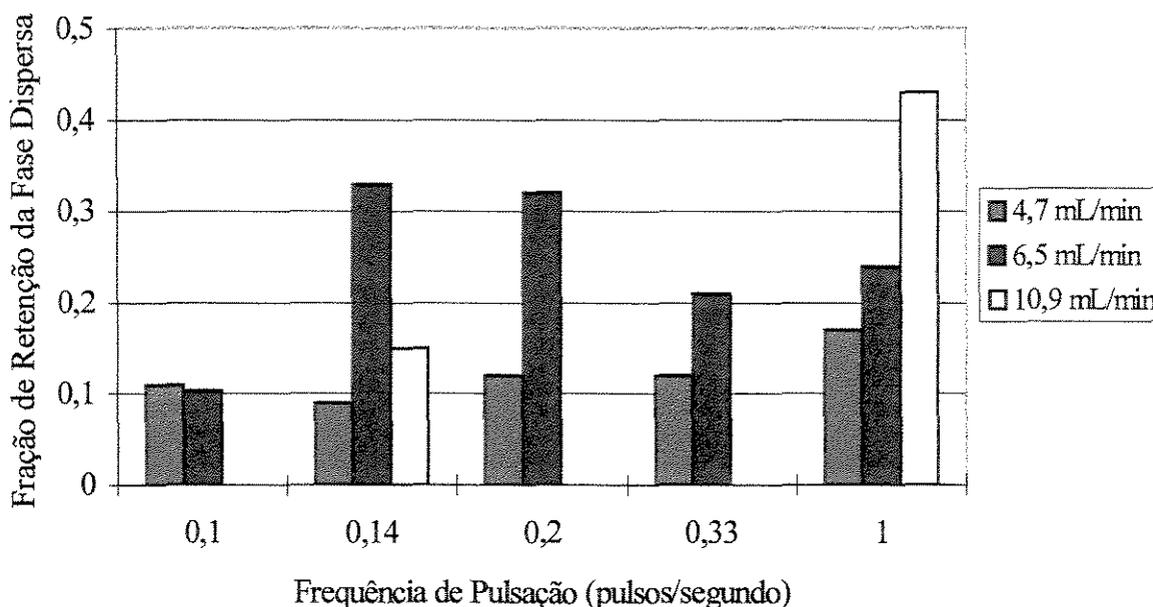


Figura 5.7 - Comportamento do sistema PEG 1000-Fosfato de potássio, em pH 7,3 e linha de amarração 2 (17,7 % PEG e 15,7 % Sal), em relação à fração de retenção da fase dispersa nas condições experimentais estudadas.

5.3.1.1.3. Influência da Composição do Sistema de Duas Fases Aquosas

Segundo a literatura, é verificado que para os diferentes sistemas formados com PEG de diferentes massas moleculares, a fração de retenção da fase dispersa diminui com o aumento da composição do sistema.

No presente trabalho, observou-se que a fração de retenção da fase dispersa diminui com o aumento das concentrações de PEG e de sal, como pode ser visto na figura 5.8.

Com o aumento da composição do sistema, valores menores foram observados para a fração de retenção da fase dispersa, para os sistemas estudados, embora tenha ocorrido um aumento na viscosidade da fase contínua. Comportamento semelhante foi observado por

Sawant et al (1990), Jafarabad et al (1992 a), Venâncio et al (1995) e Porto (1998), em trabalhos com diferentes sistemas de duas fases aquosas em diferentes tipos de colunas de extração.

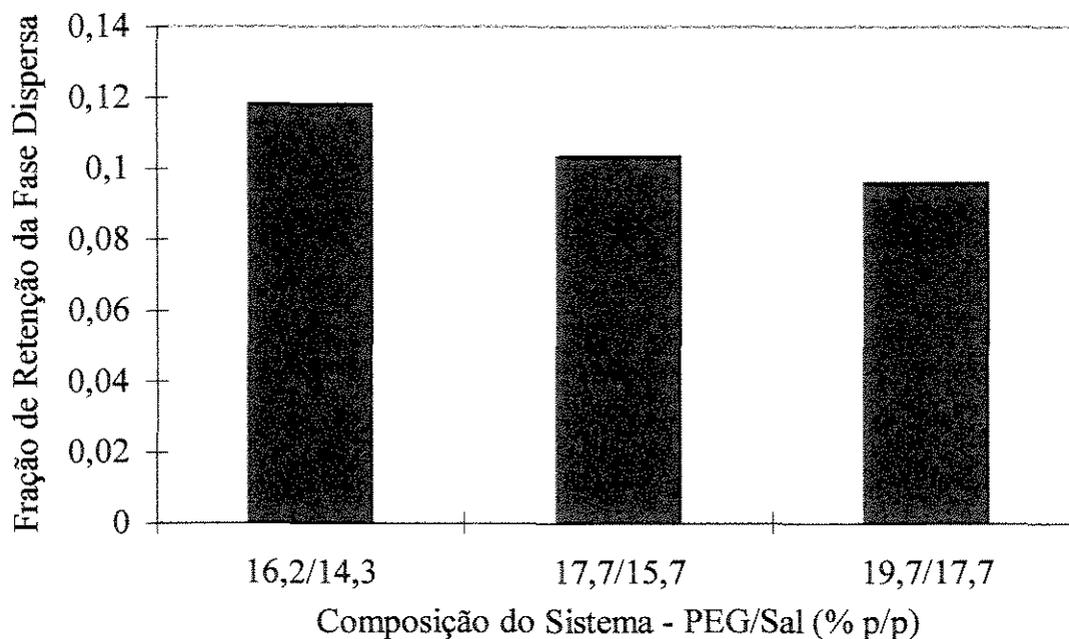


Figura 5.8 - Influência da composição do sistema PEG 1000-Fosfatos de potássio, em pH 7,3, na fração de retenção da fase dispersa. Vazão total das fases - 6,5 mL/min; frequência de pulsação - 0,1 pulsos/segundo.

O comportamento da fração de retenção da fase dispersa em relação à composição das fases pode ser explicado em termos das propriedades físicas dos sistemas, tais como a viscosidade e diferença entre as massas específicas, que aumentam com o aumento da composição do sistema, como pode ser visto no Anexo 2, onde encontram-se as propriedades físicas dos sistemas de duas fases aquosas usados no presente trabalho. De acordo com a literatura, as linhas de amarração próximas ao ponto crítico apresentam os maiores valores para a fração de retenção da fase dispersa (Porto, 1998).

Sabe-se que a medida que aumenta a concentração do polímero (aumento da linha de amarração), ocorre um aumento da tensão interfacial, como resultado, o diâmetro da gota aumenta, a diferença entre as massas específicas e viscosidades também aumentam. O efeito

combinado destas propriedades é que o tamanho médio das gotas e a velocidade da gota aumentem e a fração de retenção da fase dispersa diminua (Clift et al, 1978).

Com o aumento da velocidade com que a gota sobe, causada pelo aumento na diferença entre as massas específicas das fases, uma diminuição no tempo de residência da gota da fase rica em PEG, reduzindo a fração de retenção da fase dispersa (Raghav Rao et al, 1991).

5.3.1.1.4. Predição da Fração de Retenção da Fase Dispersa através de Correlações obtidas na Literatura

Através da análise da literatura, duas correlações foram selecionadas para a predição da fração de retenção da fase dispersa nas condições de operação usadas no presente trabalho.

As correlações escolhidas foram propostas por Kumar e Hartland (1988) e Kumar e Hartland (1995), para colunas com pratos pulsados. Deve ser lembrado que essas correlações foram desenvolvidas através de resultados experimentais obtidos em colunas de pratos pulsados e com sistemas aquoso-orgânico. Estas condições diferem das empregadas neste trabalho, que usou sistemas de duas fases aquosas, os quais possuem propriedades físicas diferentes das propriedades de sistemas aquoso-orgânico, tais como, menor tensão interfacial, menor diferença entre as massas específicas das fases e maiores viscosidades. Além disso, a geometria dos dispositivos que promovem a pulsação, campânulas e pratos, é bastante diferente.

Essas correlações foram apresentadas no Capítulo 2, equação 2.10 proposta por Kumar e Hartland (1988) e equação 2.13 proposta por Kumar e Hartland (1995).

Na tabela 5.3, encontram-se os valores da fração de retenção da fase dispersa preditos e os valores da fração de retenção obtidos experimentalmente.

Nos cálculos da fração de retenção da fase dispersa, foi necessário predizer o valor de $(A \cdot f)$, o produto da amplitude pela frequência de pulsação, na região de transição entre as regiões de mistura-decantação e de transição para a região de emulsão. Como pode ser visto

na tabela 5.3, todos os experimentos foram realizados na região de transição ou de emulsão. Este é um aspecto favorável, já que nesta região a transferência de massa e a mistura entre as fases são mais eficientes. Contudo, como é comentado a seguir, a validade destas equações para os sistemas estudados não é assegurada.

Tabela 5.3- Comparação entre os valores da fração de retenção da fase dispersa preditos com os obtidos experimentalmente para o sistema PEG 1000-Fosfato de potássio, em pH 7,3, com a linha de amarração 2 (17,7 % de PEG e 15,7 % de Sal).

v_d (m/s)	v_c (m/s)	f (pulsos/s)	$(A.f)_t$	$(A.f)$	ϕ_{exp}	ϕ predito	
						1988	1995
$1,02 \times 10^{-4}$	$1,12 \times 10^{-4}$	0,10	$2,76 \times 10^{-3}$	$5,6 \times 10^{-3}$	0,10	0,0042	0,0075
$1,02 \times 10^{-4}$	$1,12 \times 10^{-4}$	0,14	$2,76 \times 10^{-3}$	$7,8 \times 10^{-3}$	0,33	0,0047	0,0078
$1,02 \times 10^{-4}$	$1,12 \times 10^{-4}$	0,20	$2,76 \times 10^{-3}$	$1,1 \times 10^{-2}$	0,32	0,0056	0,0085
$1,02 \times 10^{-4}$	$1,12 \times 10^{-4}$	0,33	$2,76 \times 10^{-3}$	$1,8 \times 10^{-2}$	0,21	0,0081	0,0116
$1,02 \times 10^{-4}$	$1,12 \times 10^{-4}$	1,00	$2,76 \times 10^{-3}$	$5,6 \times 10^{-2}$	0,24	0,0540	0,0696
$6,9 \times 10^{-5}$	$7,89 \times 10^{-5}$	0,10	$2,76 \times 10^{-3}$	$5,6 \times 10^{-3}$	0,11	0,0027	0,0047
$8,55 \times 10^{-5}$	$6,9 \times 10^{-5}$	0,14	$2,76 \times 10^{-3}$	$7,8 \times 10^{-3}$	0,092	0,0037	0,0063
$8,55 \times 10^{-5}$	$6,9 \times 10^{-5}$	0,20	$2,76 \times 10^{-3}$	$1,1 \times 10^{-2}$	0,12	0,0044	0,0069
$8,55 \times 10^{-5}$	$6,9 \times 10^{-5}$	0,33	$2,76 \times 10^{-3}$	$1,8 \times 10^{-2}$	0,117	0,0064	0,0093
$8,55 \times 10^{-5}$	$6,9 \times 10^{-5}$	1,00	$2,76 \times 10^{-3}$	$5,6 \times 10^{-2}$	0,17	0,0423	0,0561
$1,97 \times 10^{-4}$	$1,62 \times 10^{-4}$	0,14	$2,76 \times 10^{-3}$	$7,8 \times 10^{-3}$	0,15	0,0096	0,0171
$1,97 \times 10^{-4}$	$1,62 \times 10^{-4}$	1,00	$2,76 \times 10^{-3}$	$5,6 \times 10^{-2}$	0,425	0,1099	0,1527

Aplicou-se os valores das variáveis estudadas nas correlações propostas e comparou-se os valores da fração de retenção da fase dispersa calculados com os valores obtidos experimentalmente. Verificou-se que nenhuma correlação mostrou-se adequada para prever a fração de retenção da fase dispersa. Os valores da fração de retenção da fase dispersa preditos diferem bastante dos valores experimentais.

É importante ressaltar que todos os trabalhos obtidos na literatura relacionam-se a colunas com pratos pulsados e neste trabalho, a micro-coluna possui campânulas pulsantes. Esta diferença entre os valores preditos e os valores obtidos experimentalmente, provavelmente, se deve à forma de agitação imposta ao sistema, através das campânulas pulsantes. Portanto, de acordo com esses resultados, pode-se concluir que a geometria da campânula influencia bastante o comportamento do sistema. Outro fator que pode ter

influenciado nos resultados são as propriedades físicas do sistema. Sistemas de duas fases aquosas, na maioria dos casos, apresentam uma menor diferença entre as massas específicas das fases e maiores viscosidades, principalmente da fase rica em PEG, quando comparadas aos sistemas formados por água e solvente orgânico, a partir dos quais as correlações de predição foram obtidas. No Anexo 2, encontram-se as propriedades físicas dos sistemas de duas fases aquosas empregados no presente trabalho e no Anexo 3, encontram-se as propriedades físicas e os valores das variáveis operacionais usadas na obtenção das correlações 2.10 e 2.13.

Assim, a validade dessas correlações para as condições operacionais e sistemas usados no presente trabalho não foi verificada. Os valores da fração de retenção da fase dispersa preditos foram subestimados. Coimbra et al (1998) obtiveram resultados semelhantes aos deste trabalho, usando um sistema de duas fases aquosas (PEG 6000-Sais fosfatos) em uma coluna de discos rotativos.

5.3.1.2. Velocidade Característica

A velocidade característica e a velocidade relativa são importantes por se relacionarem à fração de retenção da fase dispersa e à inundação. Esta relação pode ser analisada através das equações apresentadas no Capítulo 2, na seção 2.6.

Para o cálculo da velocidade característica, optou-se por avaliar a equação de Gayler et al (1953), por ser mais simples e não ter sido encontrado nenhuma restrição ao seu uso no caso estudado neste trabalho. A equação proposta por Baird e Shen (1984) foi também empregada nos cálculos, por ser uma equação desenvolvida para colunas com pratos pulsados.

Usando-se a equação 2.20 proposta por Gayler et al (1953) e a equação 2.21 proposta por Baird e Shen (1984) para o cálculo da velocidade característica, obteve-se os resultados da tabela 5.4, para os experimentos realizados.

Essas equações são apresentadas a seguir:

$$\left(\frac{v_d}{\phi}\right) + \left[\frac{v_c}{1-\phi}\right] = V_0 \cdot (1-\phi) \quad (2.19)$$

$$\left(\frac{v_d}{\phi}\right) + \left[\frac{v_c}{1-\phi}\right] = V_0 \cdot \frac{(1-\phi)}{\phi^{1/3}} \quad (2.20)$$

Utilizando-se os valores das velocidades de escoamento (v_c e v_d) e os valores experimentais da fração de retenção da fase dispersa (ϕ), determinou-se a velocidade característica (V_0) para cada experimento através das equações 2.20 e 2.21.

Na tabela 5.4 e nas figuras 5.9 e 5.10, encontram-se os valores da velocidade característica calculados com ambas as equações e pode-se verificar a tendência do comportamento da velocidade característica em relação à frequência de pulsação e à vazão total das fases. Nos experimentos, variou-se a vazão total das fases em três níveis: 4,7 mL/min, 6,5 mL/min e 10,9 mL/min, e a frequência de pulsação em cinco níveis: 0,1 pulsos/segundo, 0,14 pulsos/segundo, 0,2 pulsos/segundo, 0,33 pulsos/segundo e 1 pulso/segundo.

Tabela 5.4- Velocidades características calculadas pelas equações 2.20 e 2.21, para o sistema PEG 1000-Fosfato de potássio, em pH 7,3, com a linha de amarração 2 (17,7 % de PEG e 15,7 % de Sal).

v_c (cm/min)	v_d (cm/min)	ϕ -	Frequência de pulsação (pulsos/s)	V_0 Gayler (eq.2.20) (cm/min)	V_0 Baird e Shen (eq.2.21) (cm/min)
0,67	0,61	0,10	0,10	7,60	3,53
0,67	0,61	0,33	0,14	4,25	2,94
0,67	0,61	0,32	0,20	4,25	2,91
0,67	0,61	0,21	0,33	4,75	2,82
0,67	0,61	0,24	1,00	4,50	2,80
0,47	0,41	0,11	0,10	4,78	2,29
0,41	0,51	0,09	0,14	6,72	3,01
0,41	0,51	0,12	0,20	5,36	2,64
0,41	0,51	0,12	0,33	5,36	2,64
0,41	0,51	0,17	1,00	4,21	2,33
0,97	1,18	0,15	0,14	10,60	5,63
0,97	1,18	0,43	1,00	7,80	5,89

Com o uso da equação 2.20, proposta por Gayler et al (1953), observou-se (figura 5.9) que para a vazão total das fases mais baixa (4,7 mL/min) e a vazão das fases mais alta (10,9 mL/min) usadas nos experimentos, ocorre um decréscimo da velocidade característica com o aumento da frequência de pulsação, para valores da frequência de pulsação superiores a 0,10 pulsos/segundo. Este era o comportamento esperado. Para o valor intermediário da vazão total (6,5 mL/min) não foi observada uma dependência linearmente direta entre a velocidade característica e a frequência de pulsação (intensidade da pulsação), usando-se a equação 2.20. Pode-se considerar que a variação entre os valores da velocidade característica é muito pequena nas vazões intermediárias (6,5 mL/min), onde a velocidade característica calculada pela equação 2.20 variou entre 4,25 cm/min e 4,75 cm/min para frequências de pulsação superiores a 0,14 pulsos/segundo. Assim, é possível considerar que a velocidade característica das fases foi aproximadamente constante. Os valores da velocidade característica variaram pouco mas aleatoriamente, neste caso.

Segundo Kung e Beckman (1961), não há uma dependência entre a velocidade característica e a intensidade da agitação, a baixas velocidades de rotação em colunas rotativas. Isso é verificado nas figuras 5.9 e 5.10, onde a frequências de pulsação mais baixas (abaixo de 0,20 pulsos/segundo), não foi observada uma dependência entre a velocidade característica e a frequência de pulsação. Os valores variaram aleatoriamente, na maioria dos casos. Nos sistemas de duas fases aquosas, a baixa tensão interfacial, faz com que as gotas sejam pequenas, mesmo a baixas velocidades de agitação (baixa frequência de pulsação), diminuindo a velocidade característica mesmo a baixas intensidades de agitação.

Com relação à vazão total das fases, observou-se que os menores valores da velocidade característica foram obtidos com a vazão de 6,5 mL/min e os maiores valores com a vazão total de 10,9 mL/min, embora os valores obtidos com as vazões de 4,7 mL/min e 6,5 mL/min sejam próximos. Os maiores valores da velocidade característica com a vazão total mais alta, ocorreram porque sendo as vazões mais elevadas, as velocidades com que as fases passaram pela coluna foram maiores do que a vazões mais baixas.

Os fatores que justificam o comportamento da velocidade característica obtida pela equação proposta por Gayler et al (1953) são:

- Essa equação correlaciona satisfatoriamente a velocidade característica para valores da fração de retenção da fase dispersa menores que 0,2.
- As propriedades físicas dos sistemas bifásicos aquosos, como a baixa tensão interfacial e alta viscosidade da fase dispersa, são diferentes das propriedades dos sistemas para os quais a equação foi desenvolvida.
- O uso de campânulas para promover a agitação.

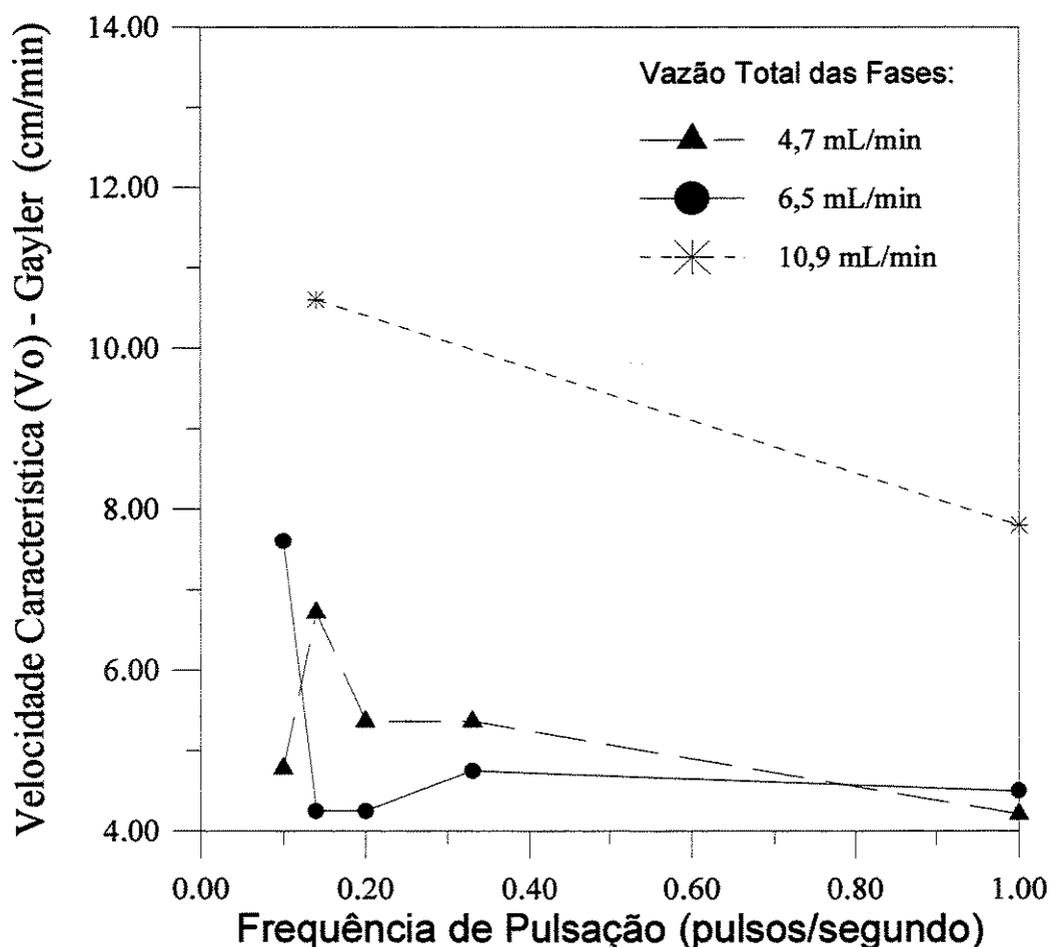


Figura 5.9 - Influência da frequência de pulsação e da vazão total das fases na velocidade característica calculada pela equação proposta por Gayler et al (1953).

Usando-se a equação proposta por Baird e Shen (1984), o comportamento foi o esperado. Este comportamento pode ser observado na tabela 5.4 e na figura 5.10. A velocidade característica diminuiu com o aumento da frequência de pulsação, embora esta variação tenha sido pequena. As propriedades físicas dos sistemas de duas fases aquosas, como a baixa tensão interfacial, fazem com que as gotas sejam pequenas, mesmo a baixas velocidades de agitação, diminuindo a velocidade característica.

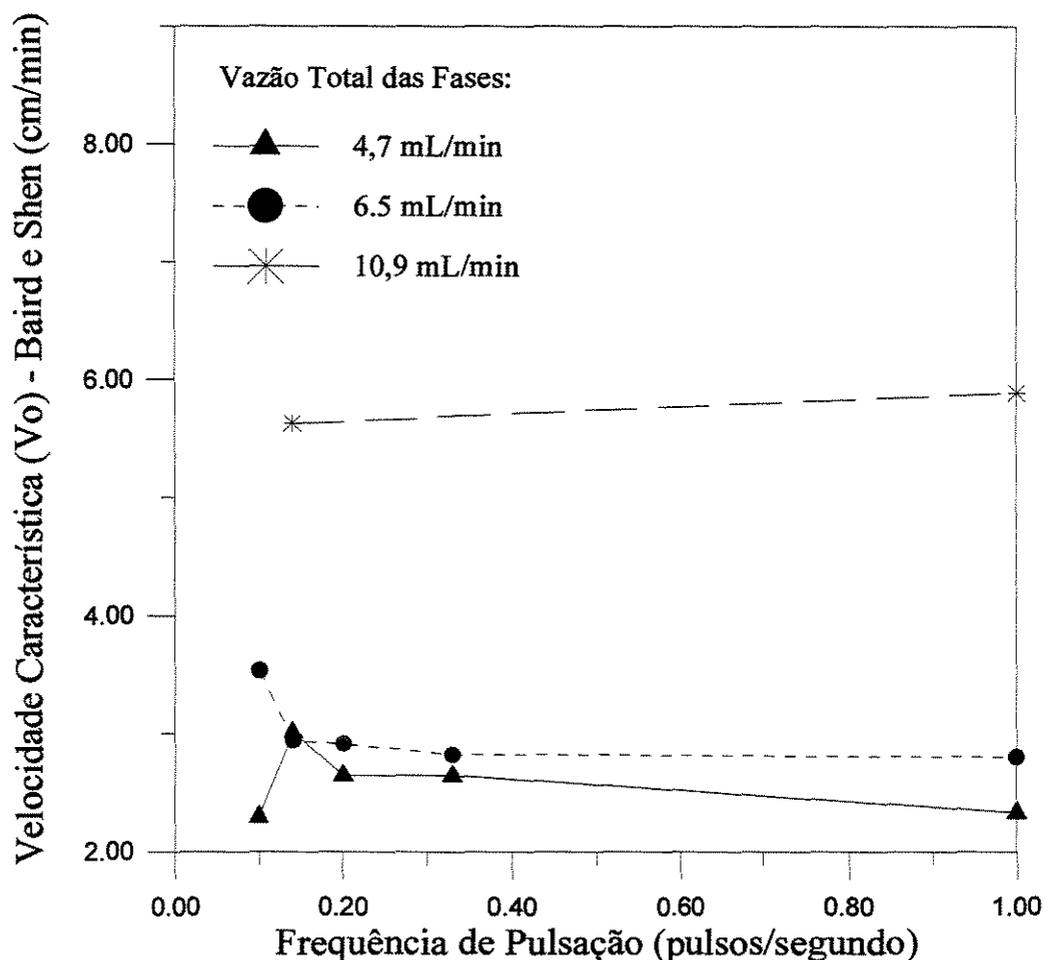


Figura 5.10 - Influência da frequência de pulsação na velocidade característica calculada pela equação proposta por Baird e Shen (1984), para o sistema PEG 1000-Fosfato de potássio, em pH 7,3 e com a linha de amarração 2 (17,7 % de PEG e 15,7 % de Sal).

Nos experimentos com as vazões mais elevadas (10,9 mL/min), um comportamento inverso foi observado, usando-se a equação 2.21 proposta por Baird e Shen. Isto é, ocorreu um pequeno aumento da velocidade característica com o aumento da frequência de pulsação. Porém a variação entre as velocidades foi muito pequena (5,63 mL/min e 5,89 mL/min), podendo-se considerar que a velocidade permaneceu praticamente constante.

Contudo, não se pode afirmar que estas equações sejam válidas para calcular a velocidade característica em colunas com campânulas pulsantes e sistemas de duas fases aquosas, já que estas foram desenvolvidas para sistemas aquoso/orgânico e outros tipos de equipamentos. Pode-se notar que os valores da velocidade característica obtidos pelas duas equações para um mesmo experimento foram bastante diferentes.

Observando-se os resultados obtidos e as condições em que as equações foram desenvolvidas, porque a tendência de comportamento observada na figura 5.10 foi mais próxima ao que era esperado. Portanto, pode-se concluir que a equação proposta por Baird e Shen é mais adequada ao caso estudado. Mesmo assim, ela deve ser usada com certas restrições. Pode-se considerar que, qualitativamente, essa equação pode ser usada para prever o comportamento do sistema, porém quantitativamente, os resultados obtidos não são totalmente confiáveis.

Tentando-se ajustar os valores da velocidade característica obtidos com as equações 2.20 e 2.21 a uma reta, não obteve-se uma boa correlação linear entre X e Y, como pode ser visto nas figuras 5.11 e 5.12. Góis (1995) usou este método para testar a validade das equações propostas para o sistema estudado. Segundo o autor, se o gráfico obtido da maneira anteriormente descrita for uma reta, a equação proposta é adequada para o ajuste dos dados.

O fato da relação entre X e Y não ser linear como é visto nas figuras 5.11 e 5.12, pode mostrar que estas equações provavelmente não são válidas para os dados obtidos neste equipamento e para as condições de operação empregadas.

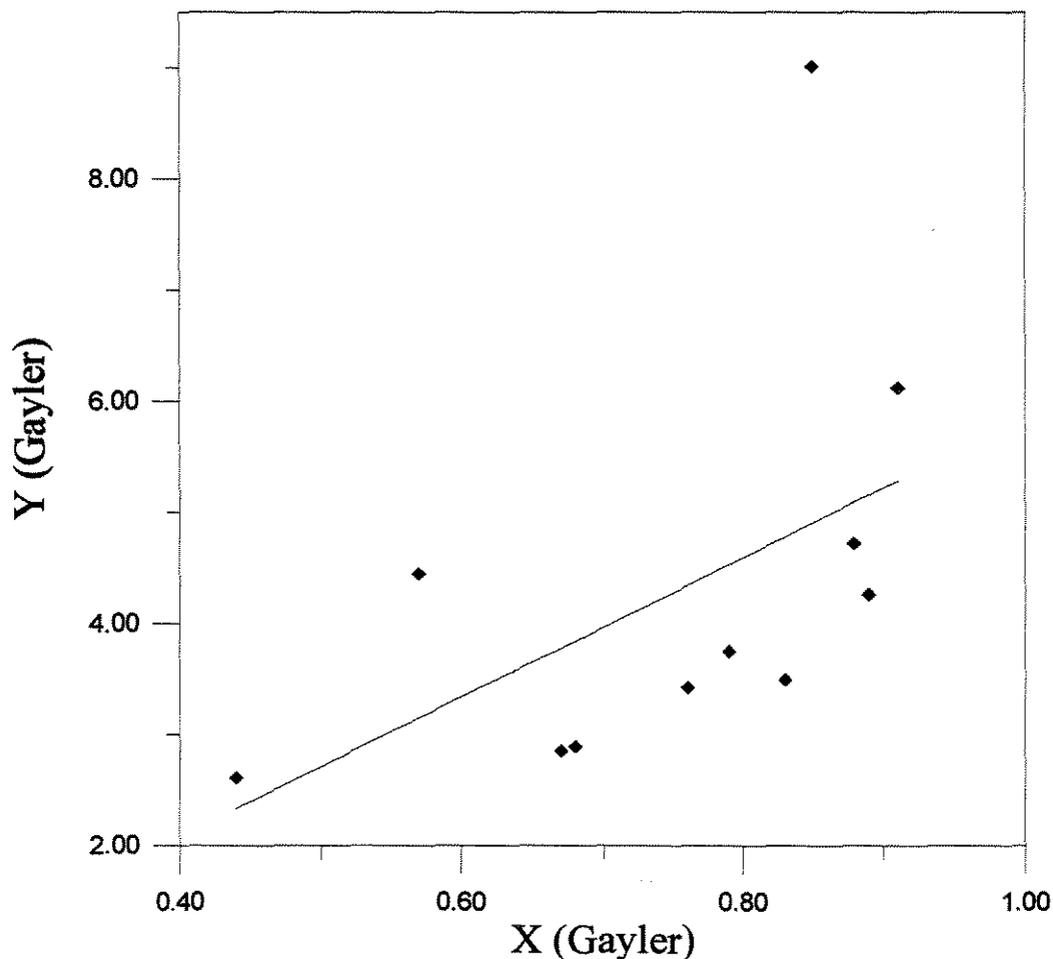


Figura 5.11 - Regressão linear dos resultados obtidos nos experimentos sendo X e Y obtidos pela equação proposta por Gayler et al (1953), para o sistema PEG 1000-Fosfato de potássio, em pH 7,3 e com a linha de amarração 2 (17,7 % de PEG e 15,7 % de Sal).

Segundo Baird e Shen (1984), a velocidade característica é uma grandeza que depende do diâmetro das gotas e das propriedades físicas do sistema líquido utilizado. Desta forma, pode-se interpretar o comportamento não linear em termos da influência da coalescência das gotas e do arraste da fase dispersa que devem ter ocorrido no interior da coluna.

Aplicando-se uma regressão linear a todos os dados experimentais, pode-se obter um valor médio para a velocidade característica, levando-se em conta todos os experimentos realizados. Este procedimento foi usado por Góis (1995). Os resultados deste procedimento encontram-se na tabela 5.5. A equação que melhor ajusta estes pontos a uma reta é:

$$Y = 2,34 X + 1,25 \quad (5.5)$$

com coeficiente de correlação igual a 0,55, o que mostra que a correlação não é satisfatória. Este resultado é obtido com o uso da equação de Baird e Shen (1984). Assim, a velocidade característica média é o coeficiente de X, que é o coeficiente angular ou seja, a inclinação da reta. X e Y são X_B e Y_B apresentados a seguir.

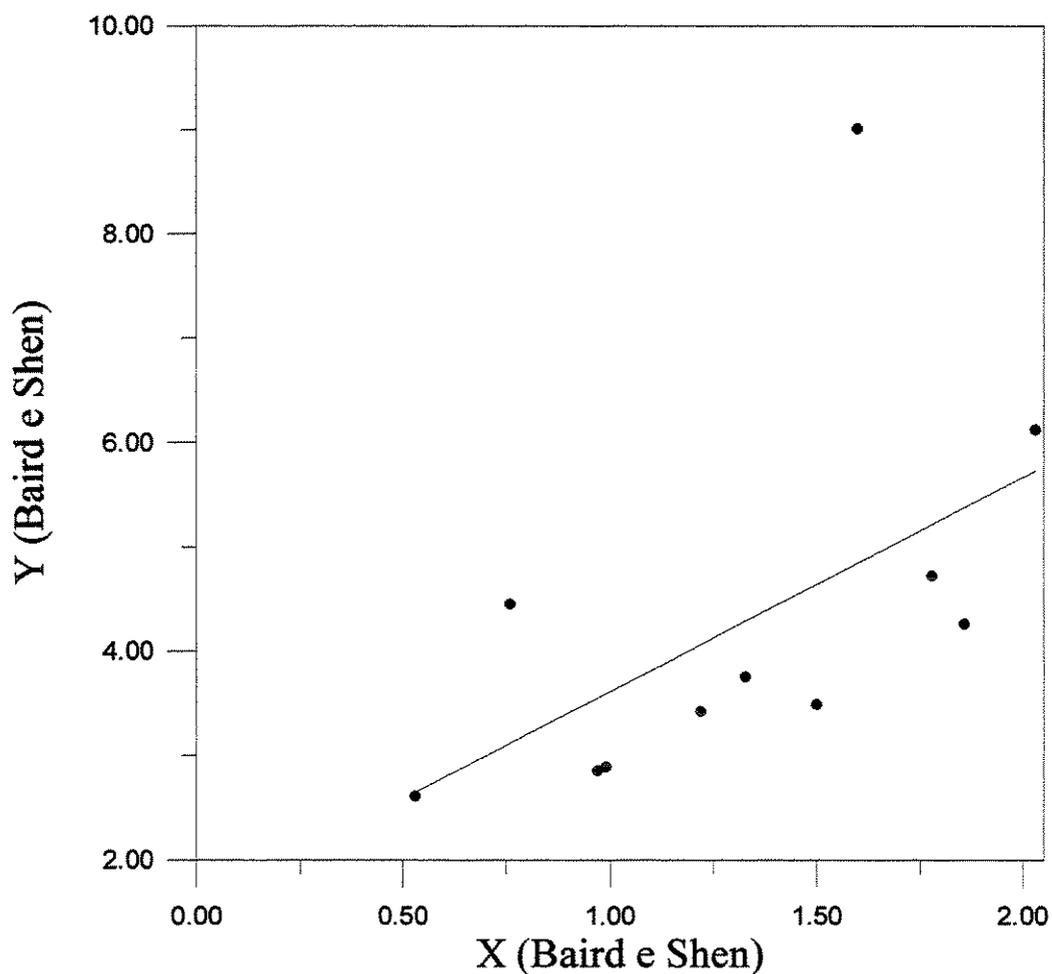


Figura 5.12 - Regressão linear dos resultados obtidos nos experimentos sendo X e Y obtidos pela equação proposta por Baird e Shen (1984), para o sistema PEG 1000-Fosfato de potássio, em pH 7,3 e com a linha de amarração 2 (17,7 % de PEG e 15,7 % de Sal).

É importante salientar que o tratamento da velocidade relativa e da velocidade característica envolve equações de modelagem propostas para outros sistemas líquidos, sob diferentes condições experimentais e em equipamentos diferentes. Portanto, a validade destas equações para as condições experimentais nas quais são obtidos os resultados deste trabalho não é assegurada e deve ser verificada.

Tabela 5.5- Cálculo da velocidade característica média.

X_{Gayler}	Y_{Gayler}	$X_{\text{Baird e Shen}}$	$Y_{\text{Baird e Shen}}$
0,90	6,84	1,94	6,84
0,67	2,85	0,97	2,85
0,68	2,89	0,99	2,89
0,79	3,75	1,33	3,75
0,76	3,42	1,22	3,42
0,89	4,26	1,86	4,26
0,91	6,12	2,03	6,12
0,88	4,72	1,78	4,72
0,88	4,72	1,78	4,72
0,83	3,49	1,50	3,49
0,57	4,45	0,76	4,45
0,85	9,01	1,60	9,01
$Y = 8,23 X - 1,88$ $R^2 = 0,50$		$Y = 2,34 X + 1,25$ $R^2 = 0,55$	

Onde:

$$X_G = \left(\frac{V_d}{\phi} \right) + \left[\frac{V_c}{(1-\phi)} \right]$$

$$Y_G = V_o \cdot (1-\phi)$$

$$X_B = \left(\frac{V_d}{\phi} \right) + \left[\frac{V_c}{(1-\phi)} \right]$$

$$Y_B = V_o \cdot \frac{(1-\phi)}{\phi^{1/3}}$$

5.3.1.3. Inundação

Como já foi apresentado no Capítulo 2, a inundação ocorre quando as condições de operação da coluna fazem com que seja impossível para as correntes escoarem contracorrentemente e uma fase se dispersar na outra. Nesta situação, as correntes entram e saem da coluna por uma mesma extremidade.

Sabe-se que existem limitações no que diz respeito às vazões das fases que são alimentadas na coluna, pois, nas operações em contra-corrente, o escoamento de uma fase pode impor certa restrição ao escoamento da outra. O limite desta restrição seria a inundação total do equipamento.

Assim, um fator que pode causar a inundação é o uso de razão entre as vazões ou vazões totais inadequadas. Isso faz com que a fase contínua rejeite a fase que deve ser dispersa e, por sua vez, esta não consiga se dispersar e misturar-se à outra fase, fazendo com que as fases não entrem em contato e saiam pela mesma extremidade em que entraram na coluna.

Góis (1995) apresentou um método para a predição da fração de retenção da fase dispersa no limiar da inundação, que não mostrou-se válido para os casos estudados no presente trabalho. Este método faz uso da velocidade característica média e da condição proposta por Thornton (1957).

De acordo com este método, a fração de retenção da fase dispersa no limiar da inundação foi de aproximadamente 0,25. Porém, valores da fração de retenção da fase dispersa bem superiores a este foram obtidos, sem que ocorresse a inundação.

Como já foi visto anteriormente, valores da fração de retenção da fase dispersa superiores a 0,40 foram obtidos. Isto pode ter ocorrido porque a regressão linear dos dados resultou em uma reta com baixo coeficiente de determinação ($R^2 = 0,55$), o que significa que o ajuste dos pontos a uma reta não é muito satisfatório, como pode ser visto nas figuras 5.11 e 5.12. Isto faz com que o valor da velocidade característica média não seja preciso.

De acordo com este método, o único fator que influencia o valor da fração de retenção da fase dispersa no limiar da inundação é a razão entre as vazões das fases. Este parâmetro é muito importante, contudo outros fatores também importantes não são considerados. Entre eles pode-se citar: a frequência de pulsação (ou energia introduzida ao sistema) e a vazão total das fases que entram na coluna. A influência destes fatores poderia estar incluída no valor da velocidade característica, contudo devido ao uso da velocidade característica média, esta influência é considerada a mesma para todos os casos estudados, o

que nem sempre é correto. Além disso, o valor da velocidade característica médio calculado não tem precisão assegurada.

A equação usada para o cálculo da velocidade característica foi desenvolvida e testada para sistemas bifásicos aquoso/orgânico, que possuem propriedades físicas muito diferentes dos sistemas de duas fases aquosas usados neste trabalho. Além disso, a geometria do sistema de agitação das colunas, para as quais esta equação foi desenvolvida, é bastante diferente da geometria do sistema de agitação com campânulas, o que pode causar erros nos valores preditos.

Esses fatores podem tornar os valores da fração de retenção da fase dispersa preditos para a condição de inundação imprecisos.

Experimentalmente, as condições de inundação não foram atingidas. Quando a inundação é atingida, toda a fase leve sai da coluna pelo fundo e a fase pesada pelo topo. Além disso, ocorre uma queda brusca na transferência de massa.

5.3.2. Transferência de Massa

Neste item, são apresentados os resultados referentes à transferência de massa, obtidos no estudo da extração contínua de citocromo b5 e da ascorbato oxidase, a partir de seus extratos brutos, na micro-coluna de campânulas pulsantes, usando-se sistemas de duas fases aquosas formados por PEG-Sal (Fosfatos de potássio).

Todos os experimentos foram realizados com extratos brutos das proteínas de interesse, o citocromo b5 e a enzima ascorbato oxidase. Um estudo detalhado do comportamento da extração na micro-coluna de campânulas pulsantes foi realizado através da análise da extração de citocromo b5. A partir dos resultados obtidos, encontrou-se a melhor condição de operação da micro-coluna, a qual permite a obtenção dos melhores resultados para a extração.

Posteriormente, usou-se esta condição encontrada, para avaliar a extração de citocromo b5 e de ascorbato oxidase em sistemas aquosos bifásicos formados com PEG

1500. Nestes últimos estudos, analisou-se, além da proteína de interesse, o fator de purificação e a recuperação total das proteínas de interesse e de proteína total.

Os dados relativos à transferência de massa foram obtidos através de medidas da atividade enzimática e da concentração de proteínas nas correntes de entrada e saída da micro-coluna. Os resultados experimentais foram analisados com base no Índice de Recuperação do Solute, proposto por Kawase (1990) e calculado pela equação 2.6, a Eficiência de Separação, E^* , calculada pela equação 2.7 e o Coeficiente de Transferência de Massa, k_{da} , calculado pela equação 2.5.

A maioria dos trabalhos que apresentam estudos da transferência de massa em colunas pulsadas, referem-se a colunas de fluxo pulsado e com sistemas aquoso-orgânico. Poucos trabalhos sobre transferência de massa em colunas com pratos pulsantes e nenhum trabalho sobre o uso de sistemas aquosos bifásicos em colunas pulsadas foram encontrados.

Os modelos de representação da eficiência de separação, que foram usados neste trabalho, foram escolhidos por serem simples e úteis para a avaliação e comparação do desempenho da micro-coluna com outros equipamentos, além de poder ser usados para projeto e aumento de escala do equipamento.

Os sistemas de duas fases aquosas apresentam propriedades físicas bem diferentes dos sistemas aquoso-orgânico convencionais, empregados na engenharia química, em processos de extração líquido-líquido clássicos. Apenas a diferença entre as massas específicas das duas fases está dentro dos limites considerados adequados à utilização em processos de extração líquido-líquido. Apesar disso, estes sistemas têm sido aplicados com sucesso em processos de extração líquido-líquido em larga escala (Hustedt et al, 1985).

As extrações de poucas proteínas foram testadas em colunas de extração líquido-líquido que operam em contínuo, usando-se sistemas de duas fases aquosas. A maioria dos trabalhos encontrados refere-se ao uso de colunas “spray” e York-Scheibel, operando de modo semi-contínuo e colunas de discos rotativos, operando de modo contínuo.

Nos experimentos, a proteína total, a atividade enzimática e a quantidade de citocromo b5 foram determinadas em ambas as fases, durante a extração. Essa determinação foi realizada através dos métodos analíticos descritos no Capítulo 4.

Nestes experimentos foram avaliados o Índice de Recuperação do Sóluto, o Coeficiente de Transferência de Massa e a Eficiência de Separação. Para os casos de sistemas formados com o PEG 1500, o rendimento em proteína total, a recuperação da atividade enzimática e o fator de purificação foram também analisados.

Os sistemas de duas fases aquosas PEG-Fosfatos de potássio utilizados nas extrações em contínuo foram selecionados previamente nas extrações em descontínuo, para cada proteína. A seguir, os resultados são apresentados em dois itens: extração de citocromo b5 e extração de ascorbato oxidase.

5.3.2.1. Extração Contínua de Citocromo b5 na Micro-Coluna de Campânulas Pulsantes

O estudo da extração de citocromo b5 foi realizada a fim de analisar o comportamento da extração líquido-líquido durante o tempo de operação da micro-coluna. Com base nos resultados obtidos, encontrou-se as melhores condições de operação da micro-coluna. Estes experimentos foram realizados usando-se o sistema de duas fases aquosas escolhido nos experimentos de extração em descontínuo. Posteriormente, usou-se a melhor condição de operação obtida nestes experimentos para analisar a extração de citocromo b5 na micro-coluna desenvolvida neste trabalho, usando-se o sistema de duas fases aquosas formado por PEG 1500-Fosfatos de potássio. Nestes experimentos, avaliou-se, além da extração de citocromo b5, a transferência de proteína total, o fator de purificação e a percentagem de recuperação global de citocromo b5 e de proteína total.

A extração de citocromo b5 foi realizada utilizando o sistema constituído de 17,7 % (p/p) de PEG 1000 e 15,7 % (p/p) de Fosfato de potássio, com pH 7,3. O extrato bruto da proteína foi diluído na fase rica em PEG e, assim, a transferência de massa ocorre da fase rica em PEG (fase leve) para a fase rica em sal (fase pesada).

Nas figuras 5.13, 5.14 e 5.15, observa-se o comportamento da transferência de citocromo b5, durante o tempo de operação da micro-coluna.

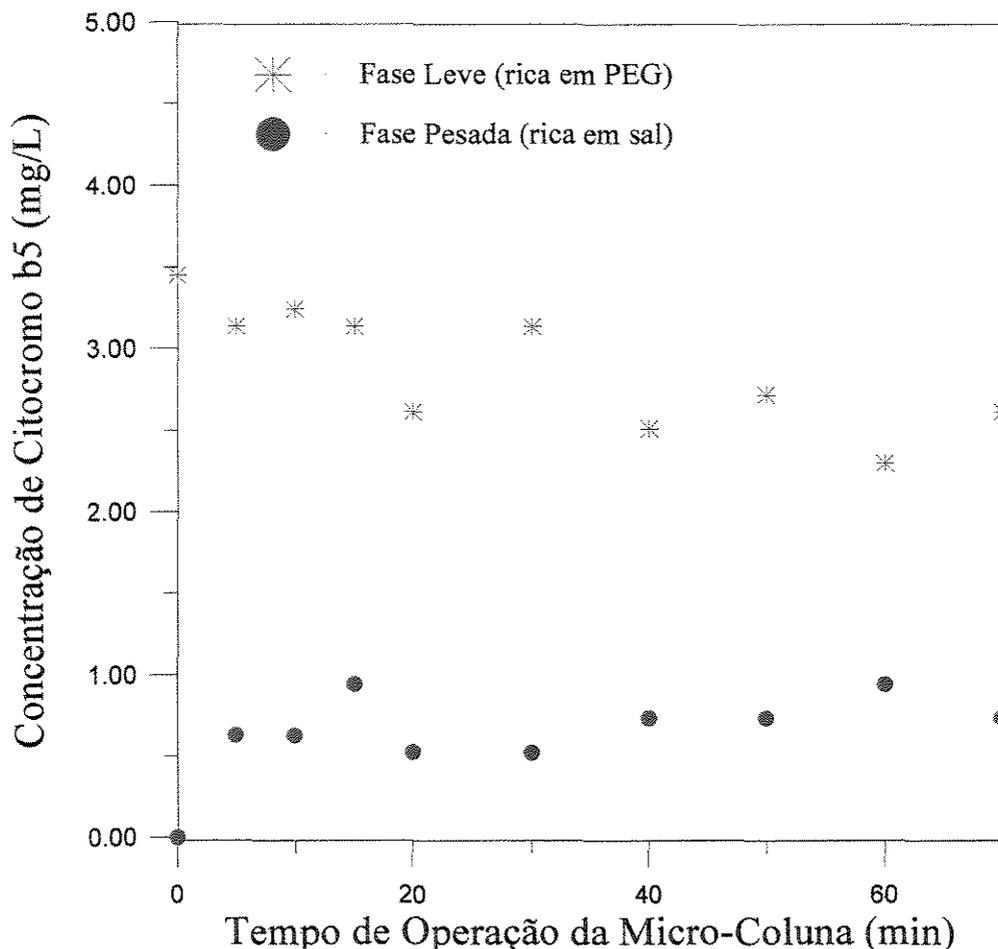


Figura 5.13 - Comportamento da extração de citocromo b5 nas fases rica em PEG 1000 e rica em sal durante o tempo de operação da micro-coluna. Condições de operação usadas: vazão total das fases - 4,7 mL/min e frequência de pulsação - 0,14 pulsos/segundo.

Nas figuras acima citadas, é nítido o aumento da concentração de citocromo b5 na fase rica em sal e a diminuição da concentração de citocromo b5 na fase rica em PEG. Pode-se verificar que a micro-coluna tem uma operação estável. Foram observadas a ocorrência de pequenas oscilações em algumas medidas da concentração de citocromo b5, contudo essas oscilações podem ser consideradas normais e não interferiram no comportamento da extração de citocromo b5 na micro-coluna. O fato da extração ser realizada a partir de extratos brutos pode ser responsável por estas oscilações observadas, já que as impurezas e

outras proteínas que estão presentes no extrato podem interferir na transferência de citocromo b5, mesmo que em pequena intensidade. Além disso, pequenos erros experimentais podem ser responsáveis por estas oscilações.

Assim, verificou-se uma tendência de aumento crescente da quantidade de citocromo b5 transferida da fase rica em PEG para a fase rica em sal. Observou-se que este aumento é mais intenso nos primeiros minutos de operação da micro-coluna, na maioria dos casos.

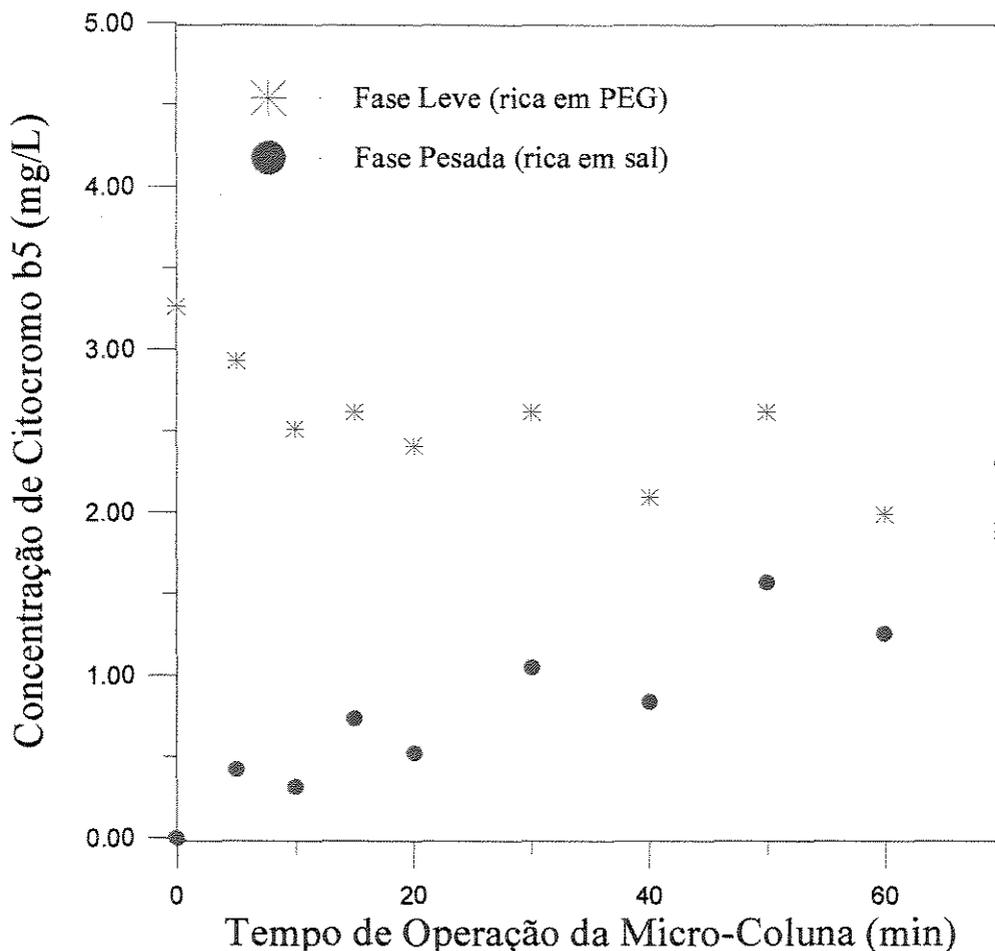


Figura 5.14 - Comportamento da extração de citocromo b5 nas fases rica em PEG 1000 e rica em sal durante o tempo de operação da micro-coluna. Condições de operação usadas: vazão total das fases - 4,7 mL/min e frequência de pulsação - 0,2 pulsos/segundo.

Notou-se, após terminada a operação da micro-coluna, a formação de uma pequena quantidade de precipitado na interface entre as fases, sendo que este precipitado pode ser considerado desprezível em todos os experimentos de extração de citocromo b5 realizados.

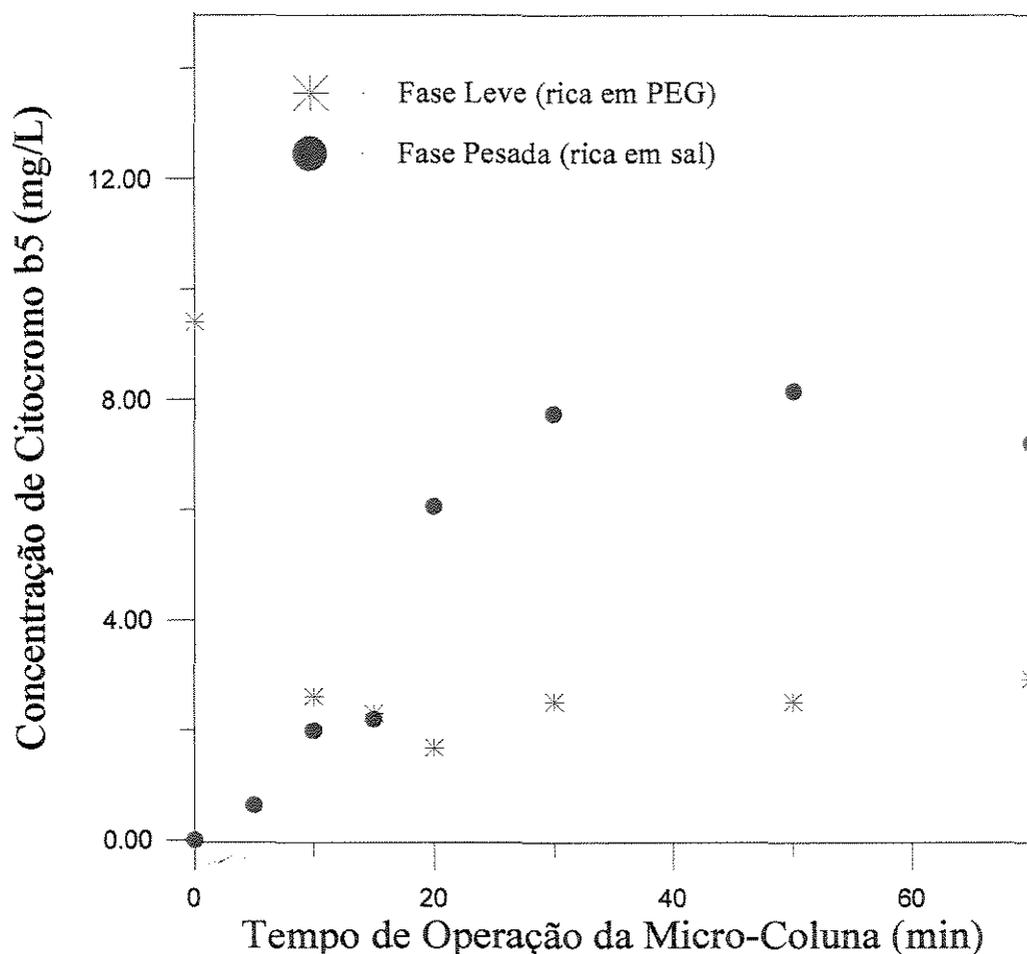


Figura 5.15 - Comportamento da extração de citocromo b5 nas fases rica em PEG 1000 e rica em sal durante o tempo de operação da micro-coluna. Condições de operação usadas: vazão total das fases - 4,7 mL/min e frequência de pulsação - 1 pulso/segundo.

De acordo com os resultados apresentados, pode ser verificada uma tendência de que com aproximadamente 30 minutos de operação, quando altas frequências de pulsação (1 pulso/segundo) são empregadas, o estado estacionário seja atingido, apesar de que pequenas variações na concentração tenham ocorrido durante os 70 minutos de operação da micro-coluna, na maioria dos casos estudados.

5.3.2.1.1. Influência da Frequência de Pulsação no Índice de Recuperação do Sóluto (I_r)

Os dados referentes ao Índice de Recuperação do Sóluto foram calculados a partir dos valores da concentração de citocromo b5 nas correntes de entrada e de saída da fase rica em PEG, no estado estacionário. Nos casos em que ocorreram pequenas oscilações nas concentrações medidas, considerou-se como concentração de saída no estado estacionário, a média entre os valores da concentração de citocromo b5 a partir do ponto em que pode-se considerar que o estado estacionário tenha sido atingido. As oscilações nas medidas da concentração ocorreram, provavelmente, devido a pequenos erros experimentais.

O comportamento do Índice de Recuperação do Sóluto (I_r) em relação à variação da frequência de pulsação pode ser observado na figura 5.16.

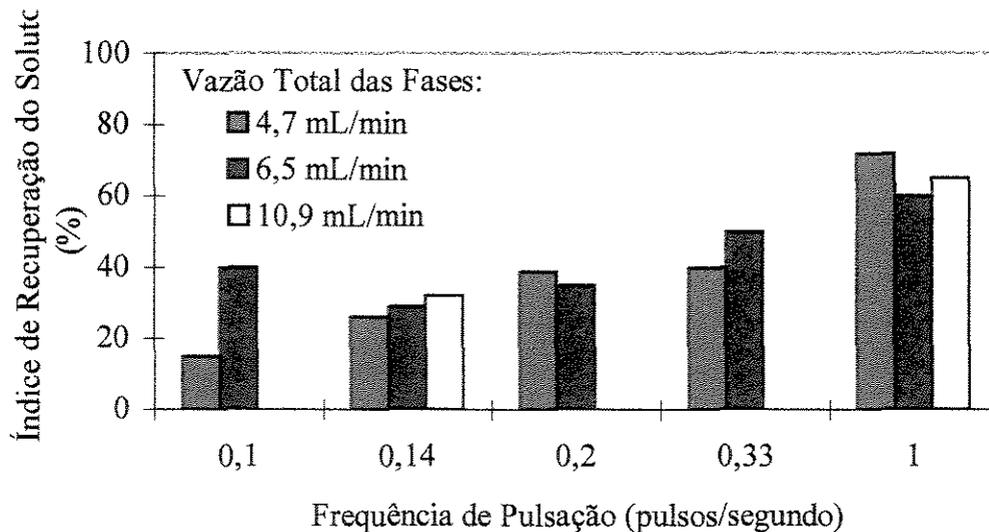


Figura 5.16 - Influência da frequência de pulsação e da vazão total das fases no Índice de Recuperação do Sóluto, no estado estacionário.

Observando-se os resultados obtidos, verificou-se primeiramente, uma tendência de aumento da extração, representado pelo aumento do Índice de Recuperação do Solute, com o aumento da frequência de pulsação, na maioria dos casos estudados.

Esta tendência pode ser explicada porque com frequências de pulsação mais elevadas, deve ocorrer uma maior quebra das gotas, fazendo com que estas tornem-se menores e mais numerosas no sistema. Isso faz com que o transporte de soluto, no caso o citocromo b5, entre as duas fases seja mais fácil, principalmente devido ao aumento da área interfacial de contato entre as fases.

O aumento da frequência de pulsação proporciona uma maior agitação e maior mistura entre as fases, além de aumentar a turbulência no interior da micro-coluna. Estes fatores favorecem a transferência de massa e fazem com que o Índice de Recuperação do Solute aumente.

Embora experimentalmente tenha sido observado um pequeno arraste da fase dispersa pela fase contínua, a frequências de pulsação elevadas, este arraste não influenciou o comportamento da extração, ou seja, do Índice de Recuperação do Solute.

A velocidade de pulsação está relacionada à intensidade de formação da dispersão de gotas que é gerada quando o líquido atravessa os orifícios das campânulas. Assim, quanto maior for a velocidade de pulsação, mais intensa é a formação desta dispersão. A velocidade de pulsação, $A \cdot f$, é o principal responsável pelo mecanismo de mistura no interior dos estágios da coluna.

Observa-se na figura 5.16, que o Índice de Recuperação do Solute aumenta com o aumento da frequência de pulsação para todas as vazões total das fases estudadas.

No caso da variação da frequência de pulsação de 0,10 pulsos/segundo para 0,14 pulsos/segundo e vazão total das fases de 6,5 mL/min, notou-se uma diminuição do Índice de Recuperação do Solute. Contudo, a partir desta frequência de pulsação, o sistema comportou-se da maneira esperada, ou seja, aumentando-se a frequência de pulsação, ocorre o aumento do Índice de Recuperação do Solute. Esta é a única exceção, relacionada ao

comportamento do Índice de Recuperação do Sóluto, observada nos resultados experimentais. Os demais resultados comportaram-se da maneira esperada.

A operação do equipamento mostrou-se estável, já que ocorre o aumento da extração com o aumento da frequência de pulsação, sendo este o comportamento esperado.

Tendo em vista estes resultados, a expectativa de obter-se um eficiente contato entre as fases neste tipo de equipamento, devido à agitação se processar na direção vertical, que é a direção de escoamento das fases, e também devido à geometria dos dispositivos de agitação, foi aparentemente confirmada. Isto foi verificado pelos altos índices de extração obtidos.

5.3.2.1.2. Influência da Vazão Total das Fases no Índice de Recuperação do Sóluto

Experimentalmente, observou-se um aumento do arraste da fase dispersa pela fase contínua, a frequências de pulsação e vazão total das fases mais elevadas. Contudo, este arraste não influenciou o comportamento do sistema. Deve-se ressaltar que mesmo a frequências de pulsação e vazões total das fases maiores, o arraste foi pequeno, embora tenha sido maior do que a frequências de pulsação e vazões total das fases menores.

O arraste foi maior a frequências de pulsação e vazões total das fases elevadas porque o aumento da frequência de pulsação faz com que as gotas da fase dispersa se quebrem e quanto maior a frequência de pulsação, menor é o tamanho das gotas e maior é o número delas. As gotas menores da fase dispersa são mais facilmente arrastadas pela fase contínua. As maiores vazões total das fases fazem com que essas gotas pequenas sejam ainda mais facilmente arrastadas.

Nos equipamentos de contato contínuo agitados, em geral, a mistura é resultante, do efeito da agitação imposta ao fluido. Esta agitação é obtida tanto através de agentes externos, como por exemplo os agitadores, como também pela própria movimentação das correntes em escoamento.

O comportamento do sistema em relação à vazão total das fases pode ser observado na figura 5.16.

Observou-se nos resultados obtidos, uma tendência de aumento da extração, ou seja, aumento do Índice de Recuperação do Sóluto com o aumento da vazão total das fases. O aumento da turbulência causada pela elevação da velocidade superficial de escoamento deve proporcionar melhores índices de mistura das fases. Isso faz com que ocorra o aumento do Índice de Recuperação do Sóluto, já que aumenta a extração.

A agitação decorrente do escoamento das correntes no interior da micro-coluna está associada à vazão total de alimentação das fases na coluna, o que torna este parâmetro, teoricamente, de grande importância no comportamento e desempenho do equipamento.

O erro padrão nas medidas do Índice de Recuperação do Sóluto é de aproximadamente 7,8 %.

Deve-se ressaltar que este erro corresponde, na maioria dos casos, a medidas de massa de proteínas inferiores a 1 mg.

Na figura 5.16, pode ser observado que a diferença entre os valores do Índice de Recuperação do Sóluto, variando-se a vazão total das fases, foi pequena. Isso pode ser visto na tabela 5.6.

Tabela 5.6 - Variação do Índice de Recuperação do Sóluto com a vazão total das fases.

Frequência de Pulsação (pulsos/segundo)	Vazão Total das Fases (mL/min)	Índice de Recuperação do Sóluto (%)	Frequência de Pulsação (pulsos/segundo)	Vazão Total das Fases (mL/min)	Índice de Recuperação do Sóluto (%)
0,14	4,7	26	1	4,7	72
0,14	6,5	29	1	6,5	60
0,14	10,9	31,8	1	10,9	65

Observou-se que, com baixas frequências de pulsação, o aumento da vazão total das fases provoca um aumento do Índice de Recuperação do Sóluto, porém este aumento foi

pequeno. Com frequências de pulsação elevadas, notou-se que o Índice de Recuperação do Solutu era independente da vazão total das fases, como pode ser observado na tabela 5.6 e na figura 5.16. Talvez isso tenha ocorrido porque com altas frequências de pulsação, as gotas sejam muito pequenas e mais facilmente arrastadas pela fase contínua, com altas vazões total das fases. Assim, o arraste é maior nestas condições do que com vazões total das fases menores. Este arraste pode fazer com que o Índice de Recuperação do Solutu seja aparentemente independente da vazão total das fases, a frequências de pulsação elevadas, ou mesmo, ter provocado uma pequena diminuição do Índice de Recuperação do Solutu.

Desta análise pode-se concluir que a vazão total das fases influenciou o Índice de Recuperação do Solutu, contudo esta influência foi muito pequena se comparada à influência da frequência de pulsação.

Nos casos em que a frequência de pulsação é baixa (entre 0,10 pulsos/segundo e 0,20 pulsos/segundo) a influência da vazão total das fases no Índice de Recuperação do Solutu foi pequena, porém mais significativa do que a altas frequências de pulsação (1 pulso/segundo), podendo-se considerar que o Índice de Recuperação do Solutu tenha sido independente da vazão total das fases. Com a frequência de pulsação de 0,33 pulsos/segundo, observou-se um maior aumento do Índice de Recuperação do Solutu com o aumento da vazão total das fases. Talvez este comportamento tenha ocorrido devido ao efeito da interação entre a vazão total das fases e a frequência de pulsação.

Em resumo, pode-se concluir que o efeito da vazão total das fases no Índice de Recuperação do Solutu foi muito pequeno. Pode-se considerar que, a frequências de pulsação elevadas, o Índice de Recuperação do Solutu tenha sido independente da vazão total das fases.

5.3.2.1.3. Influência da Frequência de Pulsação na Eficiência de Separação

A Eficiência de Separação é uma medida de quanto o sistema se aproxima do equilíbrio. Para o cálculo da eficiência, usou-se a equação 2.7. Espera-se que o aumento da frequência de pulsação produza maiores valores da Eficiência de Separação. Neste caso, a

Eficiência de Separação é uma comparação entre as extrações em contínuo e em descontínuo.

O comportamento da Eficiência de Separação em relação à frequência de pulsação pode ser observado na figura 5.17. Pode ser verificado que o comportamento da Eficiência de Separação foi muito semelhante ao comportamento do Índice de Recuperação do Sóluto.

Na tabela 5.7, encontram-se alguns exemplos dos valores da Eficiência de Separação obtidos experimentalmente.

A partir da figura 5.17, constatou-se que a Eficiência de Separação aumentou com o aumento da frequência de pulsação, chegando a valores em torno de 100%. Em alguns casos, valores da Eficiência de Separação superiores a 100 % foram obtidos. Observou-se que com frequências de pulsação de 1 pulso/segundo, independente da vazão total das fases usada, valores da Eficiência de Separação em torno de 100% foram obtidos. Verificou-se que o erro padrão médio dos valores da Eficiência de Separação obtidos experimentalmente foi de aproximadamente 10,9 %.

Assim, pode-se concluir que para altas frequências de pulsação, a Eficiência de Separação e o Índice de Recuperação do Sóluto são independentes da vazão total das fases. Portanto, é melhor trabalhar com baixas vazões.

Tabela 5.7- Variação da Eficiência de Separação com a vazão total das fases.

Frequência de Pulsação (pulsos/segundo)	Vazão Total das Fases (mL/min)	Eficiência de Separação (%)	Frequência de Pulsação (pulsos/segundo)	Vazão Total das Fases (mL/min)	Eficiência de Separação (%)
0,14	4,7	38,7	1	4,7	113,4
0,14	6,5	48,2	1	6,5	89,8
0,14	10,9	51,9	1	10,9	103,5

Observou-se uma tendência de aumento da extração, ou seja, da Eficiência de Separação com o aumento da frequência de pulsação para as vazões total das fases estudadas. Esta tendência foi observada porque com frequências mais elevadas ocorre uma maior quebra das gotas da fase dispersa no interior da micro-coluna e isso facilita o

transporte de soluto, no caso o citocromo b5, entre as duas fases, devido ao aumento da área interfacial de contato entre elas. O aumento da frequência de pulsação aumenta a agitação das fases no interior da micro-coluna e conseqüentemente a mistura entre elas. Isso favorece a transferência de massa e faz com que o sistema se aproxime mais ainda do equilíbrio. Com um maior contato entre as fases, certamente maiores valores para a Eficiência de Separação devem ser obtidos. A exceção a este comportamento foi observada, como no estudo do Índice de Recuperação do Solute, para a vazão total das fases de 6,5 mL/min e entre as frequências de pulsação de 0,10 pulsos/segundo e 0,14 pulsos/segundo.

Embora experimentalmente tenha sido observado o arraste da fase dispersa pela fase contínua, a frequências de pulsação e vazões total das fases elevadas, este arraste foi pequeno e não influenciou o comportamento da Eficiência de Separação.

Teoricamente, associa-se a fração de retenção da fase dispersa à Eficiência de Separação. Contudo, na série de experimentos com vazão total das fases de 6,5 mL/min, de acordo com os resultados experimentais obtidos, observou-se que a Eficiência de Separação aumentou com o aumento da frequência de pulsação, porém na análise da fração de retenção da fase dispersa (figura 5.5), observou-se a presença de um ponto de máximo. A fração de retenção da fase dispersa aumentava até a frequência de pulsação de 0,2 pulsos/segundo, a partir dessa frequência de pulsação, ocorreu um decréscimo da fração de retenção da fase dispersa com o aumento da frequência de pulsação, provavelmente devido ao arraste da fase dispersa pela fase contínua. Contudo, esta diminuição da fração de retenção da fase dispersa não causou a diminuição da Eficiência de Separação e portanto, não influenciou o comportamento desta grandeza. Provavelmente isto ocorreu porque, mesmo havendo o arraste da fase dispersa pela fase contínua, o tempo e a área de contato entre as fases, além do número de gotas presentes durante o processo de extração fazem com que elevadas taxas de transferência de massa alcançadas.

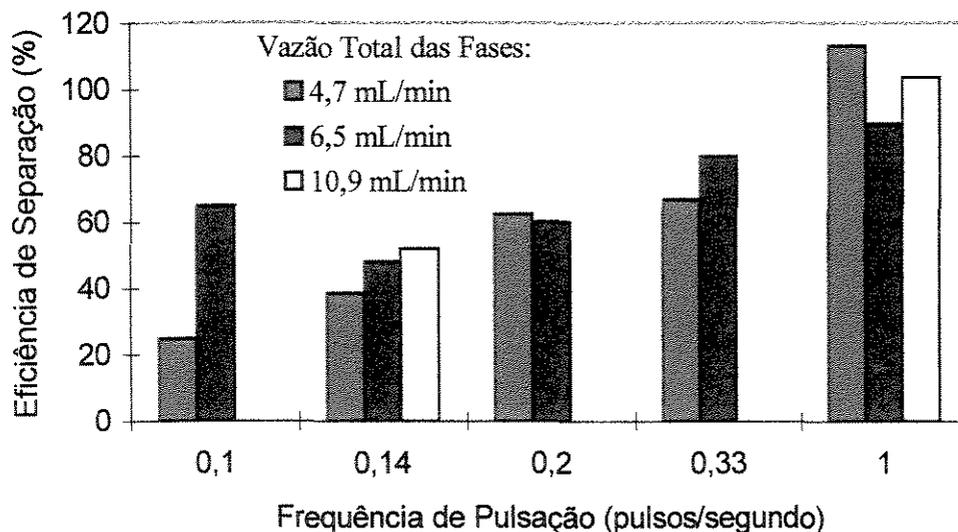


Figura 5.17 - Influência da frequência de pulsação e da vazão total das fases na Eficiência de Separação.

Assim, de acordo com os resultados obtidos, concluiu-se que o sistema alcançou o equilíbrio, ou pelo menos aproximou-se dele, quando a frequência de pulsação de 1 pulso/segundo foi usada, independentemente da vazão total das fases. Pode-se chegar a esta conclusão porque os valores da Eficiência de Separação nestes casos foram próximos, ou superiores, a 100 %.

Pode-se também concluir que a micro-coluna teve uma operação estável, onde o comportamento esperado, o aumento da Eficiência de Separação com o aumento da frequência de pulsação, foi observado.

Esta micro-coluna apresentou um excelente desempenho na extração de citocromo b5 com o sistema de duas fases aquosas usado nos experimentos.

5.3.2.1.4. Influência da Vazão Total das Fases na Eficiência de Separação

O comportamento da Eficiência de Separação em relação à vazão total das fases é observado na figura 5.17. Observou-se que o comportamento da Eficiência de Separação em relação à vazão total das fases foi muito semelhante ao comportamento do Índice de Recuperação do Sólido.

Observou-se na figura 5.17 e na tabela 5.7, que a Eficiência de Separação aumentou com o aumento da vazão total das fases.

Espera-se que ocorra um aumento da Eficiência de Separação com o aumento da vazão total das fases. Como já foi comentado anteriormente, isto ocorre porque com o aumento da vazão total das fases, aumenta a agitação imposta ao sistema. O aumento da vazão total das fases também provoca o aumento da turbulência causada pela elevação da velocidade superficial do escoamento, o que proporciona melhores índices de mistura das fases.

De acordo com os resultados obtidos, observou-se que ocorreu um aumento da Eficiência de Separação com o aumento da vazão total das fases. Contudo, a influência da vazão total das fases na Eficiência de Separação foi pequena.

Com frequências de pulsação elevadas, verificou-se que a Eficiência de Separação era independente da vazão total das fases, como pode ser observado na tabela 5.7 e na figura 5.17.

Assim, pode-se concluir que a vazão total das fases influenciou a Eficiência de Separação, contudo esta influência foi muito pequena, principalmente se comparada à influência da frequência de pulsação.

Porto (1998) observou que para a maioria dos sistemas analisados, a Eficiência de Separação foi praticamente independente da vazão total das fases, no estudo da extração de BSA (bovine serum albumin) em uma coluna de discos perfurados rotativos (PRDC) com sistemas de duas fases aquosas PEG-Fosfatos de potássio.

Como já foi comentado anteriormente para o Índice de Recuperação do Sólido, com frequências de pulsação baixas (entre 0,10 pulsos/segundo e 0,20 pulsos/segundo), a influência da vazão total das fases na Eficiência de Separação foi pequena, porém mais significativa do que a altas frequências de pulsação (1 pulso/segundo), onde pode-se considerar que a Eficiência de Separação era independente da vazão total das fases. Com a frequência de pulsação de 0,33 pulsos/segundo, observou-se uma maior influência da vazão total das fases na Eficiência de Separação. Assim, com a frequência de pulsação de 0,33 pulsos/segundo, verificou-se um maior aumento da Eficiência de Separação com o aumento da vazão total das fases do que a frequências pulsação mais baixas. Provavelmente, este comportamento tenha ocorrido devido ao efeito da interação entre a vazão total das fases e a frequência de pulsação.

De acordo com esta análise, pode-se concluir que a frequência de pulsação exerceu uma influência bem maior no comportamento da Eficiência de Separação do que a vazão total das fases. A vazão total das fases exerceu uma influência muito pequena no comportamento da Eficiência de Separação.

5.3.2.1.5. Influência da Frequência de Pulsação no Coeficiente de Transferência de Massa (k_{da})

O comportamento do Coeficiente de Transferência de Massa em função da frequência de pulsação pode ser observado na figura 5.18.

Observou-se um aumento no Coeficiente de Transferência de Massa com o aumento da frequência de pulsação. Isto ocorreu porque o aumento da frequência de pulsação melhora a mistura entre as fases, diminui o tamanho médio das gotas da fase dispersa, aumenta o número de gotas e com isso, aumenta a área de contato interfacial entre as fases. Devido a esses fatores, ocorre um aumento da taxa de transferência de massa, já que esta é diretamente proporcional à área de contato interfacial.

Novamente, uma exceção a este comportamento foi verificada com a vazão total das fases de 6,5 mL/min e com frequências de pulsação variando de 0,10 pulsos/segundo a 0,14 pulsos/segundo. Nesta situação, observou-se uma diminuição no Coeficiente de

Transferência de Massa com o aumento da frequência de pulsação. Este comportamento já foi comentado nas análises anteriores.

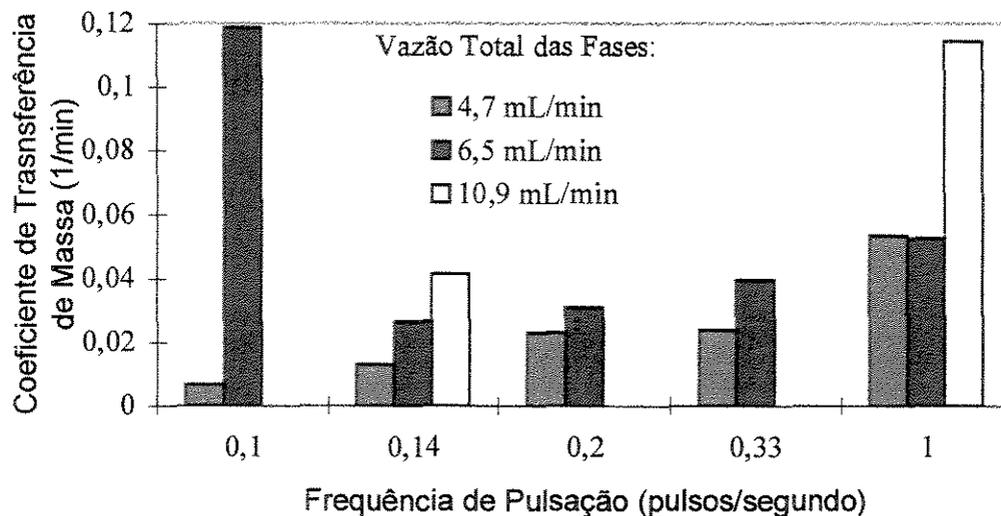


Figura 5.18 - Influência da frequência de pulsação e da vazão total das fases no Coeficiente de Transferência de Massa.

Nos trabalhos de Jafarabad et al (1992 a e b) e Pawar et al (1997), o mesmo comportamento foi observado, ou seja, o aumento do Coeficiente de Transferência de Massa com o aumento da velocidade de agitação na coluna e com o aumento da velocidade superficial da fase dispersa.

Os valores do Coeficiente de Transferência de Massa obtidos no presente trabalho, foram da mesma ordem de grandeza dos obtidos por Porto (1998) em uma coluna de discos perfurados rotativos (PRDC) e maiores do que os obtidos por Jafarabad et al (1992 a e b) e Pawar et al (1997) em colunas “spray”, York-Scheibel e “spray” modificada.

5.3.2.1.6. Influência da Vazão Total das Fases no Coeficiente de Transferência de Massa

O comportamento do Coeficiente de Transferência de Massa em relação à vazão total das fases é observado na figura 5.18.

Observou-se um aumento do Coeficiente de Transferência de Massa com o aumento da vazão total das fases.

Isto ocorre porque o aumento da vazão total das fases promove um aumento da mistura entre as fases e da turbulência no sistema. Estes fatores aumentam a área e o tempo de contato entre as fases e assim, o Coeficiente de Transferência de Massa aumenta. O Coeficiente de Transferência de Massa é diretamente proporcional à área de contato entre as fases.

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que a vazão total das fases exerceu uma importante influência no Coeficiente de Transferência de Massa, em todas as frequências de pulsação estudadas, exceto para 1 pulso/segundo e vazões total das fases de 4,7 mL/min e 6,5 mL/min. Neste caso, os valores do Coeficiente de Transferência de Massa foram aproximadamente iguais.

Os resultados obtidos por vários autores (Sawant et al, 1990; Jafarabad et al, 1992 a e b e Pawar et al, 1997) com sistemas de duas fases aquosas mostram um aumento do Coeficiente de Transferência de Massa com o aumento da velocidade da fase dispersa, já que o tamanho das gotas, a altas velocidades é menor e produz altas áreas de transferência de massa.

Os valores obtidos por Porto (1998) na extração de citocromo b5 ($0,06 \text{ min}^{-1}$) foram bem parecidos com os obtidos neste trabalho ($0,0536 \text{ min}^{-1}$, em sistemas formados com PEG 1000 e $0,0723 \text{ min}^{-1}$, em sistemas formados com PEG 1500).

O erro padrão nas medidas do Coeficiente de Transferência de Massa era de aproximadamente 20 % das medidas.

5.3.2.1.7. Extração de Citocromo b5 em Sistemas de Duas Fases Aquosas Formados com PEG 1500

De acordo com o estudo apresentado anteriormente, as melhores condições de operação da micro-coluna foram:

- Vazão Total das Fases: 4,7 mL/min (vazão total das fases baixa)
- Frequência de Pulsação: 1 pulso/segundo (frequência de pulsação alta)

Estas condições foram obtidas nos estudos anteriores, com a análise apenas da transferência de citocromo b5.

Escolheu-se a frequência de pulsação de 1 pulso/segundo, porque neste valor da frequência de pulsação, obteve-se valores da Eficiência de Separação de aproximadamente 100 %, independente da vazão total das fases escolhida.

A vazão total das fases escolhida foi de 4,7 mL/min porque com esta vazão total das fases, o arraste foi bem pequeno. Com maiores valores da vazão total das fases, o arraste aumentava. O arraste não afetou o comportamento da extração por ter sido pequeno. Contudo, ele deve ser evitado, visando não prejudicar as etapas de purificação posteriores. Além disso, o arraste reduz a transferência de massa.

Foi também observado que com estas condições de operação, obteve-se um bom desempenho do equipamento e uma operação estável.

Realizou-se a extração de citocromo b5 em sistemas formados com PEG 1500, usando-se a melhor condição de operação da micro-coluna e com a composição do sistema de duas fases aquosas escolhido nos experimentos em descontínuo. O PEG 1500 foi escolhido por ser um produto nacional, de preço mais acessível e que apresenta propriedades e comportamento de extração semelhantes aos do PEG 1000, que foi considerado o mais adequado à extração do citocromo b5, a partir do seu extrato bruto.

Nestes estudos, também analisou-se a recuperação total de citocromo b5 e de proteína total, além do fator de purificação.

Também aumentou-se a concentração de extrato bruto na fase rica em PEG na entrada da micro-coluna, já que o extrato é diluído nesta fase. Na faixa estudada (de 1 g/100 mL a 10 g/100 mL), a concentração inicial do extrato bruto não alterou o comportamento da extração.

A extração de citocromo b5 foi realizada utilizando-se um sistema de duas fases aquosas constituído de 16,2 % (p/p) de PEG 1500 e 14,3 % (p/p) de Fosfatos de potássio, com pH 7,3.

O comportamento do sistema durante os 70 minutos de operação da micro-coluna pode ser observado na figura 5.19. Nesta figura, pode-se verificar o perfil da concentração de citocromo b5 nas fases rica em PEG e rica em sal, em relação ao tempo de operação da micro-coluna.

Pode-se verificar na figura 5.19, que o sistema apresentou pequenas oscilações e que o estado estacionário foi alcançado aproximadamente aos 30 minutos de operação da micro-coluna. Além disso, pode ser observado que a micro-coluna teve operação estável.

Observou-se um aumento crescente da quantidade de citocromo b5 transferida da fase rica em PEG para a fase rica em sal e conseqüentemente, uma diminuição na concentração de citocromo b5 na fase rica em PEG. Esta transferência foi mais intensa nos primeiros 20 minutos de operação da micro-coluna, sendo que após este tempo, a variação foi menor.

Ao fim da operação da micro-coluna, houve uma recuperação de 55,6 % de citocromo b5 na fase rica em sal e 6,7 % da proteína total na fase rica em sal. Esta recuperação é relativa à concentração que entra na coluna. Porém, em relação à quantidade de citocromo b5 que foi recuperada em ambas as fases, aproximadamente 81% do citocromo b5 recuperado se concentrou na fase rica em sal.

Porto (1998), em estudos em uma coluna de discos perfurados rotativos, obteve resultados semelhantes, alcançando cerca de 78 % de recuperação de citocromo b5 na fase extrato.

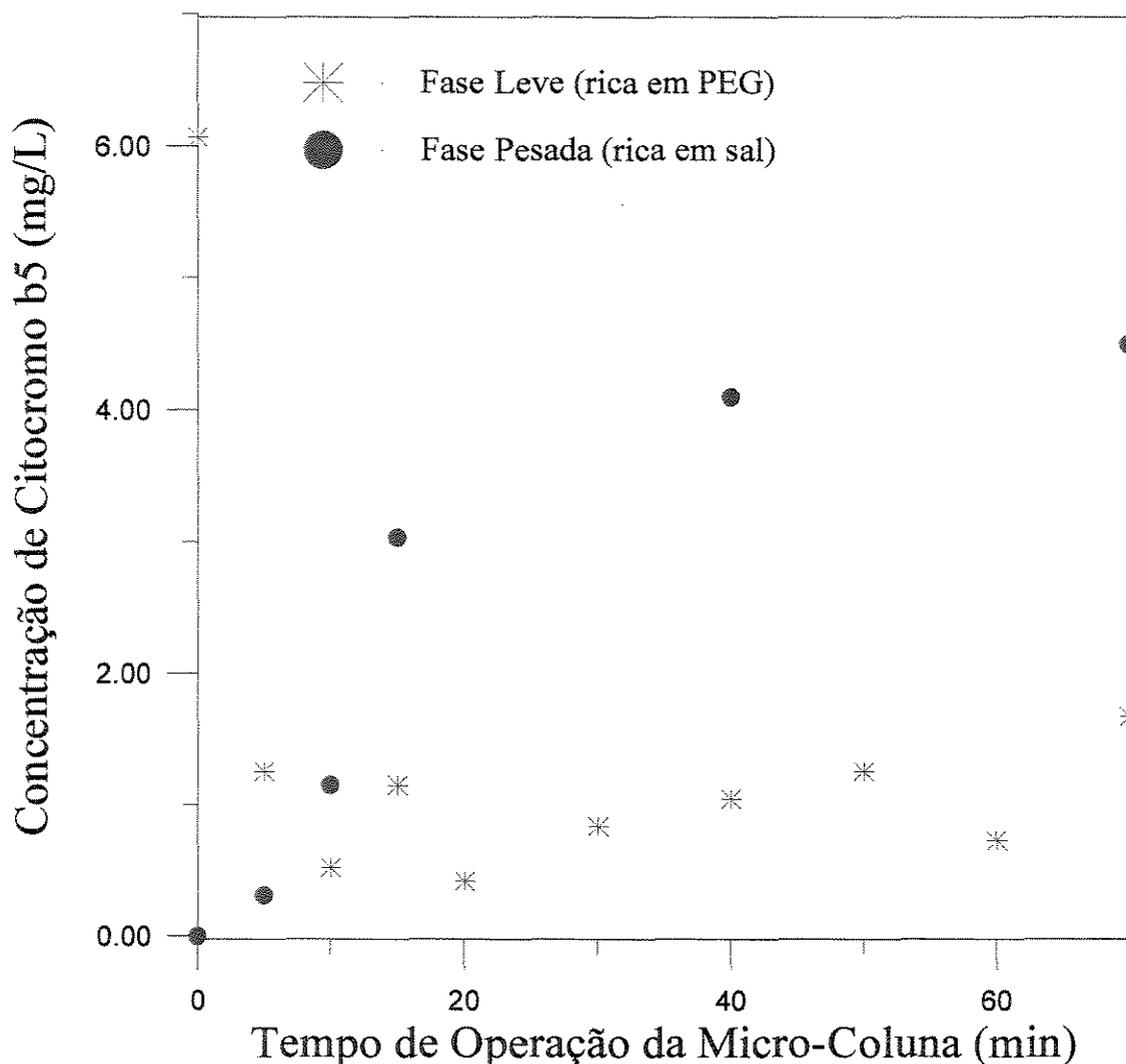


Figura 5.19 - Comportamento da extração de citocromo b5 a partir do seu extrato bruto, durante o tempo de operação da micro-coluna. Condições de operação empregadas: Frequência de Pulsação - 1 pulso/segundo e Vazão Total das Fases - 5,2 mL/min.

Um resumo dos resultados obtidos na extração contínua do citocromo b5 a partir de seu extrato bruto, com sistemas de duas fases aquosas formado por PEG 1500-Fosfatos de potássio, na melhor condição de operação da micro-coluna de campânulas pulsantes é mostrado a seguir:

- **Frequência de Pulsação:** 1 pulso/segundo (frequência de pulsação alta)

- **Vazão Total das Fases:** 5,2 mL/min (vazão total das fases obtida na posição de vazão baixa da bomba peristáltica)
- **Índice de Recuperação do Solute:** $81\% \pm 7,8\%$
- **Eficiência de Separação:** $113,5\% \pm 10,9\%$
- **Coefficiente de Transferência de Massa:** $0,0723 \text{ min}^{-1} \pm 0,0132 \text{ min}^{-1}$
- **Percentagem de Recuperação Total de Citocromo b5:** 68,5%
- **Percentagem de Recuperação Global de Proteína Total:** 40,6%
- **Fator de Purificação:** 8,3

Em comparação com os resultados obtidos na extração em descontínuo, observou-se na extração contínua, uma diminuição do fator de purificação e um aumento da recuperação de proteína total, sendo que a recuperação de citocromo b5 também foi maior. Esta comparação é apresentada na tabela 5.8. Assim, não há perda de citocromo b5 devido à agitação imposta ao sistema na micro-coluna.

Tabela 5.8 - Comparação entre a extração contínua e descontínua de citocromo b5.

	Extração Descontínua	Extração Contínua
Fator de Purificação	11,2	8,3
Recuperação de citocromo b5 (%)	58,8	68,5
Recuperação de Proteína Total (%)	7,8	40,6
Percentagem de citocromo b5 na fase rica em sal (%)	71,4	81

As grandes vantagens da operação contínua são a economia de tempo, já que o sistema atinge o equilíbrio mais rapidamente, e a rápida separação das fases no interior da

micro-coluna. A separação das fases ocorre devido à ação da gravidade, sem a necessidade do uso de centrífugas industriais. Geralmente, em operações contínuas, é possível o processamento de um maior volume de solução, em um equipamento relativamente pequeno e com um tempo de operação do equipamento menor do que em outros processos.

5.3.3. Extração de Ascorbato oxidase

A fim de verificar se a massa molecular da proteína exerce alguma influência no comportamento da extração contínua na micro-coluna de campânulas pulsantes, realizou-se a extração da ascorbato oxidase, a partir de seu extrato bruto, usando-se o sistema de duas fases aquosas, cuja composição foi selecionada nos experimentos de extração descontínua e as melhores condições de operação da micro-coluna, obtidas no estudo da extração de citocromo b5.

Para a ascorbato oxidase, o sistema de duas fases aquosas escolhido foi 16,2 % (p/p) de PEG 1500 e 14,3 % (p/p) de Fosfato de potássio, com pH 6,0.

Novamente, observou-se que a operação da micro-coluna foi estável e que não houve perda de atividade da ascorbato oxidase, devido à utilização da micro-coluna no processo de extração. Isto comprovou que a agitação imposta ao sistema, através das campânulas pulsantes, não foi agressiva ao sistema e não ocorreu a desnaturação da enzima.

O comportamento do sistema, durante a operação da micro-coluna, pode ser observado nas figuras 5.20 e 5.21.

Nestas figuras, observa-se um aumento crescente da transferência de proteína total e da atividade de ascorbato oxidase da fase rica em PEG para a fase rica em sal, durante o período de operação da micro-coluna. O sistema apresentou um comportamento semelhante ao observado na extração do citocromo b5.

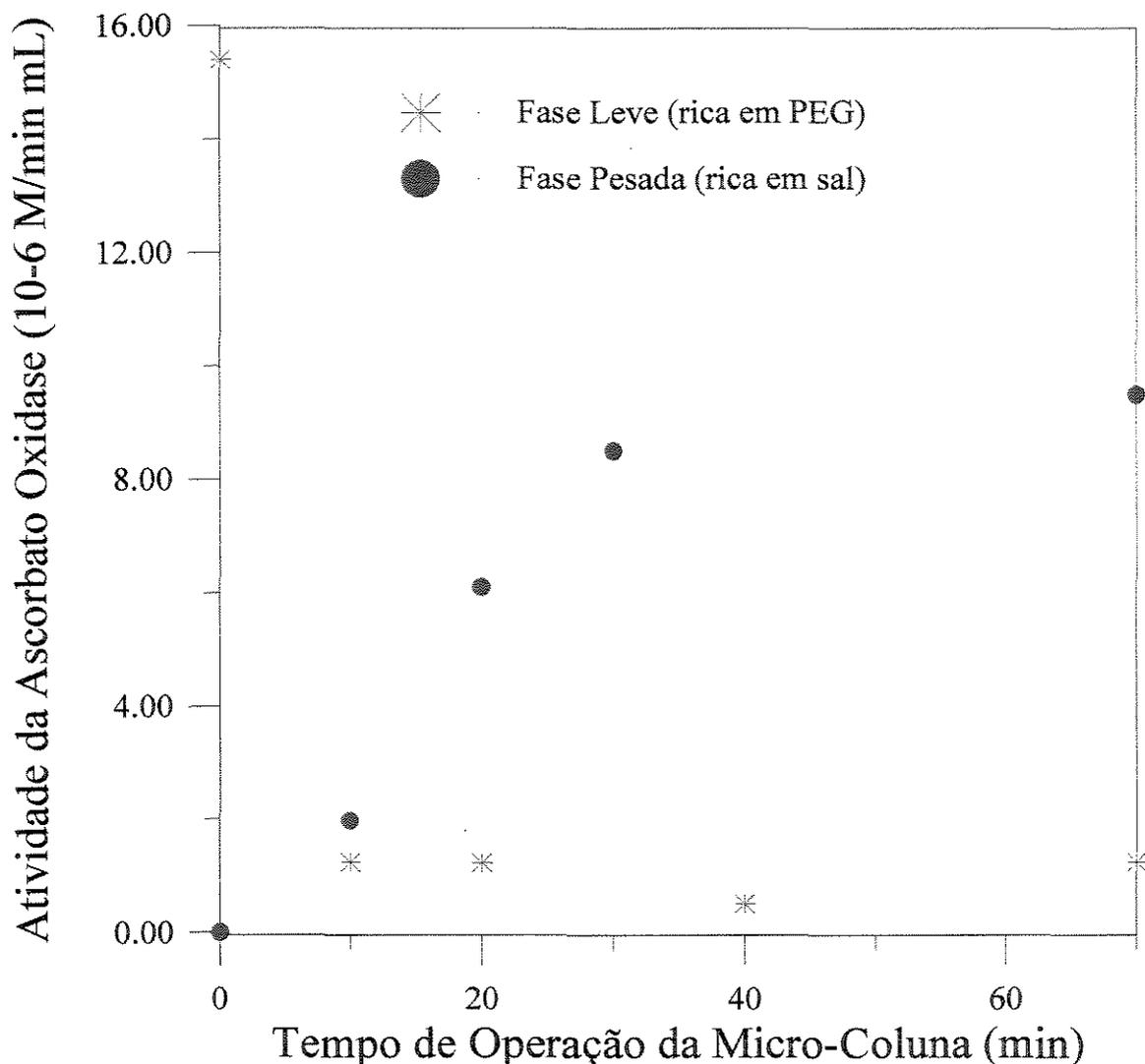


Figura 5.20 - Comportamento da extração de ascorbato oxidase, a partir do seu extrato bruto, durante o tempo de operação da micro-coluna. Condições de operação empregadas: Frequência de Pulsação - 1 pulso/segundo e Vazão Total das Fases - 5,2 mL/min.

Enquanto as concentrações de ascorbato oxidase e de proteína total aumentaram na fase rica em sal, elas diminuíram na fase rica em PEG. Observou-se que nos primeiros 30 minutos de operação da micro-coluna, esta transferência de massa foi mais intensa. Após este período, a transferência de massa foi menor.

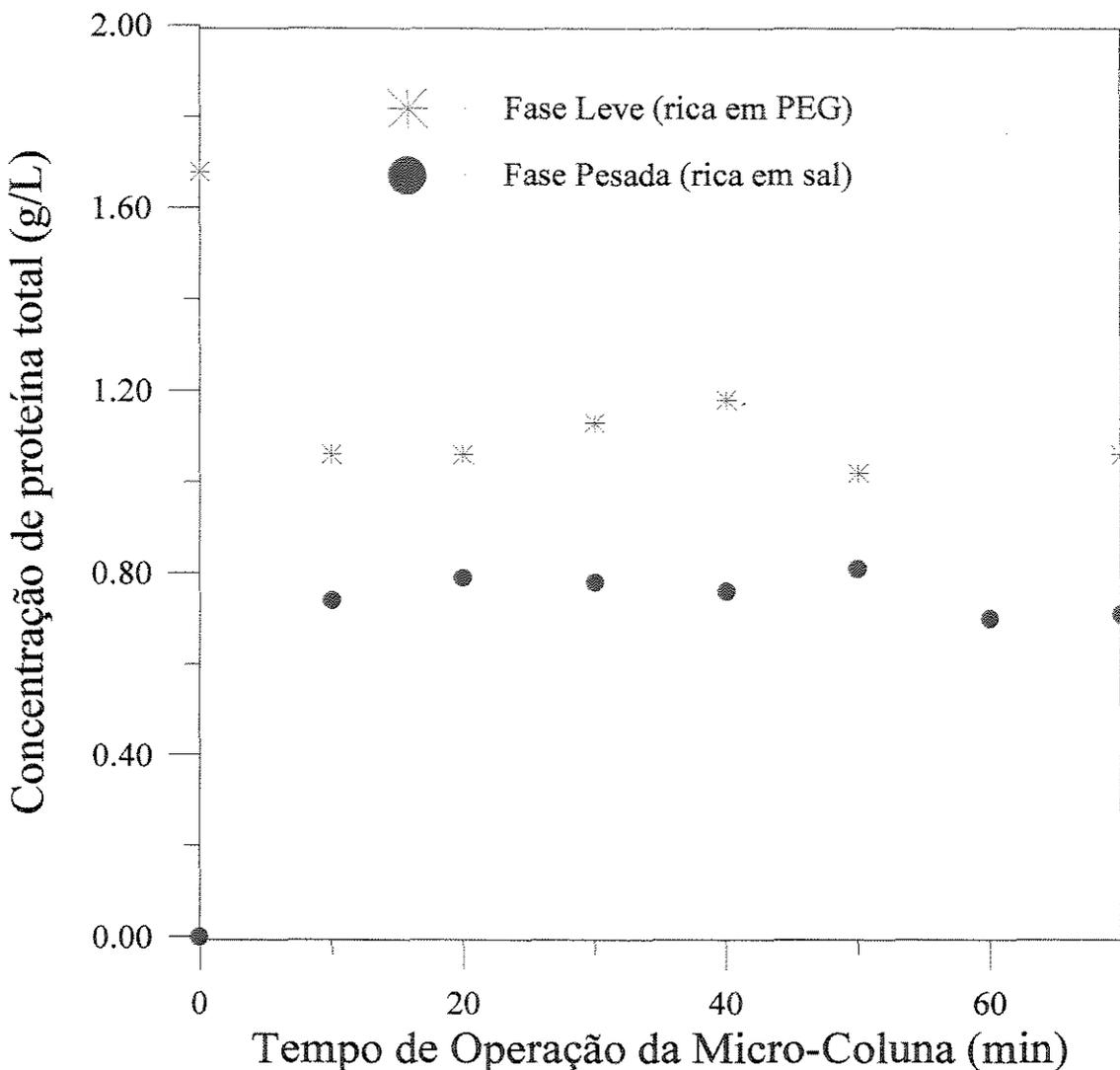


Figura 5.21 - Comportamento da extração de proteína total, a partir do extrato bruto de ascorbato oxidase, durante o tempo de operação da micro-coluna. Condições de operação empregadas: Frequência de Pulsação - 1 pulso/segundo e Vazão Total das Fases - 5,2 mL/min.

A seguir, encontra-se um resumo dos resultados obtidos na extração contínua de ascorbato oxidase, a partir de seu extrato bruto, com um sistema de duas fases aquosas formado por PEG 1500-Fosfatos de potássio, empregando-se a melhor condição de operação da micro-coluna de campânulas pulsantes, obtida nos experimentos com o citocromo b5.

- **Frequência de Pulsação:** 1 pulso/segundo (frequência de pulsação alta)
- **Vazão Total das Fases:** 5,2 mL/min (vazão total das fases baixa)
- **Índice de Recuperação do Solute:** 61,7% ± 7,8%
- **Eficiência de Separação :** 99,9% ± 10,9%
- **Coefficiente de Transferência de Massa :** 0,0474 min⁻¹ ± 0,0132 min⁻¹
- **Percentagem de Recuperação Total da Atividade da Ascorbato oxidase:** 51,7%
- **Percentagem de Recuperação Global de Proteína Total:** 77,2%
- **Fator de Purificação:** 1,34

Em comparação com os resultados obtidos em descontínuo, observou-se na extração contínua uma diminuição do fator de purificação e um aumento da percentagem de recuperação total da proteína total, sendo que a recuperação total da atividade da ascorbato oxidase foi um pouco menor. Esta comparação é apresentada na tabela 5.9.

Tabela 5.9 - Comparação entre a extração contínua e descontínua de ascorbato oxidase.

	Extração Descontínua	Extração Contínua
Fator de Purificação	2,75	1,34
Recuperação de ascorbato oxidase (%)	57,8	51,7
Recuperação de Proteína Total (%)	11,6	77,2
Percentagem de ascorbato oxidase na fase rica em sal (%)	61,7	61,7

Talvez este aumento da recuperação de proteína total tenha ocorrido porque a agitação pode dificultar a precipitação de parte do material que compõe o extrato na interface entre as fases, como aconteceu na extração descontínua. Além disso, a agitação pode influenciar a transferência de proteínas, fazendo com que a percentagem de recuperação de proteínas aumente. Experimentalmente, observou-se, no fim do período de operação da micro-coluna, a formação de um precipitado alaranjado na interface entre as fases que permaneceram no interior da micro-coluna.

Com a análise destes resultados, pode-se concluir que o Coeficiente de Transferência de Massa e a Eficiência de Separação, aparentemente, foram independentes da massa molecular da proteína a ser extraída. A variação nos valores do Coeficiente de Transferência de Massa e da Eficiência de Separação não foram significativos e pode-se considerar que estas grandezas não foram dependentes da massa molecular da proteína.

Outra observação importante é que não ocorreu a desnaturação da enzima durante o processo de extração estudado.

Os resultados obtidos mostraram que foi possível a utilização da extração contínua em colunas de extração, visando a extração e purificação de proteínas, usando-se sistemas de duas fases aquosas. Além disso, o equipamento desenvolvido neste trabalho mostrou-se bastante eficiente e foi comprovado que a agitação através das campânulas pulsantes não provocou a desnaturação de enzimas. Além disso, o equipamento teve uma operação estável e apresentou um excelente desempenho.

5.4. Aplicação da Metodologia do Planejamento Experimental para a Análise dos Efeitos das Variáveis Estudadas

Usou-se a metodologia do planejamento experimental (Barros Neto et al, 1996) para a análise da influência das variáveis estudadas na extração em contínuo na micro-coluna.

Para o cálculo dos efeitos das variáveis e da interação entre elas, foi necessário usar apenas dois níveis para cada variável. O nível representa os valores assumidos pela variável. O nível superior foi considerado o maior valor assumido pela variável e o nível inferior foi considerado o menor valor assumido pela variável.

Optou-se por considerar o nível inferior (-) como sendo 0,14 pulsos/segundo para a frequência de pulsação e 4,7 mL/min para a vazão total das fases e como nível superior (+), 1 pulso/segundo para a frequência de pulsação e 10,9 mL/min para a vazão total das fases.

Para o cálculo dos efeitos das variáveis nas grandezas analisadas, construiu-se a matriz do planejamento como é mostrado por Barros Neto et al (1996). A matriz de planejamento (4 X 4) foi composta pelos níveis relativos a cada variável e à interação entre as variáveis (a interação é a multiplicação entre os sinais dos níveis de cada variável). Uma outra matriz (1 X 4) foi composta pelos valores da grandeza analisada, que foram obtidos experimentalmente. Esses valores eram relativos aos níveis das variáveis, que se encontravam nas linhas correspondentes da matriz 4 X 4.

Em todos os casos, foi realizado um planejamento fatorial 2 X 2 (duas variáveis e dois níveis).

As análises, realizadas a partir dos valores dos efeitos de cada variável, estão de acordo com o comportamento observado nos gráficos anteriormente apresentados. Através desta análise, comprovou-se que o planejamento fatorial é uma excelente ferramenta para a análise e planejamento experimentais.

Como realizou-se apenas dois experimentos com a vazão total das fases elevada, não foi possível a realização da análise das superfícies de resposta. Com esta análise, seria possível obter um modelo para a predição das grandezas estudadas em função das variáveis operacionais. Porém, este modelo seria válido somente na faixa de valores estudados, a extrapolação não é aconselhada.

5.4.1. Fração de Retenção da Fase Dispersa

O desvio padrão (s) nas medidas foi calculado através da equação 5.6, que é mostrada a seguir.

$$s = \left\{ \frac{1}{(N-1)} [\sum (x_i - x_{im})^2] \right\}^{1/2} \quad (5.6)$$

Onde: N é o número de experimentos (repetições) realizados, x_i é a grandeza medida e \bar{x}_{im} é a média entre os resultados obtidos (média entre as repetições realizadas).

O desvio padrão das medidas da fração de retenção da fase dispersa é 7,25.

Sabe-se que o desvio padrão dos efeitos (S_{efeito}) para este caso, é dado pela equação apresentada a seguir:

$$S_{efeito} = (S^2/2)^{1/2} \quad (5.7)$$

Assim, o desvio padrão dos efeitos é: $S_{efeito} = 5,13$

A matriz do planejamento é mostrada a seguir. Chamou-se: P, a variável referente à frequência de pulsação, V, a variável referente à vazão total das fases e PV, a interação entre as duas variáveis.

Ensaio	Frequência de Pulsação (pulsos/segundo)	Vazão Total das Fases (mL/min)	Fração de Retenção da Fase Dispersa (%)
1	0,14	4,7	9,17
2	1	4,7	17,36
3	0,14	10,9	15,08
4	1	10,9	42,52

Substituindo-se os sinais referentes aos níveis, tem-se:

Ensaio	P	V	PV	Fração de Retenção da Fase Dispersa (%)
1	-	-	+	9,17
2	+	-	-	17,36
3	-	+	-	15,08
4	+	+	+	42,52

Assim, calculou-se os efeitos referentes a cada variável através da multiplicação de cada coluna com os sinais relativos aos níveis de cada variável e a coluna com os valores das grandezas medidas. O efeito é o valor assim obtido dividido por 2. Os cálculos realizados são mostrados a seguir.

$$P = 1/2 \{-9,17 + 17,36 - 15,08 + 42,52\} = 17,815 \pm 5,13$$

$$V = 1/2 \{-9,17 - 17,36 + 15,08 + 42,52\} = 15,535 \pm 5,13$$

$$PV = 1/2 \{9,17 - 17,36 - 15,08 + 42,52\} = 9,625 \pm 5,13$$

Através dos valores dos efeitos calculados, observou-se que todos os efeitos foram importantes para a fração de retenção da fase dispersa. Embora o efeito de interação entre as variáveis tenha sido menor que os demais efeitos, ele também foi significativo.

Deve ser ressaltado que é muito importante comparar os efeitos calculados com o desvio padrão dos efeitos. Neste caso, o desvio padrão era menor do que todos os efeitos calculados, portanto todos os efeitos foram significativos, embora em maior ou menor intensidade.

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que o aumento da vazão total das fases e da frequência de pulsação provocaram um aumento da fração de retenção da fase dispersa, já que todos os efeitos atuaram de maneira positiva na fração de retenção da fase dispersa. A interação entre as variáveis também foi significativa e atuou positivamente na fração de retenção da fase dispersa. Isto ocorreu porque os efeitos calculados tiveram sinal positivo.

Conforme pode ser visto na figura 5.22, as tendências observadas nos experimentos estão em concordância com os resultados e conclusões obtidos através da aplicação da metodologia de planejamento experimental. Na figura 5.22, observa-se que tanto a frequência de pulsação quanto a vazão total das fases exerceram uma importante influência na fração de retenção da fase dispersa. A tendência observada é de um aumento da fração de retenção da fase dispersa com o aumento dessas variáveis.

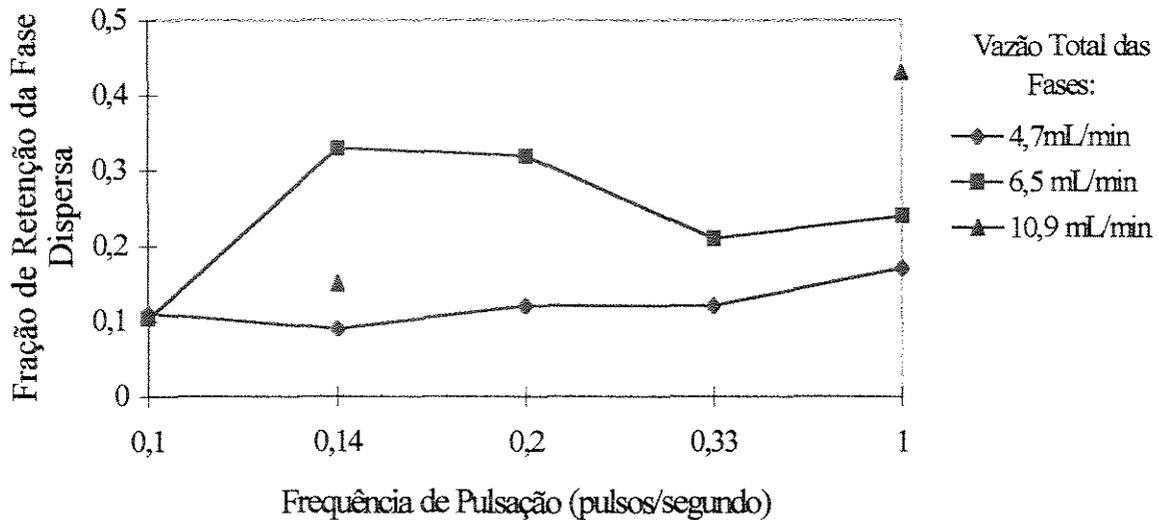


Figura 5.22 - Comportamento da fração de retenção da fase dispersa para sistemas de duas fases aquosas PEG 1000-Fosfatos de potássio, em pH 7,3, em relação às variáveis: frequência de pulsação e vazão total das fases.

Porém, na análise realizada através da metodologia de planejamento experimental, avaliou-se apenas dois níveis da vazão total das fases (4,7 mL/min e 10,9 mL/min). Assim, a tendência de diminuição da fração de retenção da fase dispersa com o aumento da frequência de pulsação, observada com a vazão total das fases de 6,5 mL/min, não pode ser prevista usando-se apenas esses dois níveis estudados. Portanto, neste caso, a realização de mais experimentos foi importante, mostrando a possibilidade da ocorrência de um comportamento diferente do esperado, devido ao arraste da fase dispersa pela fase contínua.

5.4.2. Índice de Recuperação do Solutu

De maneira semelhante ao item anterior, calculou-se os efeitos das variáveis estudadas no Índice de Recuperação do Solutu.

Os seguintes resultados foram obtidos:

$$P = 39,5 \pm 5,52$$

$$V = -0,5 \pm 5,52$$

$$PV = -6,5 \pm 5,52$$

Analisando-se os resultados obtidos, observou-se que o efeito da vazão total das fases não influenciou o comportamento do Índice de Recuperação do Sóluto, ou seja, o efeito relativo à vazão total das fases não foi significativo. O efeito relativo à frequência de pulsação foi bastante significativo e o efeito da interação entre as variáveis foi pequeno, se comparado ao desvio padrão dos efeitos, portanto esta variável exerceu uma pequena influência no Índice de Recuperação do Sóluto.

O efeito da frequência de pulsação foi positivo, portanto o aumento da frequência de pulsação provocou um aumento do Índice de Recuperação do Sóluto. O efeito da interação entre as variáveis (PV) foi negativo, portanto, o aumento desta interação provocou uma diminuição do Índice de Recuperação do Sóluto.

De acordo com a figura 5.23, as tendências observadas nos experimentos estão em concordância com os resultados e conclusões obtidos através da aplicação da metodologia de planejamento experimental. Na figura 5.23, observa-se que a frequência de pulsação exerceu uma importante influência no Índice de Recuperação do Sóluto. Contudo, a vazão total das fases exerceu uma pequena influência no Índice de Recuperação do Sóluto, sendo que esta influência não foi significativa.

A tendência observada é de um aumento do Índice de Recuperação do Sóluto com o aumento da frequência de pulsação. O efeito da variação da vazão total das fases não foi significativo, principalmente se comparado ao efeito da frequência de pulsação, que foi bastante significativo.

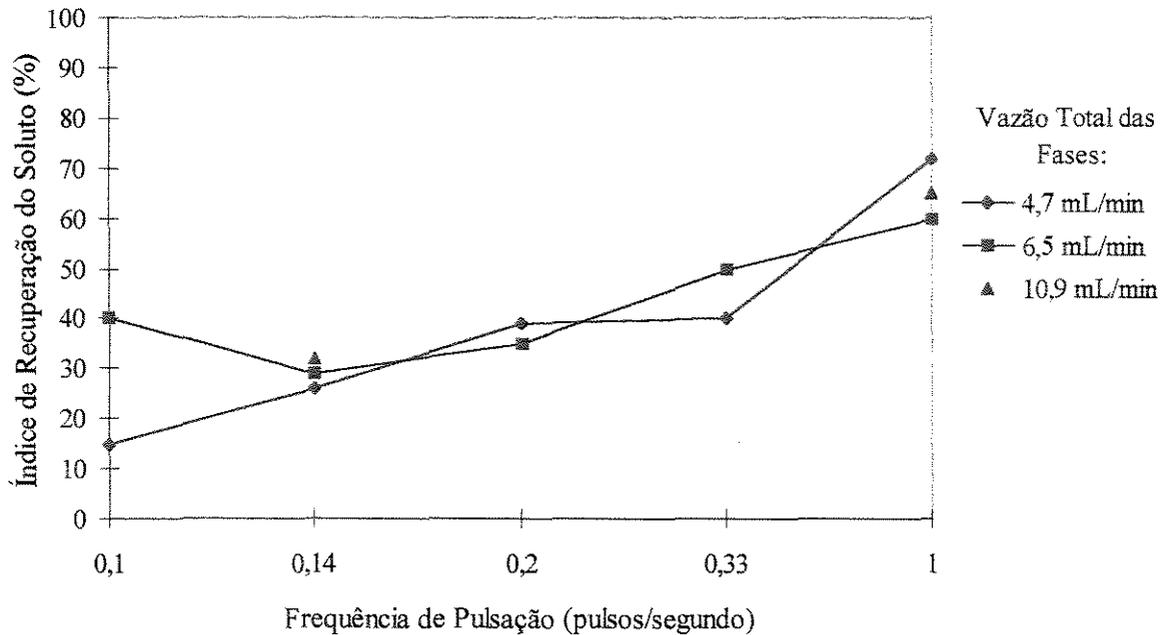


Figura 5.23 - Comportamento do Índice de Recuperação do Soluto na extração contínua de citocromo b5 com sistemas de duas fases aquosas PEG 1000-Fosfatos de potássio, em pH 7,3, em relação às variáveis: frequência de pulsação e vazão total das fases.

5.4.3. Eficiência de Separação

Os seguintes efeitos foram calculados, da maneira apresentada anteriormente:

$$P = 63,2 \pm 7,71$$

$$V = 1,69 \pm 7,71$$

$$PV = -11,57 \pm 7,71$$

Observou-se que o efeito da vazão total das fases não foi significativo, já que seu valor foi menor do que o desvio padrão.

A frequência de pulsação exerceu o efeito mais importante sobre a Eficiência de Separação. O aumento da frequência de pulsação provocou um aumento da Eficiência de Separação. A interação entre as duas variáveis foi significativa, porém bem menos do que a frequência de pulsação. Um aumento da interação entre as variáveis provocou uma diminuição da Eficiência de Separação, já que o efeito tinha sinal negativo.

Conforme pode ser visto na figura 5.24, as tendências observadas nos experimentos estão em concordância com os resultados e conclusões obtidos através da aplicação da metodologia de planejamento experimental.

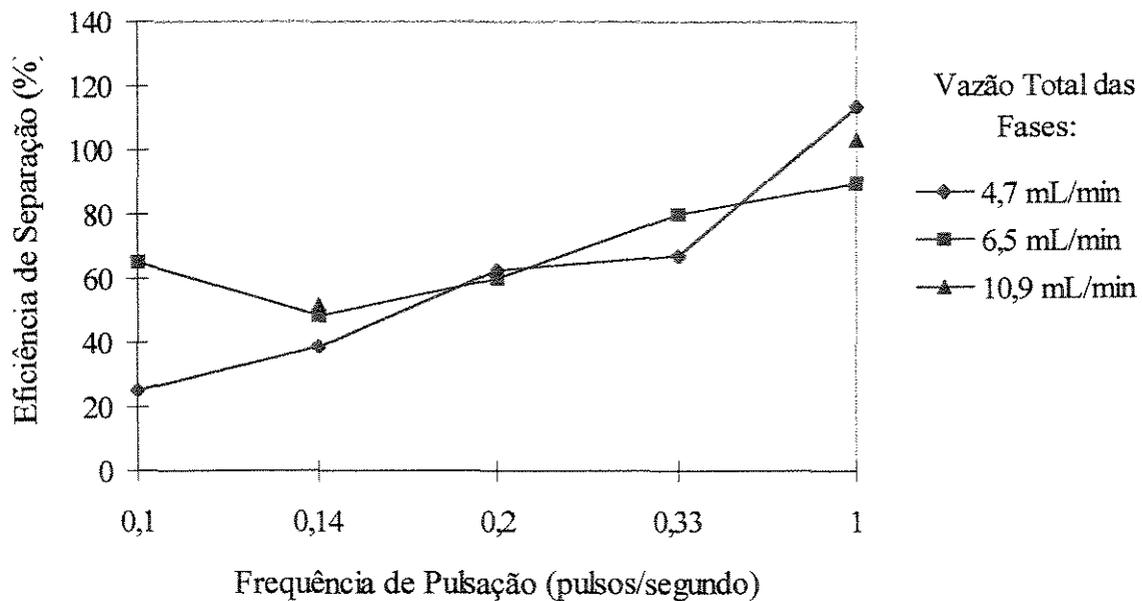


Figura 5.24 - Comportamento da Eficiência de Separação na extração contínua de citocromo b5 com sistemas de duas fases aquosas PEG 1000-Fosfatos de potássio, em pH 7,3, em relação às variáveis: frequência de pulsação e vazão total das fases.

Como ocorreu na análise do Índice de Recuperação do Solute, observa-se na figura 5.24 que a frequência de pulsação exerceu uma importante influência na Eficiência de

Separação. Porém, a vazão total das fases exerceu uma pequena influência na Eficiência de Separação, sendo que esta influência não foi significativa.

A principal tendência observada é de um aumento da Eficiência de Separação com o aumento da frequência de pulsação. Como já foi comentado, o efeito da variação da vazão total das fases não foi significativo, principalmente quando comparado ao efeito da frequência de pulsação, que foi mais importante.

5.4.4. Coeficiente de Transferência de Massa

Os seguintes efeitos foram calculados:

$$P = 0,0568 \pm 0,0096$$

$$V = 0,0446 \pm 0,0096$$

$$PV = 0,0162 \pm 0,0096$$

Com relação ao Coeficiente de Transferência de Massa, observou-se que todos os efeitos foram importantes e exerceram uma influência significativa sobre o Coeficiente de Transferência de Massa.

Um aumento da frequência de pulsação, da vazão total das fases e da interação entre estas duas variáveis, provocaram um aumento no Coeficiente de Transferência de Massa, já que todas as variáveis exerceram um efeito positivo, ou seja, tinham um sinal positivo.

Todos os efeitos foram maiores do que o desvio padrão dos efeitos. Observou-se também que os efeitos das variáveis individuais foram bem maiores do que o efeito de interação entre as variáveis.

De acordo com a figura 5.25, as tendências observadas nos experimentos estão em concordância com os resultados e conclusões obtidos através da aplicação da metodologia de planejamento experimental. Na figura 5.25, observa-se que tanto a frequência de pulsação quanto a vazão total das fases exerceram uma importante influência no Coeficiente de

Transferência de Massa. A tendência observada é de um aumento do Coeficiente de Transferência de Massa com o aumento dessas variáveis.

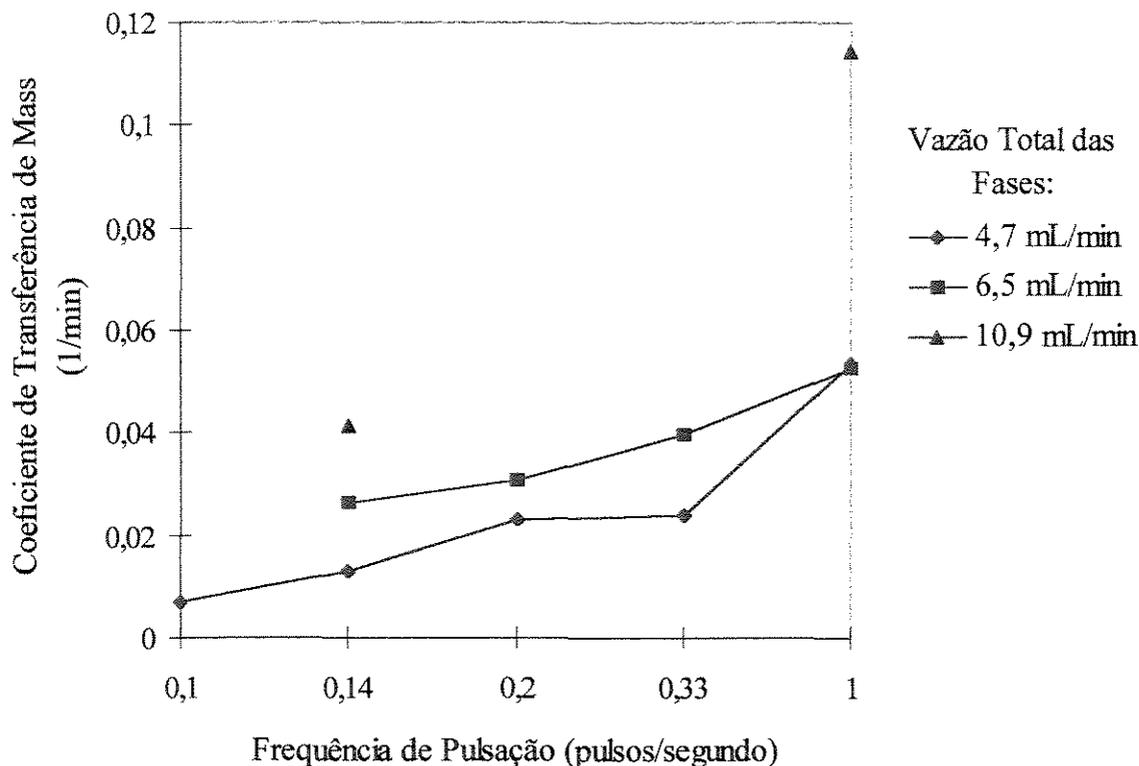


Figura 5.25 - Comportamento do Coeficiente de Transferência de Massa na extração contínua de citocromo b5 com sistemas de duas fases aquosas PEG 1000-Fosfatos de potássio, em pH 7,3, em relação às variáveis: frequência de pulsação e vazão total das fases.

Portanto, os resultados obtidos nestas análises, baseadas no planejamento fatorial, estão em concordância com as análises realizadas nos itens anteriores e com o comportamento observado nos gráficos.

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES

E

SUGESTÕES

6.1. Conclusões

Este trabalho teve como principal objetivo o desenvolvimento e o estudo de uma micro-coluna de extração líquido-líquido para a aplicação em processos de purificação de proteínas. A fim de obter uma agitação eficiente, mas suave para evitar a desnaturação das enzimas e a perda das principais propriedades das proteínas, usou-se as campânulas pulsantes para promover a agitação. O equipamento desenvolvido é chamado: micro-coluna de campânulas pulsantes.

Após realizado o trabalho, pode-se concluir que o equipamento desenvolvido é bastante eficiente e merece ser mais estudado.

Algumas das conclusões obtidas são:

- A micro-coluna de campânulas pulsantes apresentou um excelente desempenho e a operação foi estável, em todas as condições estudadas.

- Foi comprovado que a agitação imposta ao sistema através das campânulas pulsantes não provocou a desnaturação da enzima estudada, a ascorbato oxidase, nas condições operacionais (frequências de pulsação e vazões total das fases) usadas neste trabalho.

- Observou-se a ocorrência de arraste da fase dispersa pela contínua, a frequências de pulsação e vazões total das fases elevadas. Porém, este arraste foi muito pequeno e não influenciou o comportamento do sistema.

- Altos valores de Eficiência de Separação (aproximadamente 100%) foram obtidos nas melhores condições de operação. O Índice de Recuperação do Solute apresentou valores muito satisfatórios, principalmente se considerarmos as possibilidades de recuperação encontradas nos experimentos de extração em descontínuo.

- O comportamento do equipamento mostrou-se independente da massa molecular da proteína que deseja-se extrair. Obteve-se valores da Eficiência de Separação bem próximos, na extração de proteínas de diferentes massas moleculares, usando-se as mesmas condições de operação da micro-coluna.

- Experimentalmente, não foi observada a ocorrência da inundação da micro-coluna, nas condições estudadas.

- Nenhum dos modelos para predição da fração de retenção da fase dispersa em colunas pulsadas, obtidos na literatura, conseguiu predizer os resultados obtidos experimentalmente.

- A melhor condição de operação obtida nos experimentos realizados corresponderam a frequência de pulsação alta e vazão total das fases baixa, com a razão entre as fases leve e pesada igual a 1. Deve-se ressaltar que essa condição foi escolhida como a melhor, entre as condições testadas.

Estes resultados demonstram a possibilidade da utilização de sistemas de duas fases aquosas em processos de extração contínua de proteínas, a partir de seus extratos brutos. A extração líquido-líquido em contínuo é uma promissora técnica alternativa em processos de purificação de biomateriais.

Não foi observado nenhum problema durante a operação da micro-coluna de campânulas pulsantes com sistemas de duas fases aquosas. Altos valores de eficiência foram obtidos e a separação das fases durante a operação foi rápida. O estado estacionário foi atingido em um tempo relativamente pequeno. Além disso, não foi observada a formação de emulsões estáveis, o que é comum em sistemas biológicos.

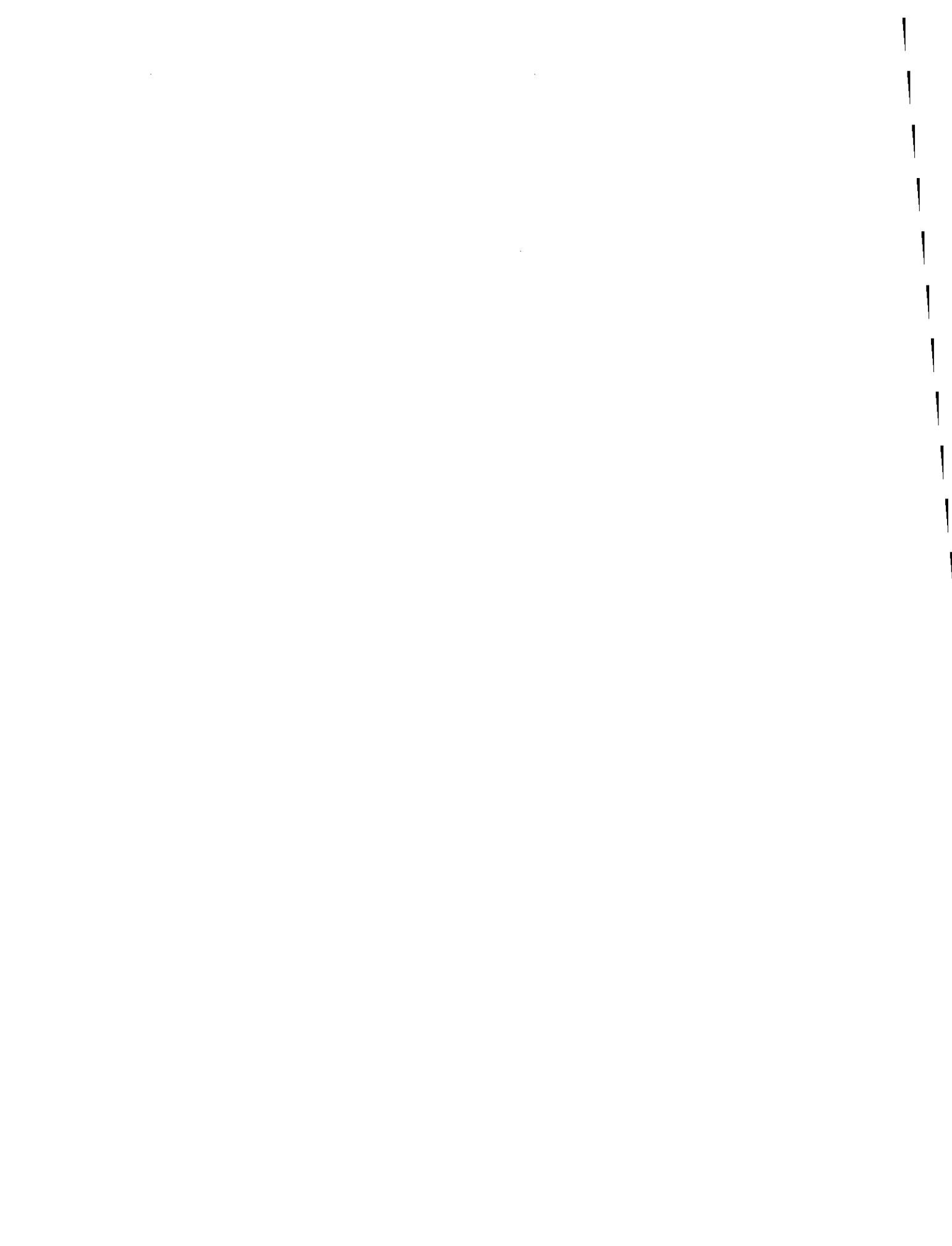
O equipamento desenvolvido neste trabalho (a micro-coluna de campânulas pulsantes) mostrou-se bastante eficiente e adequado ao trabalho com biomateriais. Além de ser um equipamento de fácil montagem e operação.

Este estudo é o primeiro em que se emprega o sistema de duas fases aquosas em colunas pulsadas, visando a purificação de proteínas. Além disso, o equipamento usado, a micro-coluna de campânulas pulsantes, foi desenvolvido neste trabalho.

6.2. Sugestões

Algumas sugestões para trabalhos futuros são:

- Realizar experimentos variando a razão entre as vazões das fases leve e pesada, já que esta variável é importante no comportamento da extração, conforme foi verificado na literatura.
- Determinar experimentalmente as condições de inundação da micro-coluna.
- Desenvolver correlações para a predição do comportamento do sistema. Obter correlações para a Eficiência de Separação, Índice de Recuperação do soluto, Coeficiente de Transferência de Massa e Fração de Retenção da Fase Dispersa.
- Análise econômica do custo do processo e estudo de reciclagem dos reagentes formadores das fases.
- Testar a operação da coluna com sistemas de propriedades físicas (massa específica, tensão interfacial, viscosidade) diferentes das propriedades dos sistemas usados.
- Análise do tamanho das gotas da fase dispersa durante a operação da micro-coluna.



CAPÍTULO 7

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTSSON, P. A., **Partition of Cell Particles and Macromolecules**, Wiley-Interscience, New York, 2^a 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 Systems and the Effect of Molecular Weight of the Polymer, **Biochim. Biophys. Acta**, 926, 87-93, 1987.

ALBERTSSON, P. A.; JOHANSSON, G.; TJERNELD, F., Aqueous Two-Phase Separations. 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. Veuveny and Shafferman. VCH Publisher, 1990.

ATHA, D. H.; INGHAM, K. C., Mechanism of Precipitation of Proteins by Polyethylene Glycols. Analysis in Terms of Excluded Volume, **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.; SHEN, Z. J., Holdup and Flooding in Reciprocating Plate Extraction Columns, **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 Systems, **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., Fischer, D., Academic Press, NY, 85-130, 1985.

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

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

BASKIR, J. N.; HATTON, T. A.; SUTER, 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, FL, 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. Eds. 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.; MEDEIROS, P. H., **Phytochemistry**, 22 (10), 2423, 1981.

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.

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 Colouste 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.

DIAMOND, A. D.; HSU, J. T., Aqueous Two-Phase Systems for Biomolecule Separation. In: **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, Managing (ed), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 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 Progress**, 6, 479-484, 1990.

EITEMAN, M. A.; GAINER, J. L., A Model for the Prediction of Partition Coefficients in Aqueous Two-Phase Systems, **Bioseparation**, 2, 31-41, 1991.

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

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

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 Charge**. Tese de Doutorado. Faculty of Agriculture and Food, University of Reading, 1992.

GAYLER, R.; ROBERTS, N. W.; PRATT, H. R. C., Liquid-Liquid Extraction : Part IV. A Further Study of Hold-Up in Packed Columns, **Trans. Inst. Chem. Eng.**, 31, 57-68, 1953.

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

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, 1955. In: Kumar A., Hartland, S. **Chem. Eng. Proc.**, 23, 41-59, 1988.

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. Progress**, 4, 6-11, 1988.

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, 135-142, 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.

HIGBIE, R., The Rate of Absorption of Pure Gas into a Still Liquid During Short Periods of Exposure, **Trans. Am. Instit. Chem. Eng.**, 31, 365, 1935.

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- α -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., Extrative Purification of Intracellular Enzymes, **Enzyme Technol., Rothemburg Ferment. Symp.**, 3^a ed., 135-145, 1983.

HUSTEDT, H.; KRONER, H. H.; KULA, M-R., Applications of Phase Partitioning Biotechnology. In: Walter H., Brooks, D. E. e Fisher, D. (eds), **Partition in aqueous two-phase systems**, Academic Press, Orlando, 529-589, 1985.

HUSTEDT, H.; BRONER, B.; KRONER, K. H.; PAPAMICHAEL, N., Fully Automated Continuous Crosscurrent Extraction of Enzymes in Two-Stage Plant, **Biotechnol. Tech.**, 1, 49-54, 1987.

HUSTEDT, 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. Com.**, 48, 989-1000, 1983.

JAFARABAD, 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.

JAFARABAD, K. R.; SAWANT, S. B.; JOSHI, J. B.; SIDKAR, S. K., Enzyme and Protein Mass Transfer Coefficient in Aqueous Two-Phase System. II- York-Scheibel Extraction Columns, **Chem. Eng. Sci.**, 47, 69-73, 1992 b.

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. Chem. 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.; SANDLER, 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^o 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.

KRONER, K. H.; KULA, M. R., Extraction of Enzymes in Aqueous Two-Phase Systems, **Process Biochemistry**, p. 7, 1978.

KRONER, K. H.; STACH, W.; SCHUTTE, H.; KULA, M. R., Scale Up of Formate dehydrogenase Isolation by Partition, **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, 32, 130-137, 1982.

KRONER, K. H.; HUSTEDT, H.; KULA, M.R., Extractive Enzyme Recovery : Economic Considerations, **Proc. Biochem.**, 19, 170-179, 1984.

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. Humphrey (eds), 2, 451-471, Pergamon Press, New York, 1985.

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

KUMAR, A.; HARTLAND, S., **Trans. Inst. Chem. Engrs.**, 60, 35-69, 1982.

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, 41-59, 1988.

KUMAR, A.; HARTLAND, S., Independent Prediction of Slip Velocity and Hold-Up in Liquid-Liquid Extraction Columns, **Can. J. Chem. Eng.**, 67, 17-25, 1989.

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.

KUNG, E. T.; BECKMAN, R. B., Dispersed Phase Hold-Up in a Rotating Disc Extraction Column, **AIChE J.**, 7, 319-324, 1961.

LADDHA, G. S.; 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.

LEHNINGER, A. L., **Princípios de Bioquímica**. Savier ed., 1986.

LO, T. C.; BAIRD, M. H. I., In: **Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology**, v. 9, 3ª ed., New York, John Wiley, 1980.

LO, T. C.; 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., An 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.

MISEK, T., 1953. In: Heyberger, A., **Col. Cze. Chem. Com.**, 48, 989-1000, 1983.

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), 395-402, 1965.

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.

OGSTON, A. G.; PHELPS, C. F., **Biochem. J.**, 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.

PATIL, T. A.; JAFARABAD, K. R.; 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.

PAWAR, P. A.; VEERA PARASU, U.; SAWANT, S. B.; JOSHI, J. B., Enzyme Mass Transfer Coefficient in Aqueous Two-Phase Systems: Modified Spray Extraction Columns, **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, 75 (4), 751-758, 1997.

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

POLSON, A.; POTGIETE, G. M.; LARGIER, J. F.; MEARS, G. E. F.; JOUBERT, F. J., The Fractionation of Protein Mixtures by Linear Polymers of High Molecular Weight, **Biochim. Biophys. Acta**, 82, 463-475, 1964.

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

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

RAGHAV RAO, K. S. M. S.; SZLAG, D. S.; SIKDAR, S. K.; JOSHI, J. B.; SAWANT, S. B., Protein Extraction in a Column Using a Polyethylene Glycol-Maltodextrin Two-Phase Polymer System, **Chem. Eng. J.**, 46, B75-B81, 1991.

RAMA RAO, N. V., Dispersed Phase Holdup and Drop Size Distributions in Reciprocating Plate Columns, **Can. J. Chem. Eng.**, 61, 168-177, 1983.

REMAN, G. H., A New Efficient Apparatus: the Rotating Disc Contactor, **Proceedings Third World Petroleum Congress**, 121-131, 1951.

RICHARDSON, J. F.; ZAKI, W. N., 1954. In: Heyberger, A. **Col. Cze. Chem. Com.**, 48, 989-1000, 1983.

RITO-PALOMARES, M.; HUDDLESTON, J. G.; LYDDIATT, A., PEG-Phosphate Aqueous Two-Phase Partition - Polymer Recycling in Practical Implementation, **Food and Bioproducts processing: Transactions of the Institution of Chemical Engineers, Part C**, 72 (1), 11-13, 1994.

ROD, V., Calculating Mass Transfer with Longitudinal Mixing, **British Chemical Engineering**, 2 (6), 483-487, 1966.

SARMENTO, M. J.; PIRES, M. J.; CABRAL, J. M. S.; AIRES-BARROS, M. R., Liquid-Liquid Extraction of a Recombinant Protein, Cytochrome b5, with Aqueous Two-Phase Systems of Polyethylene Glycol and Potassium Phosphate Salts, **Journal of Chromatography A**, 668, 117-120, 1994.

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.

SCHMIDT, A. S.; ANDREWS, B. A.; ASENJO, J. A., **Biotechnol. Bioeng.**, 36, 617-626, 1996.

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.

SEGE, G.; WOODFIELD, F. W., Pulsed Column Variables, **Chem. Eng. Prog.**, 50 (8), 396-402, 1954.

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

SOUZA, R. R., **Estudo e Desenvolvimento de um Extrator de Palhetas Rotativas**. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas, Campinas - São Paulo, 1997.

STHOTHKAMP, R. E.; DAWSON, C. R., **Biochemistry**, 16, p. 1926, 1977.

SZLAG, D. C.; GIULIANO, K. A., A Low Cost Aqueous Two-Phase System for Enzyme Extraction, **Biotech. Techniques**, 4, 277-282, 1988.

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., **Liquid Extraction**. 2ª ed., McGraw-Hill. New York, 1963.

TREYBAL, R. E., **Mass Transfer Operations**. 2ª ed., McGraw-Hill. New York, 1968.

TURNER, R., **Separation and Purification of Thaumatin from *E. coli* Homogenate in an Aqueous Two-Phase System: Extraction, Recovery and Phase Recycle**, Bsc. Biochemical Engineering Laboratory - Food Science and Technology, University of Reading. In: Franco, T. T., **Use of Modified Proteins in Aqueous Two-Phase Systems. Effect of Surface Hydrophobicity and Charge**, Tese de Doutorado. Faculty of Agriculture and Food, University of Reading, 1992.

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.

VAN DIJCK, W. J. O., U.S. Patent 2,001, 1986 (1935).

VEIDE, A.; SMEDS, A. L.; ENFORS, S. O., A Process for Large-Scale Isolation of β -galactosidase from *Escherichia coli* in an Aqueous Two-Phase System, **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 System, **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.

VON BODMAN, S. B.; SCHULLER, M. A.; JOLLIE, D. R.; SLINGAR, S. G., **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 83, 9443-9447, 1986.

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.

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

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.

APÊNDICES

APÊNDICE 1

CALIBRAÇÕES

CALIBRAÇÕES

1. Calibração da bomba peristáltica:

A bomba peristáltica foi calibrada toda vez que os tubos de viton que conduziam as fases se desgastavam ou eram trocados.

A última calibração realizada é mostrada a seguir. Durante os experimentos, realizou-se as calibrações por aproximadamente 5 vezes e os valores das vazões encontrados, diferiram muito pouco entre uma calibração e outra. A vazão era selecionada através da posição de um marcador da bomba peristáltica.

Posição da Bomba	Vazão da Fase Leve (rica em PEG) entrada (mL/min)	Vazão da Fase Pesada (rica em sal) saída (mL/min)
40	$2,8 \pm 0,045$	$2,4 \pm 0,022$
50	$3,8 \pm 0,00$	$3,2 \pm 0,041$
70	$5,7 \pm 0,022$	$4,8 \pm 0,020$

2. Calibração do espectrofotômetro:

A calibração do espectrofotômetro foi realizada para a quantificação das concentrações de proteína total nas fases rica em PEG e rica em sal pelo método de Lowry modificado (Pires et al, 1993). A calibração foi feita com a proteína BSA (bovine serum albumin), usada como proteína padrão. Foi observado que a interferência dos componentes das fases foi pequena, para os sistemas bifásicos aquosos estudados. Assim, a calibração pode ser feita com água, como meio onde a proteína era diluída. A variação entre as medidas realizadas com a água como diluente e com as fases rica em PEG e em sal foram de aproximadamente 15%. A seguir, apresenta-se os valores medidos na calibração e a equação obtida a partir destes dados.

A equação da calibração é:

$$Y = 7,798 \cdot X - 0,1302$$

Onde: o coeficiente de correlação (R^2) é 0,9981

X é a absorbância obtida a 750 nm

Y é a concentração de proteína em g/L

Amostra/Concentração (g/L)	Absorbância a 750 nm
1 - 1,9 g/L	0,258 ± 0,0156
2 - 0,95 g/L	0,144 ± 0,0156
3 - 0,76 g/L	0,110 ± 0,0025
4 - 0,47 g/L	0,082 ± 0,0134
5 - 0,32 g/L	0,053 ± 0,0071
6 - 0,21 g/L	0,043 ± 0,0042
7 - 0,1 g/L	0,036 ± 0,0078
8 - 0,05 g/L	0,018 ± 0,0046

Na figura AP1, encontra-se a curva de calibração.

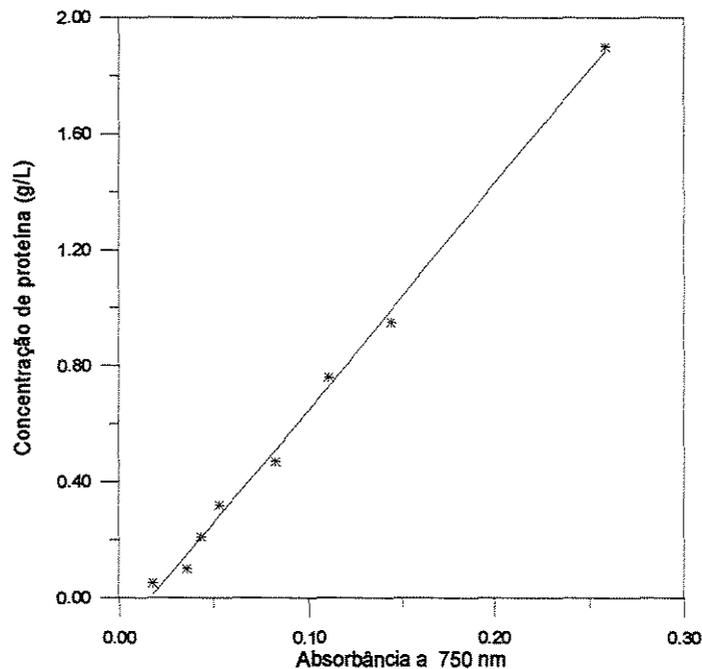


Figura AP1 - Curva de calibração do espectrofotômetro para a medida da concentração de proteína através do método de Lowry modificado (Pires et al, 1993).

APÊNDICE 2

RESULTADOS EXPERIMENTAIS OBTIDOS

NO ESTADO ESTACIONÁRIO

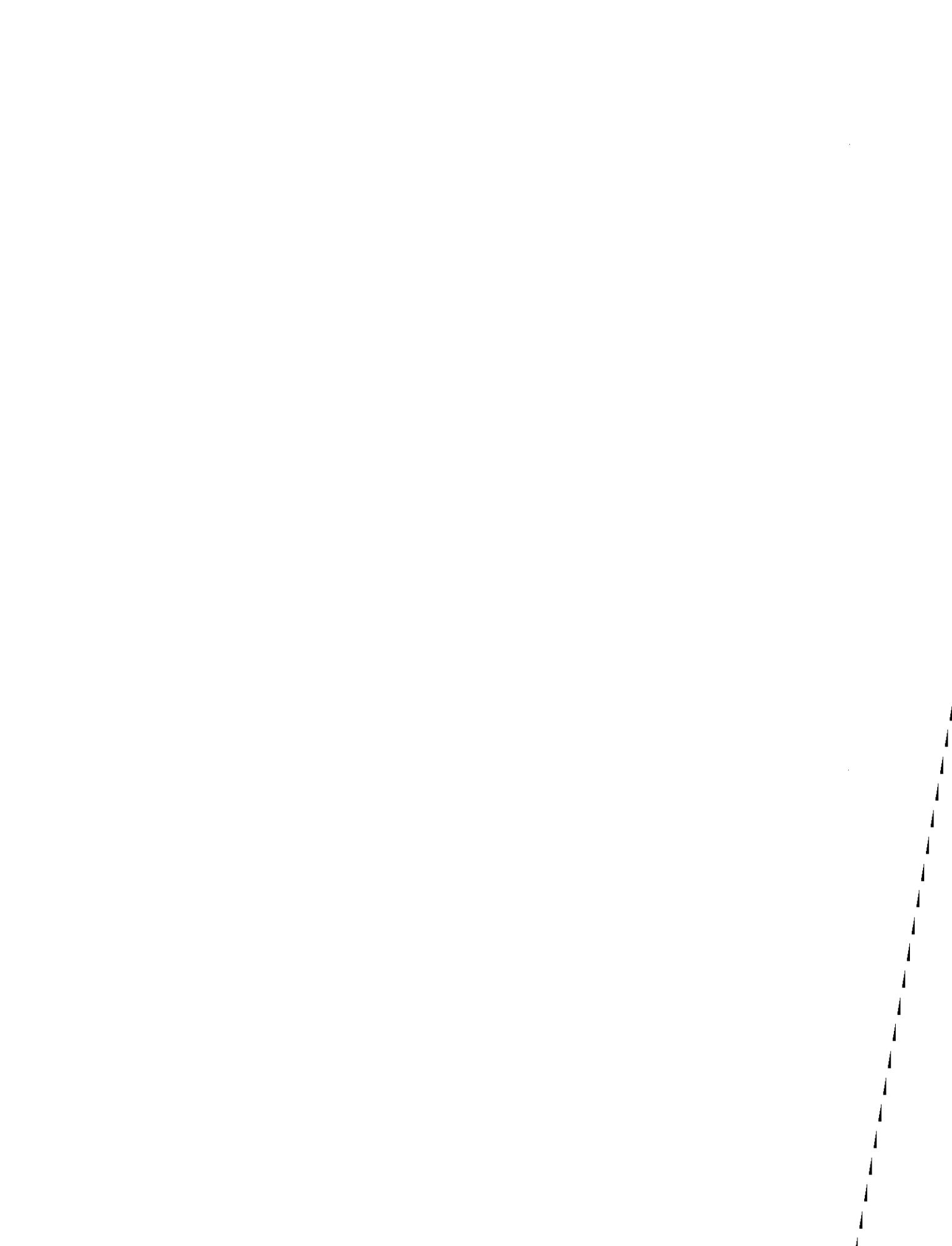
RESULTADOS EXPERIMENTAIS OBTIDOS NO ESTADO ESTACIONÁRIO

Neste apêndice, são apresentados os resultados calculados a partir dos dados experimentais obtidos no estado estacionário.

O sistema empregado foi composto por 17,7 % PEG 1000 (p/p) e 15,7% Fosfatos de Potássio (p/p), em pH 7,3, na extração de citocromo b5, a partir de seu extrato bruto.

Tabela AP2.1- Resultados experimentais no estado estacionário, obtidos na extração de citocromo b5 com sistemas formados com PEG 1000/Fosfatos de potássio.

Frequência de Pulsação (pulsos/s)	Vazão total das fases (mL/min)	Porcentagem de Extração (I _r) - (%)	Eficiência de Separação (E*) - (%)	Coefficiente de Transferência de Massa (k _{da})-(min ⁻¹)	Fração de Retenção da Fase Dispersa
0,10	4,5	15	24,92	0,0068	0,1132
0,143	4,7	26	38,67	0,0130	0,0917
0,20	4,7	39	62,37	0,0231	0,1218
0,33	4,7	40	66,82	0,0239	0,1174
1	4,7	72	113,42	0,0536	0,1730
0,10	6,5	40	65,00	0,1188	0,1034
0,143	6,5	29	48,15	0,0265	0,3266
0,20	6,5	35	60,18	0,031	0,3186
0,33	6,5	50	79,75	0,0396	0,2103
1	6,5	60	89,76	0,0528	0,242
0,143	10,9	32	51,93	0,0414	0,1508
1	10,9	65	103,54	0,1144	0,4252



ANEXOS

ANEXO 1

BALANÇO DE MASSA

BALANÇO DE MASSA

Para um processo de extração líquido-líquido em contracorrente, o balanço de massa para o soluto é:

$$X_f F + Y_2 S = X_2 R + Y_1 E \quad (A1.1)$$

Onde : X_f é a concentração de soluto na alimentação. Nos experimentos realizados neste trabalho, a alimentação é a fase rica em PEG, na qual o extrato bruto das proteínas está diluído. X_2 é a concentração de soluto na fase rica em PEG no topo da coluna, ou seja, na saída da fase rica em PEG. Y_1 é a concentração de soluto na fase rica em sal no fundo da coluna, ou seja, na saída da fase rica em sal. Y_2 é a concentração de soluto na fase rica em sal no topo da coluna, ou seja, na entrada da fase rica em sal. F é a vazão volumétrica da alimentação (entrada da fase rica em PEG), S é a vazão volumétrica da fase rica em sal que entra na coluna, R é a vazão volumétrica da fase rica em PEG que sai da coluna, fase refinado e E é a vazão volumétrica da fase extrato, ou seja, fase rica em sal que sai da coluna.

Todos os balanços de massa dos experimentos realizados foram calculados desta maneira.

ANEXO 2

PROPRIEDADES FÍSICAS DE SISTEMAS DE DUAS

FASES AQUOSAS PEG/SAL

**PROPRIEDADES FÍSICAS DE SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS
PEG/FOSFATOS DE POTÁSSIO**

A tabela A2.1 apresenta as propriedades físicas dos sistemas de duas fases aquosas utilizados neste trabalho. Os dados foram obtidos de Porto (1998).

Tabela A2.1 - Propriedades Físicas de Sistemas de Duas Fases Aquosas PEG/Fosfatos de Potássio (adaptado de Porto, 1998).

Tipo de Polímero		VISCOSIDADE (mPa.s)		MASSA ESPECÍFICA (kg/m ³)	
		PEG	Sal	PEG	Sal
PEG 550	Linha de Amarração 1	5,9	2,4	1097,9	1224,2
	Linha de Amarração 2	8,0	2,3	1098,6	1237,2
	Linha de Amarração 3	12,5	2,5	1098,9	1270,0
PEG 1000	Linha de Amarração 1	7,0	1,2	1093,0	1229,4
	Linha de Amarração 2	10,0	2,2	1093,5	1282,1
	Linha de Amarração 3	15,0	2,3	1094,8	1292,3
PEG 3350	Linha de Amarração 1	18,0	1,0	1090,3	1198,6
	Linha de Amarração 2	31,0	1,1	1090,7	1217,2
	Linha de Amarração 3	48,0	2,2	1094,3	1267,8
PEG 8000	Linha de Amarração 0	33,3	1,0	1078,6	1122,1
	Linha de Amarração 1	46,0	0,9	1082,6	1159,4

Vários trabalhos foram consultados para confirmar os valores das propriedades físicas dos sistemas de duas fases aquosas usados no presente trabalho. Com relação à tensão

interfacial, usou-se uma aproximação, já que não foram encontrados na literatura dados referentes às composições exatas das fases usadas. Assim, empregou-se a tensão interfacial de sistemas com composição próxima à dos sistemas usados nos experimentos.

- Não foram encontradas na literatura as propriedades físicas de sistemas de duas fases aquosas formados com PEG 400. Os sistemas de composição mais semelhantes a estes, que foram encontrados na literatura, eram formados por PEG 550.

ANEXO 3

**DADOS REFERENTES À PREDIÇÃO
DA FRAÇÃO DE RETENÇÃO DA FASE DISPERSA**

CONDIÇÕES OPERACIONAIS E PROPRIEDADES FÍSICAS DOS SISTEMAS USADOS PARA A OBTENÇÃO DAS CORRELAÇÕES PARA A PREDIÇÃO DA FRAÇÃO DE RETENÇÃO DA FASE DISPERSA

Este anexo contém as condições operacionais e as propriedades físicas dos sistemas bifásicos usados por Kumar e Hartland (1988; 1995) para a obtenção das correlações para a predição da fração de retenção da fase dispersa.

No trabalho de Kumar e Hartland (1988), as condições dos sistemas usados no desenvolvimento da correlação foram as seguintes:

Propriedades Físicas:

Massa específica da fase contínua, ρ_c	996-1060 kg/m ³
Massa específica da fase dispersa, ρ_d	652-1595 kg/m ³
Diferença de densidade entre as fases, $\Delta\rho$	115-595 kg/m ³
Viscosidade da fase contínua, μ_c	0,84-1,07 mPa.s
Viscosidade da fase dispersa, μ_d	0,29-4,88 mPa.s
Tensão Interfacial, γ	4,6-46,6 mN/m

Variáveis Operacionais:

Velocidade Superficial da fase contínua, v_c	0,00-10,85 mm/s
Velocidade Superficial da fase dispersa, v_d	0,14-9,78 mm/s
Comprimento (Amplitude) da pulsação, A	2,00-51,56 mm/s
Frequência de pulsação, f	0,28-4,75 s ⁻¹
Velocidade de Pulsação, $A.f$	2,07-92,00 mm/s
Fração de Retenção da Fase Dispersa, ϕ	0,0016-0,6330
Diâmetro da coluna, D	25,4-213,0 mm
Espaçamento entre os pratos, h	50,0-120,0 mm
Diâmetro dos orifícios, d_0	1,02-4,06 mm
Área livre fracional do prato, e	0,009-0,23

No trabalho de Kumar e Hartland (1995), as condições dos sistemas usados no desenvolvimento da correlação foram as seguintes:

Propriedades Físicas:

Massa específica da fase contínua, ρ_c	986-1060 kg/m ³
Massa específica da fase dispersa, ρ_d	652-1595 kg/m ³
Diferença de densidade entre as fases, $\Delta\rho$	—
Viscosidade da fase contínua, μ_c	0,84-1,43 mPa.s
Viscosidade da fase dispersa, μ_d	0,29-4,88 mPa.s
Tensão Interfacial, γ	1,8-46,5 mN/m

Variáveis Operacionais:

Velocidade Superficial da fase contínua, v_c	0,00-10,2 mm/s
Velocidade Superficial da fase dispersa, v_d	0,1-9,8 mm/s
Comprimento (Amplitude) da pulsação, A	3,00-51,6 mm/s
Frequência de pulsação, f	0,33-4,75 Hz
Velocidade de Pulsação, $A.f$	4,6-102,7 mm/s
Fração de Retenção da Fase Dispersa, ϕ	0,002-0,675
Diâmetro da coluna, D	25-215 mm
Espaçamento entre os pratos, h	50,0-120,0 mm
Diâmetro dos orifícios, d_0	1,0-6,0 mm
Área livre fracional do prato, e	0,01-0,49
Razão entre as vazões das fases, v_d/v_c	0,03-∞
Velocidade relativa, V_s	5,4-110,4 mm/s

Os valores das propriedades físicas e das condições operacionais usadas neste trabalho são apresentadas a seguir. As propriedades físicas são do sistema 17,7% PEG 1000 (p/p)/15,7% Fosfatos de Potássio (p/p), em pH 7,3, usado nos experimentos para a análise da fração de retenção da fase dispersa.

Propriedades Físicas:

Massa específica da fase contínua, ρ_c	1282,1 kg/m ³
Massa específica da fase dispersa, ρ_d	1093,5 kg/m ³
Diferença de densidade entre as fases, $\Delta\rho$	188,6 kg/m ³
Viscosidade da fase contínua, μ_c	2,2 mPa.s
Viscosidade da fase dispersa, μ_d	10,0 mPa.s
Tensão Interfacial, γ	0,5 mN/m *

Variáveis Operacionais:

Velocidade Superficial da fase contínua, v_c	0,41-0,97 cm/min
Velocidade Superficial da fase dispersa, v_d	0,41-1,18 cm/min
Comprimento (Amplitude) da pulsação, A	5,6 cm/s
Frequência de pulsação, f	0,1-1 s ⁻¹
Velocidade de Pulsação, $A.f$	0,56-5,6cm/s
Fração de Retenção da Fase Dispersa, ϕ	0,09-0,425
Diâmetro da coluna, D	2,54 cm
Espaçamento entre os pratos, h	3,8 cm
Diâmetro dos orifícios, d_0	—
Área livre fracional do prato, e	0,38

* O valor da tensão interfacial foi obtido a partir de dados da literatura (Snyder et al, 1992, Wu et al, 1996 e Mishima et al, 1998). Considerou-se a tensão interfacial do sistema estudado como sendo igual à tensão interfacial do sistema com a composição mais próxima a este. Portanto, é um valor aproximado. Na faixa em que a tensão interfacial de sistemas bifásicos aquosos variava, esta variação exerceu uma pequena influência na predição da fração de retenção da fase dispersa, como foi verificado através de cálculos realizados.