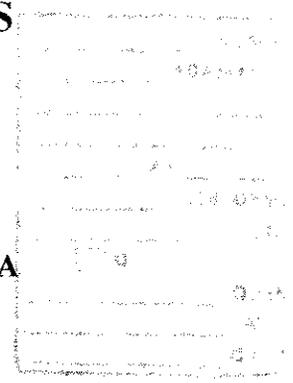


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO
SISTEMAS DE PROCESSOS QUÍMICOS E INFORMÁTICA



**Estudo do processo de extração de bromelina em
sistema descontínuo água, polietileno glicol e
polissacarídeo da goma do cajueiro**

Autora: Michelle Chen Sartorello

Orientador: Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi

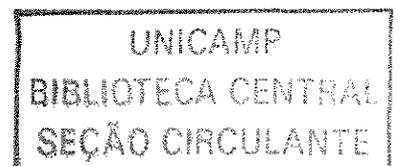
Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Bertevello

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

Campinas – São Paulo

março - 2004

100409042



UNIDADE	PL
Nº CHAMADA	7/Unicamp
	Sa 77e
V	EX
TOMBO BCI	58777
PROC.	16-117-09
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	2,000
DATA	01-07-09
Nº CPD	

CM00198297-2

Bib.id: 317481

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

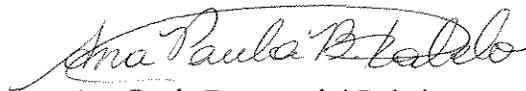
Sa77e Sartorello, Michelle Chen
Estudo do processo de extração de bromelina em sistema descontínuo água, polietileno glicol e polissacarídeo da goma do cajueiro / Michelle Chen Sartorello. --Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientadores: Elias Basile Tambourgi e Luiz Carlos Bertevello.

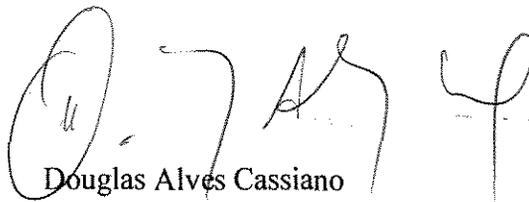
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Bromelina. 2. Abacaxi. 3. Proteínas. 4. Equilíbrio líquido-líquido. I. Tambourgi, Elias Basile. II. Bertevello, Luiz Carlos. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Dissertação de Mestrado , defendida por Michelle Chen Sartorello em março de 2004 e aprovada pela banca constituída pelos seguintes doutores:



Ana Paula Brescancini Rabelo



Douglas Alves Cassiano



Elias Basile Tambourgi

Esta versão corresponde à final da dissertação de Mestrado , defendida por Michelle Chen Sartorello em março de 2004.



Prof Dr Elias Basile Tambourgi – orientador

À WILLI e NAIR, meus avós,
ELISABETE, minha mãe,
e KELLY e SHELLLEN, minhas irmãs.

Agradecimentos

À Deus, por ter me dado mais uma oportunidade em minha vida e por ter permitido concluir mais uma etapa da minha carreira.

Ao Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi, orientador e amigo, pelo carinho e amizade e por acreditar no meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Bertevello, da Faculdade de Engenharia Industrial, co-orientador e amigo, a quem tanto devo pelo incentivo, compreensão e conhecimentos transmitidos.

Aos professores, funcionários e colegas da FEQ-UNICAMP.

Aos professores, funcionários e amigos da FEI que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

À minha mãe, Elisabete Chen, minhas irmãs, Kelly Chen e Shellen Chen, e meus avós, Willi Franz Bissegger e Nair Bassi Bissegger, pelo incentivo, força e contribuição em mais uma etapa de minha vida.

Ao meu namorado, Rafael Comporto Montero, pelo apoio, carinho e atenção.

A CAPES pelo apoio financeiro no decorrer deste trabalho.

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

RESUMO

Os sistemas bifásicos aquosos têm sido muito utilizados nas pesquisas bioquímicas para separação e purificação de células, macromoléculas e partículas celulares. A partição em sistemas de duas fases aquosas é uma alternativa que vem sendo muito utilizada nos últimos anos. Neles ambas as fases são compatíveis com quase todas as proteínas conhecidas.

Neste trabalho, estudou-se a aplicação da extração líquido-líquido na separação da bromelina presente no caldo do abacaxi, utilizando sistemas de duas fases aquosas compostos por polietileno glicol (PEG) e polissacarídeo da goma do cajueiro (POLICAJU).

O POLICALU é obtido do exsudado de *Anarcadium occidentale L.* Consiste em um polissacarídeo ácido largamente encontrado no Nordeste brasileiro, onde é empregado como substituto da goma arábica para uso farmacêutico. A goma bruta foi coletada como exsudado natural de árvores cultivadas no estado de Pernambuco. Nódulos livres de cascas foram selecionados para processo de isolamento da goma do cajueiro via precipitação por etanol.

O comportamento da partição da bromelina em sistema de duas fases aquosas foi verificado estudando-se a influência da massa molar do PEG, pH e a concentração das fases (linha de amarração) no sistema, a fim de se obter o melhor sistema para a separação em descontínuo.

Nestes ensaios foi medido o coeficiente de partição entre a fase aquosa superior (PEG) e a fase aquosa inferior (POLICAJU), utilizando o caldo do abacaxi e a Bromelina P.A.. Observou-se que a proteína se particionou predominantemente na fase inferior, rica em POLICAJU, nas condições experimentais testadas. Foram encontrados valores de coeficiente de partição da ordem de 0.119 e 0.200, o que demonstra uma boa separação.

ABSTRACT

The aqueous two-phase systems have found widespread use in biochemical research for separation and purification of macromolecules, cells and cell particles. The partition in aqueous two-phase systems is an alternative for the separation processes that has been studied extensively late years. In these works both phases are compatible with almost all known proteins.

In this work, separation of bromelain present in pineapple's juice was studied using liquid-liquid extraction in aqueous two phase based on polyethylene glycol (PEG) and cashew-nut tree gum (POLICAJU).

The exsudate gum from *Anarcadium occidentale L.* is a branched acidic heteropolysaccharide natural from Brazilian agreste, where it is employed as a substitute for Arabic gum for pharmaceutical use. Crude gum was collected as natural exsudate from cultivated trees in Pernambuco state. Clear nodules free of bark were selected to be isolated via ethanol precipitation.

The partition behavior of bromelain in aqueous two-phase systems was investigated studying the influence of molar mass of PEG, pH and phases concentration (tie line) in the system in order to obtain the best system to the separation.

In these trials, the partition coefficient was measured between the higher phase (PEG) and the lower phase (POLICAJU). It was observed that the protein partitioned almost in the bottom gum-rich phase for the experimental conditions tested. They were found values of partition coefficient of the order of 0.119 and 0.200, what demonstrates a good separation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA BIBLIOGRAFIA	3
2.1. PROTEÍNAS	3
2.1.1. Enzimas	3
2.1.2. Bromelina	4
2.1.3. Desnaturação	6
2.1.4. Processamento da Fruta	7
2.1.5. Produtos e Subprodutos do Processamento	7
2.1.6. Consumo de <i>Bromelina</i>	9
2.2. PROCESSOS DE RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	10
2.3. PRECIPITAÇÃO	11
2.4. EXTRAÇÃO EM DUAS FASES AQUOSAS	13
2.4.1. Sistemas de Duas Fases Aquosas	13
2.4.2. Tipos de Sistemas de Duas Fases Aquosas	15
2.4.3. Polietileno Glicol	16
2.4.4. Diagrama de Fases	18
2.4.5. Fatores que Influenciam o Diagrama de Fases	20
2.5. TEMPO DE SEPARAÇÃO DAS FASES	21
2.6. TEORIA DE FORMAÇÃO DAS FASES	21
2.7. FUNDAMENTOS DA PARTIÇÃO DAS PROTEÍNAS	24
2.7.1. Coeficiente de Partição	25
2.7.2. Influência da Massa molar do Polímero e da Proteína no Coeficiente de Partição	26
2.7.3. Influência da Temperatura no Coeficiente de Partição	27
2.7.4. Influência da Composição do Sistema no Coeficiente de Partição	28
2.7.5. Influência do pH do Sistema no Coeficiente de Partição	28
2.7.6. Influência das Interações entre Proteína e o Sistema de Fases no Coeficiente de Partição	28
2.8. MODELAGEM MATEMÁTICA DO COEFICIENTE DE PARTIÇÃO	29
2.9. AMPLIAÇÃO DE ESCALA	30
2.10. SISTEMAS BIFÁSICOS AQUOSOS MAIS ESTUDADOS	32

2.11. UTILIZAÇÃO DA GOMA COMO POLÍMERO PARA SISTEMAS BIFÁSICOS ALTERNATIVOS	33
2.11.1. Goma do Cajueiro	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1. PREPARO DAS AMOSTRAS E SOLUÇÕES	37
3.1.1. Preparo da Amostra de Caldo	37
3.1.2. Purificação da Goma do Cajueiro	37
3.1.3. Preparo das Soluções	39
3.2. EXTRAÇÃO EM DESCONTÍNUO	39
3.3. MÉTODO ANALÍTICO	40
3.3.1. Determinação de Proteína Total	40
3.4. METODOLOGIA DE CÁLCULO	41
3.4.1. Coeficiente de Partição	41
3.5. PLANEJAMENTO FATORIAL	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	44
4.1. PARTIÇÃO DAS PROTEÍNAS	44
4.1.1. Variação 1.1.- Linha de Amarração 11/23 % _{m/m} e 13/21 % _{m/m}	45
4.1.2. Variação 1.2.- Linha de Amarração 11/21 % _{m/m} e 13/23 % _{m/m}	47
4.1.3. Variação 2.1.- Linha de Amarração 11/23 % _{m/m} e 13/21 % _{m/m}	50
4.1.4. Variação 2.2.- Linha de Amarração 11/21 % _{m/m} e 13/23 % _{m/m}	53
5. COMPARAÇÃO DOS SISTEMAS PEG/SAL E PEG/POLICAJU USANDO MESMA PROTEÍNA, <i>BROMELINA</i>	56
6. CONCLUSÃO	59
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
ANEXOS	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. – Classificação das gomas industriais quanto à fonte de onde são obtidas.	34
Tabela 2.2. – Composição da goma de <i>Anarcadium occidentale</i> de diferentes regiões.	36
Tabela 3.1. – Matriz de Planejamento Fatorial 2 ³ .	42
Tabela 3.2. – Variáveis estudadas nos ensaios.	42
Tabela 4.1. – Discriminação dos efeitos e níveis calculados para Variação 1.1.	45
Tabela 4.2. – Valores dos efeitos calculados para Variação 1.1.	46
Tabela 4.3. – Discriminação dos efeitos e níveis calculados para Variação 1.2.	47
Tabela 4.4. – Valores dos efeitos calculados para Variação 1.2.	48
Tabela 4.5. – Comportamento de K para a Variação 1.2 em pH 8,0.	49
Tabela 4.6. – Discriminação dos efeitos e níveis calculados para Variação 2.1.	50
Tabela 4.7. – Valores dos efeitos calculados para Variação 2.1.	51
Tabela 4.8. – Discriminação dos efeitos e níveis calculados para Variação 2.2.	53
Tabela 4.9. – Valores dos efeitos calculados para Variação 2.2.	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. – Exemplo de um diagrama de fases.	18
Figura 3.1. – Preparo da amostra.	37
Figura 3.2. – Purificação da goma do cajueiro.	38
Figura 3.3. – Extração em descontínuo	40
Figura 4.1. – Efeito do pH no coeficiente de partição.	47
Figura 4.2. – Comportamento do coeficiente de partição para a Variação 1.1.	52
Figura 4.3. – Comportamento do coeficiente de partição para a Variação 2.2.	55
<hr/>	
Figura 5.1. – Comportamento do coeficiente de partição no sistema PEG/Sal.	56
Figura 5.2. – Comportamento do coeficiente de partição no sistema PEG/POLICAJU.	57

NOTAÇÃO E NOMENCLATURA

BSA	Albumina Bovina (Bovine Serum Albumin)
C_F	Concentração da Fase Inferior ou Fundo
C_T	Concentração da Fase Superior ou Topo
Da	daltons
d_i	Densidade da Fase Inferior
d_s	Densidade da Fase Superior
K	Coefficiente de Partição
K_{bioesp}	Fator de Afinidade Bioespecífica
$K_{\text{conf.}}$	Fator de Conformação
$K_{\text{eletro.}}$	Fator Eletroquímico
$K_{\text{hifob.}}$	Fator de Afinidade Hidrofóbica
$K_{\text{tam.}}$	Fator Tamanho
K^0	Outros fatores que podem causar influência no K
M	Massa Molar
m/m	massa/massa
PEG	Polietileno Glicol
POLICAJU	Polissacarídeo da Goma do Cajueiro
pI	Ponto Isoelétrico
s	Desvio Padrão
S_{efeito}	Desvio Padrão dos Efeitos
V_i	Volume da Fase Inferior
V_f	Volume da Fase Superior
X_i	Grandeza medida
X_m	Média dos resultados obtidos

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, com o crescente desenvolvimento da biotecnologia, tornou-se necessário o conhecimento de novas técnicas de separação e purificação de biomoléculas, tais como enzimas e proteínas de origem animal, vegetal e microbiana. Estas técnicas devem manter as propriedades químicas e físicas das biomoléculas e, além disso, devem ser altamente eficazes na purificação.

Técnicas clássicas como a precipitação, extração com solventes e filtração geralmente têm alto poder de concentração e baixa purificação e técnicas mais modernas como a cromatografia de afinidade, troca iônica ou gel-filtração, eletroforese, extração em duas fases aquosas, extração com micelas reversas, recuperam e purificam, muitas vezes até a homogeneidade. Com os significativos avanços tecnológicos, especialmente devido a manipulações genéticas de microorganismos, tornou-se possível a produção de proteínas e outros bioprodutos de interesse industrial, por meio de processos fermentativos. Contudo, a viabilidade de produção e comercialização desses produtos em escala industrial dependem do custo da produção. Assim, o desenvolvimento de métodos de recuperação e purificação de bioprodutos (“downstream processing”) é importante, já que esta é uma etapa limitante nestes processos de produção (BERTEVELLO, 2001)

Cerca de 50% a 90% do custo de produção de um bioproduto se concentra na purificação. Então, existe uma necessidade de uma técnica de bioseparação em larga escala, que seja eficiente e econômica e que alcance altos níveis de recuperação e pureza, preservando a atividade biológica da molécula (DIAMOND et al., 1992).

A extração líquido-líquido há muitos anos vem sendo aplicada como uma importante técnica laboratorial de separação. A partir de então, vem crescendo consideravelmente nas indústrias e está abrangendo diversos setores, desde a extração de metais até a purificação de antibióticos (BERTEVELLO, 2001). É muito usada principalmente em separação de enzimas, por se tratar de um processo de baixo custo, alta seletividade e com possibilidade de reciclagem dos

reagentes. Além disso, as enzimas permanecem estáveis no sistema, devido a alta concentração de água e a utilização de reagentes não desnaturantes.

Os sistemas de duas fases aquosas (SDFA) são sistemas de extração constituídos por duas fases aquosas imiscíveis ou parcialmente miscíveis. As fases são constituídas pela adição de dois polímeros hidrofílicos, como por exemplo, o polietileno glicol (PEG) e a dextrana, ou por um polímero e um sal, como por exemplo, o polietileno glicol e o fosfato de potássio, em soluções aquosas, e concentrações acima de suas concentrações críticas. Os polímeros podem ser naturais, como no caso da dextrana que é de cadeia de açúcar natural, ou sintéticos, como no caso do polietileno glicol que é um éter polimérico (COIMBRA, 1995).

Os sistemas de duas fases aquosas têm sido um assunto de grande interesse nos últimos anos e muitos estudos para desenvolvimento de aplicação destes sistemas na separação, em escala laboratorial, de vários bioprodutos, como as proteínas e organelas celulares, entre outros (PORTO, 1998). Os sistemas mais estudados e utilizados para purificação são os sistemas PEG/Sal/Água e PEG/Dextrana/Água. Estes sistemas constituem um meio conveniente e adequado para extração de substâncias de origem biológica, pois as fases apresentam cerca de 70% a 90% de água, proporcionando um ambiente ameno para o trabalho com compostos biologicamente ativos, preservando sua estabilidade molecular e permitindo, assim, o seu processamento neste meio (COIMBRA, 1995).

Assim, este trabalho tem por objetivo estudar o sistema de duas fases aquosas PEG/Polissacarídeo da goma do cajueiro (POLICAJU) na partição da Bromelina, presente no caldo do abacaxi, realizando estudos em batelada (tubos de ensaios) e levando-se em conta a influência dos fatores: pH, massa molar do polietileno glicol e concentração das fases do sistema. A influência desses fatores foi verificada com o planejamento fatorial. A goma do cajueiro é um polissacarídeo que se encontra em grande quantidade na região nordeste do Brasil, é de fácil processamento e não produz efluentes que causam impacto ambiental, por ser um produto biodegradável. Além disso, é um polímero de baixo custo, o que pode baixar significativamente o custo total do processo de purificação.

2. REVISÃO DA BIBLIOGRAFIA

2.1. PROTEÍNAS

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

As proteínas são compostos orgânicos de alto peso molar e mais abundante nas células, representando cerca de 50 a 80% da massa seca da célula. São encontradas em todas as partes de todas as células, uma vez que são fundamentais sob todos os aspectos da estrutura e função celular. Existem muitas espécies diferentes de proteínas, cada uma especializada em determinada função biológica diferente.

2.1.1. Enzimas

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

A catálise enzimática das reações é essencial para os sistemas vivos. Sob condições biológicas relevantes, as reações não catalisadas tendem a ser lentas.

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

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

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

2.1.2. Bromelina

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

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

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

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

A bromelina tem diversos usos, todos baseados em sua atividade proteolítica, como nas indústrias alimentícias e farmacêuticas. Pode-se mencionar sua utilização no amaciamento de carnes, na clarificação de cervejas, na fabricação de queijos, no preparo de alimentos infantis e dietéticos, no pré-tratamento de soja, no tratamento do couro, na indústria têxtil, no tratamento da lã e da seda, no tratamento de distúrbios digestivos, feridas e inflamações, preparo de colágeno hidrolisado, etc. Foi verificado por ROWAN et. al. (1990) que a bromelina do fruto tem uma atividade proteolítica maior que a bromelina do talo em diversos substratos protéicos e sua atividade é máxima em pH 8,0 e a temperatura de 70°C. A bromelina do talo apresentou atividade máxima a 60°C e pH 7,0. A forma de bromelina comercialmente encontrada é a bromelina do talo,

apesar da grande quantidade de resíduos de abacaxi fruto proveniente das indústrias de conservas de abacaxi.

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

2.1.3. Desnaturação

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

Há outra importante conseqüência da desnaturação de uma proteína, ela, quase sempre, perde sua atividade biológica característica. Assim, quando uma solução aquosa de uma enzima, por exemplo, é aquecida até seu ponto de ebulição por uns minutos e depois resfriada, a enzima torna-se insolúvel e, principalmente, não mais apresenta atividade catalítica.

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

2.1.4. Processamento da Fruta

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

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

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

2.1.5. Produtos e Subprodutos do Processamento

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

específico do suco da casca e resíduos fibrosos, este último utilizado na fabricação de ração animal.

O processamento tem início com a lavagem das frutas, que chegam do campo em grandes recipientes ou carretas, já desprovidas da coroa que pode ser utilizada para o replantio da fruta. A seguir, as frutas são conduzidas por meio de transportadoras para uma seção superior onde a lavagem é completada (BERTEVELLO, 2001).

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

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

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

O processo tem por finalidade dar um fluxo contínuo às fases posteriores, reduzindo assim a capacidade ociosa da ginaca. Esta máquina cujo nome foi dado em homenagem a seu inventor o engenheiro havaiano de sobrenome Ginaca, é completamente automatizada e de grande capacidade (80-120 frutas por minuto), executando uma série de operações sucessivas, e que são as seguintes: - corte das extremidades, descascamento da fruta e encaminhamento do cilindro à etapa seguinte do processamento. O equipamento também é dotado de um dispositivo raspador, que erradica a polpa da casca e das extremidades do fruto. A maior parte deste material erradicado (polpa erradicada) se destina à produção de "crush" (espécie de salada de frutas) e uma pequena parte à produção de suco.

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

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

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

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

2.1.6. Consumo de Bromelina

Para a utilização de bromelina, a indústria alimentícia não se apresenta como um mercado atrativo, pois, vem sendo largamente utilizada a papaína no amaciamento de carnes e a grande barreira seria romper o cartel de indústrias produtoras da enzima, pois o consumidor só compra a carne amaciada ou o amaciante de carnes sem preocupar-se com o princípio ativo do produto. Também, atualmente a África do Sul vem produzindo e exportando papaína a preços sem concorrência, a princípio (BERTEVELLO, 2001).

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

A concentração principal está na indústria farmacêutica brasileira. Esta é uma das indústrias que mais investe em tecnologias e novos produtos, tendo uma

previsão de investimentos no período de 1997 – 2000 de US\$ 1.300 milhões (ABIFARMA). Reflexos do plano econômico que melhorou substancialmente o poder aquisitivo dos brasileiros que estão investindo em saúde e medicamentos, o que vem refletindo no aumento da expectativa de vida, pois, segundo o IBGE, o número de idosos atualmente é o dobro do registrado em 1980. A bromelina também é largamente utilizada em procedimentos técnicos de análises clínico laboratoriais.

Até bem pouco tempo atrás um novo remédio que era lançado no mercado brasileiro não tinha a sua fórmula protegida então, logo que era lançado, sem proteção legal, um concorrente logo aparecia. A proteção legal é muito importante na indústria de fármacos, pois se chega a gastar 15 anos com pesquisas, o que gera um investimento de capital em torno de US\$ 700 milhões. Esta proteção dura 20 anos até a patente ser de conhecimento público (BERTEVELLO, 2001).

2.2. PROCESSOS DE RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

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

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

As técnicas mais utilizadas para a separação das células presentes no caldo fermentado são: filtração rotativa a vácuo e centrifugação. Para o

rompimento das células as técnicas mais comuns são: diálise por choque térmico, por solvente, ultrassonificação, homogeneizador e triturador mecânico. A remoção das células pode ser feita por extração em duas fases, já que estas tendem a ficar na interface. A purificação pode ser feita por: destilação, precipitação, extração em duas fases, cromatografia e cristalização. O tratamento do produto final pode ser feito por filtração estéril, remoção de pirogênio e secagem (ASENJO, 1990).

A escolha do método depende das propriedades da proteína e do grau de pureza desejado. Com relação à cromatografia, por exemplo, existem vários princípios de separação que são selecionados de acordo com as propriedades físico-químicas de cada substância de interesse. Assim, para uma amostra que contém uma mistura de proteínas de diversas massas molares, pode-se aplicar a gel filtração que utiliza o princípio de separação por tamanhos. Quando o fator é a hidrofobicidade, a melhor opção é a cromatografia por interação hidrofóbica (ASENJO, 1990).

2.3. PRECIPITAÇÃO

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

A solubilidade das proteínas depende da distribuição de grupos ionizáveis, hidrofóbicos e hidrofílicos na superfície da molécula. Tais características são responsáveis por interações polares com o solvente aquoso, interações iônicas com os sais presentes no meio, além da repulsão eletrostática entre moléculas de

mesma carga. A presença de sais, solventes orgânicos e pH são fatores importantes na solubilidade das proteínas (SCOPES, 1994).

A adição de solventes orgânicos miscíveis tais como etanol, metanol ou acetona a um meio aquoso contendo proteínas causa uma variedade de efeitos, os quais combinados provocam a precipitação da proteína. O solvente destrói a camada de hidratação em torno dos grupos hidrofóbicos e passa a circundar tais regiões devido à maior solubilidade destas em meio ao solvente. As regiões carregadas com a carga positiva ou negativa da superfície da proteína passam a interagir, devido à retenção de água pelo solvente orgânico, atraindo-se umas às outras e formando agregados. As interações do solvente com as zonas hidrófobas internas causam desconformação irreversível da proteína. Isto pode ser minimizado pela redução da temperatura até valores da ordem de zero graus Celsius ou abaixo, pois a baixas temperaturas a flexibilidade da molécula é menor, reduzindo a capacidade de penetração do solvente e a desnaturação das proteínas. Os álcoois de cadeia mais longa apresentam maior efeito desnaturante do que os de cadeia mais curta (SCOPES, 1994).

Uma carga global próxima a zero na superfície da proteína, o que acontece no ponto isoelétrico das proteínas, minimiza a repulsão eletrostática podendo causar precipitação por interações entre as zonas hidrofóbicas. Esse processo chama-se precipitação isoelétrica, sendo realizado apenas com a correção do pH. De modo geral, a precipitação por qualquer método é facilitada no ponto isoelétrico da proteína. A adição de sais neutros, principalmente sal ou solvente que provoca a precipitação, varia com a concentração da proteína e a presença de contaminantes. Este fato pode ser aproveitado se existir a intenção de realizar-se um fracionamento (CESAR, 1999).

2.4. EXTRAÇÃO EM DUAS FASES AQUOSAS

2.4.1. Sistema de Duas Fases Aquosas

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

- O meio não deve ser tóxico ao sistema biológico nem ao homem;
- A recuperação do bioproduto a partir do meio extrator deve ser fácil;
- Deve ter baixo custo e estar disponível comercialmente em grande quantidade;
- Ser possível de esterilizar;
- Ser imiscível ou parcialmente miscível com soluções aquosas;
- Não deve apresentar tendências de formação de emulsões estáveis com materiais biológicos;
- Não ser inflamável.

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

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

O uso de solventes orgânicos é, normalmente, limitado pelas características hidrofílicas dos produtos de fermentação, levando à necessidade de utilização de elevadas razões entre as fases orgânica e aquosa, devido aos baixos coeficientes de partição dos produtos em relação ao solvente orgânico.

Além disso, os solventes orgânicos são geralmente tóxicos para as proteínas e, também, provocam desnaturação das mesmas.

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

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

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

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

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

2.4.2. Tipos de Sistemas de Duas Fases Aquosas

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

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

a) dois polímeros não iônicos

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

b) um polieletrólito e um polímero não iônico

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

c) dois polieletrólitos

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

d) um polímero não iônico e um composto de baixa massa molar

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

Há ainda novos sistemas formados por PEG/FeSO₄ e PEG/Na₂SO₄ que apresentam algumas vantagens em relação aos sistemas com sais de fosfato e citrato, como, por exemplo, o baixo nível de PEG na fase salina, que reduz as perdas do PEG e facilita a purificação das biomoléculas e a reciclagem do PEG. Nesse tipo de sistema foi observado que a concentração de sal na fase PEG e a concentração na fase salina tendem a diminuir com o aumento da temperatura (PATHAK et al, 1991).

Apesar da grande variedade de sistemas de duas fases aquosas, a quantidade de sistemas realmente aplicáveis para extração líquido-líquido fica reduzida basicamente aos formados por PEG/sal (fosfato/citrato/sulfato) e PEG/dextrana, quando se levam em consideração fatores importantes do ponto de vista industrial, como custo e possibilidade de reciclagem dos reagentes, tempo de separação das fases, possibilidade de esterilização, atoxicidade e faixa de aplicação.

2.4.3. Polietileno Glicol

O polietileno glicol, HO-(CH₂CH₂)_n-CH₂CH₂OH, é um poliéster sintético neutro, linear ou de cadeia ramificada, disponível numa grande variedade de massas molares, 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.

O PEG é também conhecido pelos nomes comerciais de poliglicol E®, carbowax E®, dependendo da empresa que o fabrica. Para massas molares acima de 20000 daltons são denominados óxidos de polietileno, PEO. São fornecidos na forma de soluções incolores estáveis ou pastas se possuírem massas molares menores que 1000 Da. Os de massa molares elevadas, acima de 1000 Da, são encontrados na forma de pó ou de flocos brancos. Podem ser estocados a temperatura ambiente, embora a 4^o C a ocorrência de oxidação em soluções seja retardada. A oxidação do PEG, detectada pela diminuição do pH devida à liberação de grupos ácidos, altera a coloração da solução para marrom (COIMBRA, 1995).

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

2.4.4. Diagrama de Fases

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

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

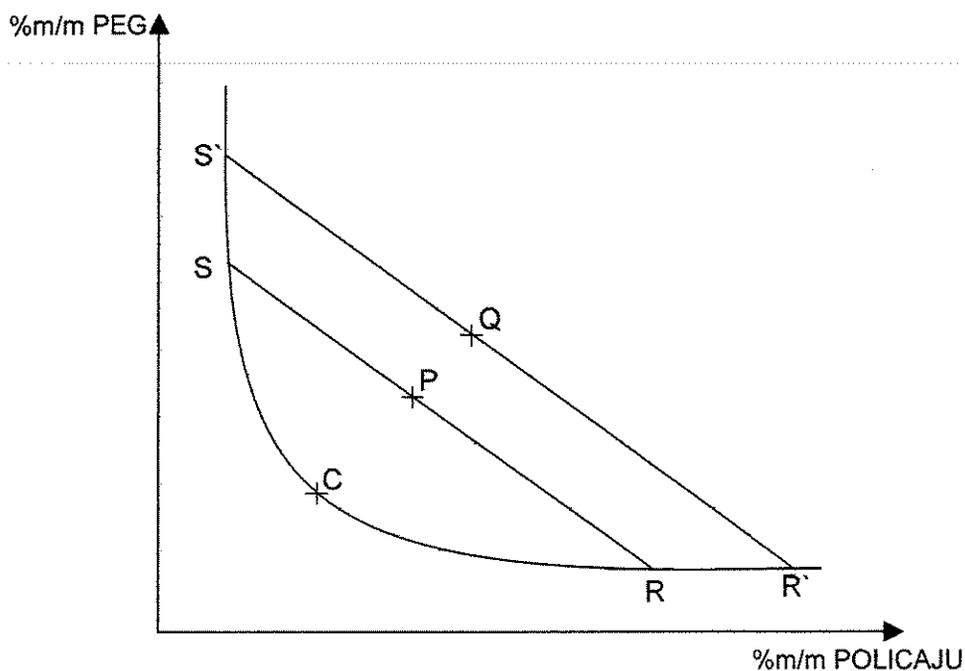


Figura 2.1: Exemplo de um diagrama de fases

A figura 2.1 representa um exemplo genérico de diagrama de fases. A composição inicial do sistema é dada pelo ponto P e a composição final de cada fase após atingir o equilíbrio é dada pelos pontos S (fase de topo ou superior) e R (fase de fundo ou inferior). O segmento SPR é chamado de linha de amarração ou “tie line” e todos os sistemas cuja composição inicial está contida nesse segmento, possui as mesmas composições de fases após o equilíbrio, mas com diferentes razões de volumes entre as fases superior e inferior. Já o ponto Q determina uma

nova linha de amarração, onde a concentração entre as fases aumentou proporcionalmente em relação à linha de amarração determinada pelo ponto P.

Como poderemos observar, o fato de mudarmos de linha de amarração determinada pelo ponto P para a linha de amarração determinada pelo ponto Q, variando proporcionalmente a concentração dos componentes, entre as fases, não obteremos uma melhoria significativa na recuperação e purificação da proteína em estudo (CESAR, 2000).

O ponto C é chamado de ponto crítico. Nele as composições e os volumes entre as fases superior e inferior são iguais. Não se recomenda trabalhar com sistemas muito próximos do ponto crítico devido à instabilidade nesse ponto, pois uma pequena diluição no sistema de duas fases poderá levá-lo à região monofásica (ASENJO et al., 1994a).

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

$$\frac{V_s}{V_i} = \frac{d_i}{d_s} \times \frac{\overline{PS}}{\overline{PR}} \quad 2.1$$

onde: V_s é o volume da fase superior

V_i é o volume da fase inferior

d_s é a densidade da fase superior

d_i é a densidade da fase inferior.

No entanto, as densidades das duas fases são muito próximas à densidade da água, portanto, pode-se afirmar que \overline{PS} é proporcional ao volume da fase superior e \overline{PR} ao da fase inferior.

2.4.5. Fatores que influenciam no diagrama de fases

O diagrama de fases pode ser influenciado por vários fatores. Entre muitos, os principais fatores são a massa molar do polímero, concentração dos componentes do sistema e temperatura.

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

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

A temperatura causa influência no diagrama de fases, pois altera a composição das fases no equilíbrio, deslocando a curva binodal, e modificando também o comprimento da linha de amarração. Em geral, o comprimento da linha de amarração diminui com o aumento de temperatura. O seu efeito varia de acordo com o tipo de sistema. No caso de sistemas PEG/fosfato de potássio, a formação das fases é facilitada em temperaturas mais altas e próximas ao meio ambiente, ou seja, uma menor concentração de polímero ou de sal será necessária para separação das fases. Já no caso de sistemas PEG/Dextrana a situação é oposta, a formação das fases é facilitada em temperaturas baixas (menores que a temperatura ambiente). Quando o sistema está próximo ao ponto crítico, ele é mais instável devido ao deslocamento da curva binodal, podendo atingir mais facilmente a região monofásica.

2.5. TEMPO DE SEPARAÇÃO DAS FASES

O tempo de separação das fases após a mistura dos componentes depende do tipo de sistema. Sistemas contendo PEG/sal possuem um tempo de separação das fases muito menor que os sistemas PEG/Dextrana devido à densidade e viscosidade do sistema. Em sistemas Dextrana/Ficoll, o tempo varia de 1 a 6 horas pela ação da gravidade, enquanto em sistemas PEG/Dextrana esse valor cai para 5 a 30 minutos dependendo da concentração e da massa molar dos polímeros. Nos sistemas PEG/fosfato, o tempo de separação entre as fases é inferior a 5 minutos (COIMBRA, 1995).

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

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

2.6. TEORIA DE FORMAÇÃO DAS FASES

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

A grande maioria dos modelos está contida em dois grupos básicos: um grupo baseado na teoria da solução de polímeros e outro grupo com teorias adaptadas dos tratamentos termodinâmicos do equilíbrio de fase líquida. Dentro

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

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

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

A teoria de Debye-Huckel é a mais adequada para os sistemas que contém soluções com cargas, como é o caso dos sistemas polímero-sal ou sistemas polímero-polímero com sais. Essa teoria leva em consideração a distribuição dos

íons na solução para o cálculo de potencial químico e é mais utilizada em soluções com concentração iônica até 0,1 M, de onde se obtém ótimos resultados. À medida que a concentração iônica aumenta, o desvio entre os resultados teóricos e experimentais aumenta. Isso ocorre porque a teoria é precisa apenas para soluções diluídas, onde o comportamento eletrostático domina. Em soluções concentradas, o comportamento eletrostático é reduzido devido à presença de muitos íons que tendem a isolar as cargas eletrostáticas entre si (CABEZAS Jr, 1996).

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

A teoria geométrica estatística aplicada em sistemas polímero-polímero considera as seguintes hipóteses: as moléculas da mesma espécie estão distribuídas randomicamente na fase homogênea; a estrutura da solução está geometricamente saturada em termos de tamanho e forma de todas as moléculas do sistema; a existência de interações moleculares não muda a natureza da distribuição molecular. A formação das duas fases é explicada da seguinte forma: na situação monofásica, as moléculas do soluto estão separadas e as moléculas adicionais de soluto ainda podem ser inseridas no espaço livre que existe. No ponto de separação de fase, as moléculas do soluto estão bem próximas umas das outras e a solução não aceita mais moléculas adicionais de soluto. Quando a concentração total do soluto aumenta, ocorre a formação de duas soluções geometricamente saturadas e estruturalmente diferentes (GUAN et al., 1994).

Outra teoria muito utilizada nos sistemas polímero-polímero, para modelar a curva binodal, é a do volume excluído, baseada em argumentos estatísticos e geométricos: as duas fases estão saturadas com cada polímero, ou seja, todo o volume está ocupado pelas moléculas dos dois polímeros e da água de

hidratação; a concentração de cada polímero em cada fase é determinada pela quantidade de moléculas de cada polímero ajustado no volume da fase.

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

2.7. FUNDAMENTOS DA PARTIÇÃO DAS PROTEÍNAS

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

A tendência de separação de fases apresentada por dois polímeros quando adicionados num solvente comum ocorre porque a baixa concentração molar dos polímeros na solução (tipicamente menos que 0,05 M) leva a um pequeno ganho de entropia durante a mistura. Por outro lado, cadeias poliméricas têm uma área superficial por molécula maior do que compostos de baixa massa

molar, tanto que as energias de interação entre dois polímeros se sobrepõem à energia de Gibbs do sistema. Estes fatores levam à formação de duas fases em sistemas ternários polímero-polímero-água, em baixas concentrações de polímeros (CESAR, 2000).

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

- Tipo dos polímeros que formam as fases: massa molar média, distribuição da massa molar, modificações químicas poliméricas.
- Composição das fases: comprimento da linha de amarração, tipos de íons presentes ou adicionados ao sistema, força iônica.
- Biomolécula: tamanho, carga, propriedades superficiais, concentração.
- pH e temperatura.

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

2.7.1. Coeficiente de Partição

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

$$K = \frac{C_T}{C_F} \quad 2.2$$

Onde:

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

C_F é a concentração da substância de interesse na fase inferior no equilíbrio.

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

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

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

2.7.2. Influência da Massa Molar do Polímero e da Proteína no Coeficiente de Partição

A massa molar do polímero influencia o valor de K . Em um sistema PEG/dextrana se a massa molar do PEG for elevado e a da dextrana for baixa, a partição será favorável à fase contendo dextrana. O mesmo ocorre nos sistemas PEG/sal, se a massa molar do PEG for elevada, a partição da proteína será mais favorável à fase salina. Caso a massa molar do PEG seja baixa, ocorrerá o

oposto, sendo a partição favorável à fase polimérica. Isso ocorre provavelmente devido ao aumento do efeito do volume excluído que ocorre na fase PEG. Esse efeito é menor para substâncias de baixa massa molar.

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

Assim, K depende da massa molar da proteína. Ele diminui com o aumento da massa molar e a magnitude dessa diminuição é maior para PEG com baixa massa molar e tende a ficar estável para PEG com alta massa molar (BAMBERGER ET AL., 1985, ALBERTSSON, 1986, FORCINITI et al., 1991). O tipo de proteína também influi no valor de K, porque as proteínas são macromoléculas polieletrólitas que carregam cargas quando estão em soluções aquosas. As cargas dependem da composição, da seqüência de aminoácidos e também das propriedades da solução aquosa, como o pH e a concentração dos solutos (SCHLUCK et al., 1995).

2.7.3. Influência da Temperatura no Coeficiente de Partição

A temperatura é outra variável que influi no K, pois influencia o diagrama de fases e a estabilidade das proteínas. Particularmente, em sistemas próximos do ponto crítico, uma pequena alteração na temperatura terá uma alteração considerável na composição dos polímeros e também na partição da substância no sistema bifásico aquoso. A temperatura tem menor influência na partição nos valores mais distantes do ponto crítico (CABRAL & AIRES-BARROS, 1993).

2.7.4. Influência da Composição do Sistema no Coeficiente de Partição

A concentração dos componentes do sistema e, portanto, o comprimento da linha de amarração, também afetam o K. Em sistemas próximos ao ponto crítico, as proteínas em geral apresentam uma partição igual entre as duas fases, portanto o valor de K é igual a 1. Com o aumento da concentração dos componentes, que corresponde a um aumento no comprimento da linha de amarração, o valor de K será maior ou menor que 1 dependendo do tipo de proteína. Existem exceções a essa regra, podendo ocorrer valores de K diferentes de 1 para sistemas próximos ao ponto crítico, ou K pode aumentar com o aumento da concentração dos componentes até um máximo e depois diminuir. Para o caso de células ou particulados, o K é maior para os sistemas próximos ao ponto crítico. O efeito do comprimento da linha de amarração em K é maior em proteínas com alta massa molar.

2.7.5. Influência do pH do Sistema no Coeficiente de Partição

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

2.7.6. Influência das Interações entre Proteínas e o Sistema de Fases no Coeficiente de Partição

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

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

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

2.8. MODELAGEM MATEMÁTICA DO COEFICIENTE DE PARTIÇÃO

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

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

- Fator do tamanho, que existe quando a partição depende do tamanho da molécula ou da área superficial das partículas;
- Fator eletroquímico, que surge quando o potencial elétrico existente entre as fases do sistema é usado para separar as moléculas de acordo com a sua carga elétrica;
- Fator de afinidade hidrofóbica, que é a utilização das propriedades hidrofóbicas do sistema de fases para separar as moléculas em função da sua hidrofobicidade;

- Fator de afinidade bioespecífica, que utiliza a afinidade entre os locais da molécula como ligantes do polímero para a separação;
- Fator de conformação, que é considerado quando a conformação da molécula é o fator predominante.

Esses fatores podem ser agrupados na seguinte equação:

$$\ln K = \ln K^0 + \ln K_{\text{hifob}} + \ln K_{\text{eletro}} + \ln K_{\text{bioesp}} + \ln K_{\text{tam}} + \ln K_{\text{conf}} \quad 2.3$$

Onde:

K_{eletro} é o fator eletroquímico;

K_{hifob} é o fator de afinidade hidrofóbica;

K_{bioesp} é o fator de afinidade bioespecífica;

K_{tam} é o fator do tamanho;

K_{conf} é o fator de conformação;

K^0 são os outros fatores que podem causar influência em K.

2.9. AMPLIAÇÃO DE ESCALA

Nas últimas décadas, várias pesquisas têm sido realizadas com sistemas bifásicos aquosos em escala laboratorial para a separação de proteínas, organelas celulares, vírus e outros materiais biológicos. A aplicação de sistemas bifásicos para a partição de proteínas em larga escala também tem sido demonstrada, nos últimos anos, através da utilização de centrífugas e extratores (DIAMOND & HSU, 1992; WALTER & JOHASSON, 1986).

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

- Facilidade no aumento de escala;
- Rápida transferência de massa;

- Equilíbrio alcançado com recurso a baixas energias na forma de mistura mecânica;
- Possibilidade de operação em contínuo;
- Possibilidade de operação à temperatura ambiente devido à rápida separação das fases;
- Mais econômico que outros processos de separação.

As operações envolvendo os sistemas bifásicos aquosos são, de um modo geral, facilmente executadas em qualquer escala técnica. Isto se deve principalmente à rapidez com que ocorre o equilíbrio das fases permitindo um coeficiente de partição constante devido à baixa tensão interfacial destes sistemas, à simplicidade das unidades de operação e à disponibilidade comercial dos equipamentos necessários (CABRAL & AIRES-BARROS, 1993). Em particular, a facilidade em se obter o “scale up” pode ser demonstrada pela independência do coeficiente de partição com relação ao volume dos sistemas. Aumentos de escala com fatores de 25.000 já foram mencionados na literatura. Para facilitar a utilização destes sistemas de escala laboratorial para larga escala, no entanto, faz-se necessário a caracterização do sistema bifásico adequado para a partição de uma determinada proteína e a correlação deste com o coeficiente de partição da biomolécula (DIAMOND & HSU, 1992).

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

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

2.10. SISTEMAS BIFÁSICOS AQUOSOS MAIS ESTUDADOS

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

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

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

Estes sistemas parecem exibir características fundamentais, apresentam propriedades físicas favoráveis, como baixa viscosidade em ambas as fases e uma razoável diferença de densidade entre as duas fases e são formados por polímeros biodegradáveis e disponíveis em grande quantidade, enquadrando-

se dentro da legislação de um grande número de países para o trabalho com produtos alimentícios e farmacêuticos (DIAMOND & HSU, 1992).

O polietileno glicol é o polímero padrão para os sistemas bifásicos aquosos. A utilização do PEG torna-se vantajosa devido ao baixo custo do polímero e às propriedades físicas e químicas favoráveis. Por outro lado, a Dextrana apresenta um inconveniente: o elevado custo. Este polímero, constituído exclusivamente por unidades de glicose, pode ser obtido por um processo fermentativo envolvendo a bactéria *Leuconostoc mesenteroides* (ALSOP, 1983) ou diretamente, por síntese enzimática e por síntese química (HARRIS & ALPANI, 1985). Estas técnicas de obtenção direta da Dextrana não são, no presente, competitivas, pois quase todas as preparações comerciais são obtidas pela via fermentativa, e esta, por sua vez, representa um elevado custo.

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

2.11. UTILIZAÇÃO DE GOMA COMO POLÍMERO PARA SISTEMAS BIFÁSICOS ALTERNATIVOS

As gomas podem ser definidas genericamente como substâncias poliméricas que, em solventes ou agentes de inchamento apropriados e mesmo a baixas concentrações, são capazes de formar dispersões ou soluções altamente viscosas ou até mesmo géis. Com esta definição, o termo goma pode ser aplicado a uma variedade muito grande de substância, incluindo hidrocarbonetos de alta massa molar, borrachas, polissacarídeos e seus derivados, além de alguns polímeros sintéticos (MILLER, 1987).

Industrialmente, o termo goma é mais específico e está associado a polissacarídeos e seus derivados. O solvente ou agente de inchamento é, nesse caso, a água. As gomas industriais podem ser classificadas em naturais e modificadas. As naturais são obtidas de exsudados de árvores, de sementes, de algas ou por fermentação microbológica. As modificadas são derivadas de polissacarídeos insolúveis, como por exemplo, a celulose. A tabela 2.1 apresenta exemplos de gomas industriais classificadas pela fonte e onde são obtidas (MILLER, 1987).

Tabela 2.1: Classificação das gomas industriais quanto a fonte de onde são obtidas.

Gomas Naturais	Gomas Modificadas
Exsudado de Plantas	Carboximetilcelulose
Goma Arábica	Hidoximetilcelulose
Goma Caraia	Hidoxietilcelulose
Goma Tragacanto	Carboximetilamido
Goma do Cajueiro	Acetato de Amido
Alginato	Alginato de Propileno Glicol
Extraídas de Algas	Hidroxipropilamido
Ágar	Carboximetilguar
Dextrana	
Xantana	
Extraídas de Sementes	
Microbiológicas	
Goma de Marmeleiro	

2.11.1. Goma do Cajueiro

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

O exsudado do cajueiro, produzido pela *Anacardium occidentale* L., pertencente à família *Anacardeaceae*, é constituído principalmente por um heteropolissacarídeo ramificado (arabinogalactana ácida), que apresenta propriedades adesivas e atividade de inseticida, bem como propriedades emulsificantes (PONTES, 1971). O cajueiro produz 178 – 2000 g/ano de goma, com um valor médio de 700 g/ano (BANDEIRA, 1991). A produção de castanha em árvores mais velhas do que 25 anos aumenta com a extração de goma.

A goma do cajueiro é constituída, principalmente, por unidades de galactose, arabinose, glicose, ácido urônico, manose e xilose. Entretanto, tem sido verificado que a porcentagem de monossacarídeos encontrados varia de acordo com a região geográfica. A tabela a seguir mostra a composição da goma de *Anacardium occidentale* de diferentes origens (ANDERSSON et al., 1974; PAULA & RODRIGUES, 1995).

Tabela 2.2: Composição da goma de *Anacardium occidentale* de diferentes Regiões.

Monossacarídeo	Quantidade em %		
	Brasil	Índia	Nova Guiné
Galactose	73	61	63
Arabinose	5	14	15
Glucose	11	8	9
Ramnose	4	7	7
Manose	1	2	1
Xilose	-	2	-
Ácido Glucorônico	6,3	6,2	5,7

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

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho experimental foi realizado nos laboratórios do Centro Universitário da Fundação de Ciências Aplicadas - UNIFEI. Foi utilizado abacaxi da espécie Havaí adquirido no mercado e a goma do cajueiro isenta da casca da árvore. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.1. PREPARO DE AMOSTRAS E SOLUÇÕES

3.1.1. Preparo da Amostra de Caldo

As amostras foram preparadas com abacaxi da espécie Havaí, encontrado no mercado e, exceto a coroa, foi triturado e filtrado eliminando as fibras, e armazenado, à temperatura de -18°C . Para os ensaios, as amostras foram descongeladas e utilizadas no mesmo dia. Caso a quantidade da amostra descongelada não fosse utilizada, era novamente congelada.

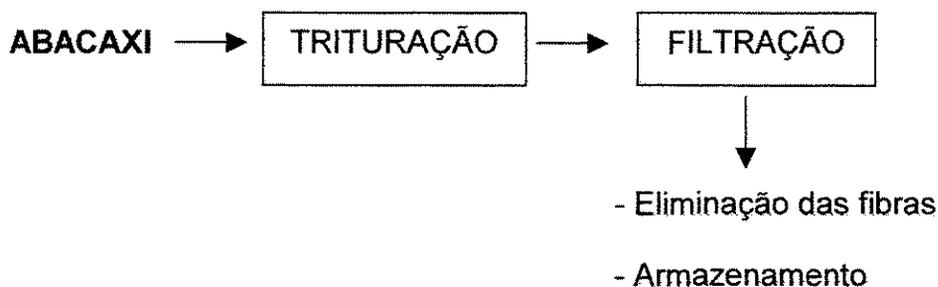


Figura 3.1 - Preparo da Amostra.

3.1.2. Purificação da Goma do Cajueiro

A goma do cajueiro amarelo isenta de casca de árvore, foi purificada de acordo com o método de RINAUDO-MILLAS (1991) modificado, como mostra a figura a seguir. A trituração da goma foi feita utilizando grau e pistilo. Na

precipitação, utilizou-se 3 vezes o volume de etanol, em relação ao volume da solução, permanecendo os oligossacarídeos em solução.

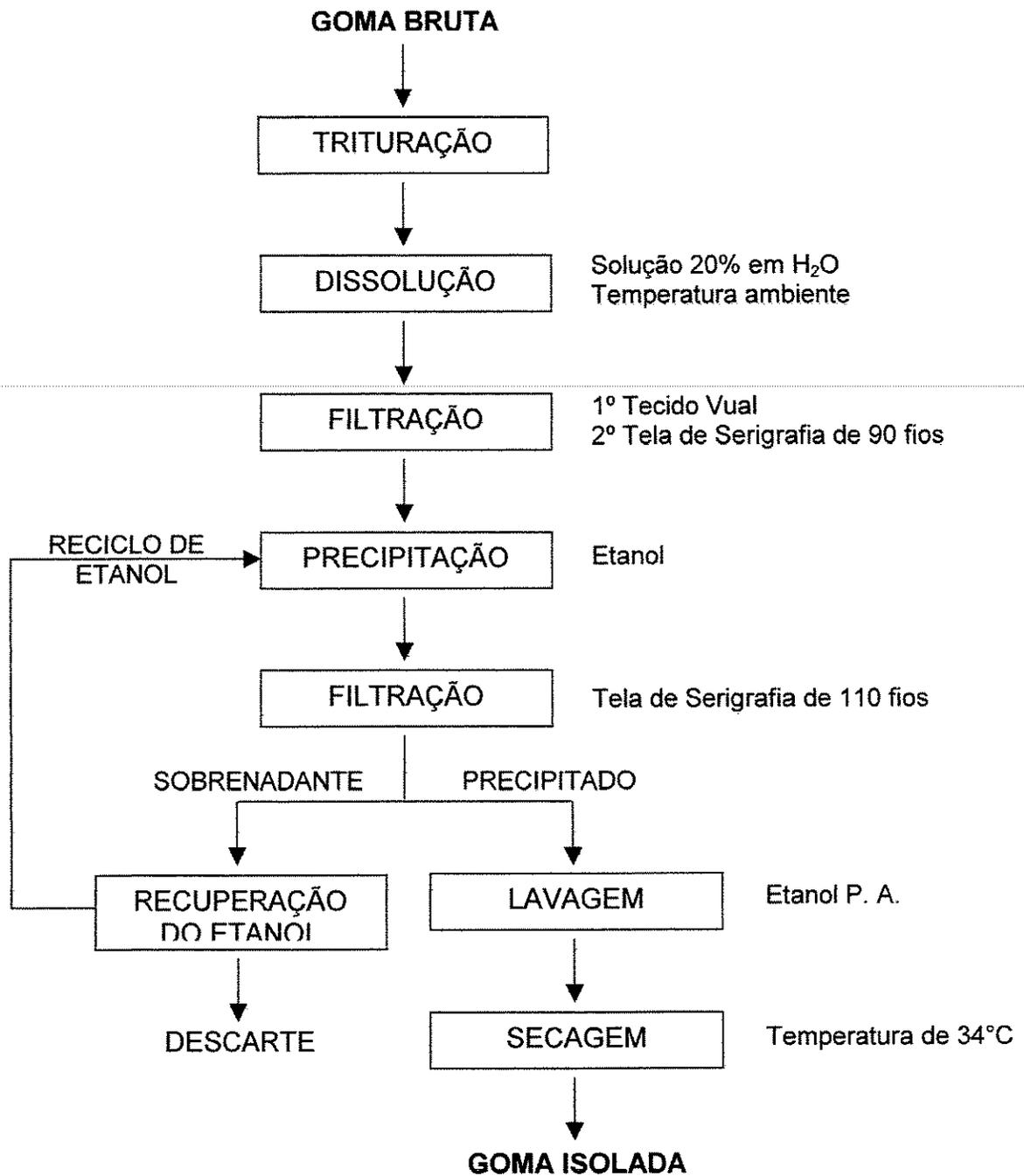


Figura 3.2 - Purificação da goma do cajueiro.

3.1.3. Preparo das Soluções

a) Solução estoque tampão fosfato de potássio 15 mM, pH's 6,0 e 8,0.

Primeiramente, são preparadas duas soluções de concentração 15 mM, uma solução de fosfato de potássio monobásico e outra de fosfato de potássio dibásico. Em seguida, misturar as duas soluções até atingir o pH desejado.

b) Solução estoque de polietileno glicol, 50%*m/m* para PEG de massa molar 4000 e 8000, nos pH's 6,0 e 8,0.

Pesaram-se 50 g de polietileno glicol (4000 e 8000) que foram dissolvidos em 50 g de tampão fosfato de potássio 15 mM.

c) Solução de polissacarídeo da goma do cajueiro, 30%*m/m* nos pH's 6,0 e 8,0.

Para 20 g de solução de POLICAJU, pesaram-se 6,0 g da goma do cajueiro que foram dissolvidos em 14 g de tampão fosfato de potássio 15mM.

d) Solução de Bromelina P. A. na concentração de 2 mg/mL.

Em um balão volumétrico de 10 mL, adicionaram-se 2 mg de Bromelina P.A. e avolumou-se com água destilada até 10 mL.

3.2. EXTRAÇÃO EM DESCONTÍNUO

Os sistemas foram preparados a partir de soluções de polímeros e tampão fosfato de potássio 15 mM. Esses sistemas foram preparados pesando-se, em tubo de centrífuga graduado de 15 mL, a quantidade de solução de cada componente necessária para a composição desejada até formar 5 g de solução.

Após a pesagem, os sistemas foram agitados em vórtex por 2 minutos e adicionados de 1g de caldo de abacaxi, ou solução de bromelina P.A.. Em seguida, os sistemas foram novamente agitados em vórtex por mais 2 minutos e centrifugados por 5 minutos a 500 rpm, para atingir a separação das fases mais rapidamente.

Posteriormente, foram retiradas alíquotas das fases superior e inferior, com o auxílio de uma pipeta automática, para determinação de proteína total. Este procedimento pode ser visto na figura 3.3.

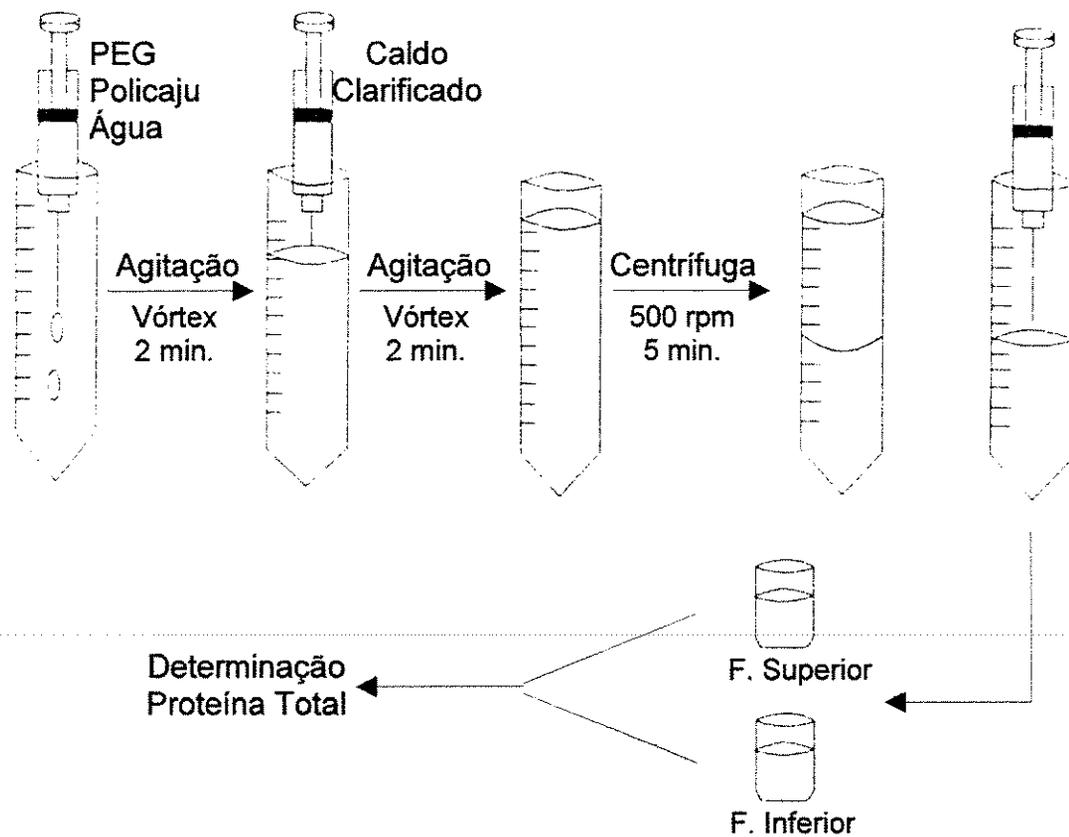


Figura 3.3 – Extração em Descontínuo

3.3. MÉTODO ANALÍTICO

3.3.1. Determinação de Proteína Total

O método de BRADFORD (1976) foi utilizado para determinar a concentração de proteína na fase superior. Devido à alta viscosidade da fase inferior, a concentração de proteína nesta fase foi determinado por balanço de massa. Este método baseia-se na ligação da substância Coomassie Brilliant Blue G-250 com a proteína, formando um complexo colorido que possui máxima absorção de cor na faixa de 465 a 595 nm

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

Procedimento:

Em um tubo de ensaio colocam-se 100 µL da amostra e 5 mL do reativo. Agitou-se o tubo de ensaio em vórtex e foi deixado em repouso por 5 minutos. Em seguida, leu-se a absorbância das amostras a 595 nm. O branco foi preparado com tampão fosfato de potássio 15 mM. Para os cálculos da concentração de proteína, fez-se uma curva de calibração utilizando albumina bovina (BSA) com concentrações variando de 100 a 1000 mg/L.

3.4. METODOLOGIA DE CÁLCULO

3.4.1. Coeficiente de Partição

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

$$K = \frac{\text{Concentração de Proteína na Fase Superior}}{\text{Concentração de Proteína na Fase Inferior}} \quad 3.1$$

3.5. PLANEJAMENTO FATORIAL

O planejamento de experimentos baseado em princípios estatísticos (BRUNS et al, 1996) é uma técnica que vem sendo utilizada por pesquisadores a fim de melhorar ou otimizar sistemas, processos ou produtos, extraindo do sistema em estudo o máximo de informação útil, fazendo um número mínimo de experimentos.

Existem diferentes tipos de planejamento. Nesse trabalho, como estão sendo levadas em consideração três variáveis: pH, concentração das fases e massa molar do PEG, foi aplicado o planejamento fatorial denominado 2^3 , onde três variáveis são analisadas em dois níveis. Eles são de grande importância quando se deseja saber se determinados fatores têm ou não influência sobre a resposta.

Para realizarmos este estudo, precisamos definir a matriz de planejamento listando os ensaios em uma ordem padrão. Todas as colunas começam com nível (-) e vão se alternando, um a um na primeira coluna, depois dois a dois e finalmente quatro sinais positivos e quatro negativos. A tabela 3.1. demonstra a matriz de planejamento feita para os planejamentos utilizados.

Tabela 3.1.: Matriz de Planejamento Fatorial 2^3 .

pH	Concentração	Massa Molar PEG
-1	-1	-1
+1	-1	-1
-1	+1	-1
+1	+1	-1
-1	-1	+1
+1	-1	+1
-1	+1	+1
+1	+1	+1

A tabela 3.2 apresenta as variáveis estudadas no sistema e seus níveis.

Tabela 3.2 - Variáveis estudadas nos ensaios.

Fatores	Nível (-)	Nível (+)
pH	6,0	8,0
Concentração (%PEG/%POLICAJU)	13/21 11/21	11/23 13/23
Massa Molar PEG	4000	8000

A escolha dos valores das variáveis usadas nos ensaios foi feita de acordo com a disponibilidade de reagentes no laboratório e, também, baseado na teoria encontrada na literatura.

Como o planejamento é 2^3 , são necessários 8 ensaios, no mínimo.

Após a realização dos ensaios, que foram feitos em duplicata, foram calculados os efeitos e a estimativa do erro (desvio padrão) para a interpretação dos resultados.

Desvio Padrão Amostral

O desvio padrão foi calculado através da fórmula:

$$s = \left\{ \left[\frac{1}{(N-1)} \right] \left[\sum (X_i - \bar{X})^2 \right] \right\}^{1/2} \quad 3.2$$

Onde: N é o número de elementos da amostra,

X_i é a grandeza medida,

\bar{X} é a média entre os resultados obtidos.

Desvio Padrão dos Efeitos

O desvio padrão para os efeitos é calculado por:

$$S_{\text{efeito}} = (s^2/2)^{1/2} \quad 3.3$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

Este capítulo apresentará os resultados obtidos nos experimentos realizados e as tendências observadas no comportamento dos sistemas.

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

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

4.1. Partição das Proteínas

A extração é estudada a fim de se encontrar as condições adequadas de um sistema de duas fases aquosas, que permitem obter os melhores resultados de extração.

A purificação de proteínas usando sistemas de duas fases aquosas é influenciada por vários fatores, tais como pH do sistema, massa molar do polímero, concentração e propriedades das proteínas, como estrutura, hidrofobicidade e massa molar, e tipo e concentração de sais presentes no sistema (ALMEIDA et al, 1998).

Nesse trabalho, caracterizou-se o sistema PEG/POLICAJU e algumas condições como pH, massa molar do polímero (polietileno glicol – PEG) e concentração das fases do sistema (concentração de PEG e POLICAJU) foram analisadas utilizando o caldo do abacaxi, que contém *bromelina* e outras proteínas e enzimas, e a bromelina P.A. como material de estudo. O objetivo é a obtenção de um sistema para se obter uma maior separação da *bromelina* dos demais componentes presentes no caldo do abacaxi.

Foram definidos quatro linhas de amarração, dois níveis de pH e dois valores de massa molar do polímero. As linhas de amarração foram estudadas duas a duas, variando juntamente pH e massa molar do polímero.

4.1.1. Variação 1.1 – Linha de amarração 11/23 %m/m e 13/21 %m/m

Primeiramente, foram analisadas as linhas de amarração de 13/21%*m/m* e 11/23%*m/m*. Variando-se pH, massa molar do PEG e a concentração dos componentes nas fases (linhas de amarração), tendo a concentração da fase POLICAJU maior que a da fase PEG, e usando o caldo do abacaxi, foram calculados os efeitos, a partir do coeficiente de partição da proteína. A tabela 4.1. mostra os efeitos e os níveis que foram estudados nessa variação.

Tabela 4.1: Discriminação dos efeitos e níveis para variação 1.1.

Efeitos	Nível (-)	Nível (+)
(1) pH	6,0	8,0
(2) Linha de amarração	13/21	11/23
(3) Massa molar PEG	4000	8000

A tabela 4.2. mostra as estimativas e o desvio padrão calculados para cada efeito, bem como a suas interações para essa variação.

Tabela 4.2 – Valores dos efeitos calculados para variação 1.1.

	Estimativa ± desvio padrão
Média	0,472 ± 0,0569
Efeitos Principais:	
(1) pH	-0,274 ± 0,114
(2) Linha de amarração	0,065 ± 0,114
(3) Massa molar PEG	- 0,085 ± 0,114
Interação dois fatores:	
12	0,046 ± 0,114
13	- 0,062 ± 0,114
23	0,013 ± 0,114
Interação três fatores:	
123	0,113 ± 0,114

Para essa variação o pH é o único efeito significativo. Aumentando-se o pH, há uma diminuição no valor do coeficiente de partição. A figura 4.1 mostra o comportamento do coeficiente de partição para esse efeito. Observa-se que para o pH 8,0 têm-se valores de coeficiente de partição menores, o que implica numa maior separação. A melhor separação ocorre em pH 8,0, com PEG de massa molar 8000 e linha de amarração 21%_{m/m} em POLICAJU e 13%_{m/m} em PEG, com K igual a 0,216.

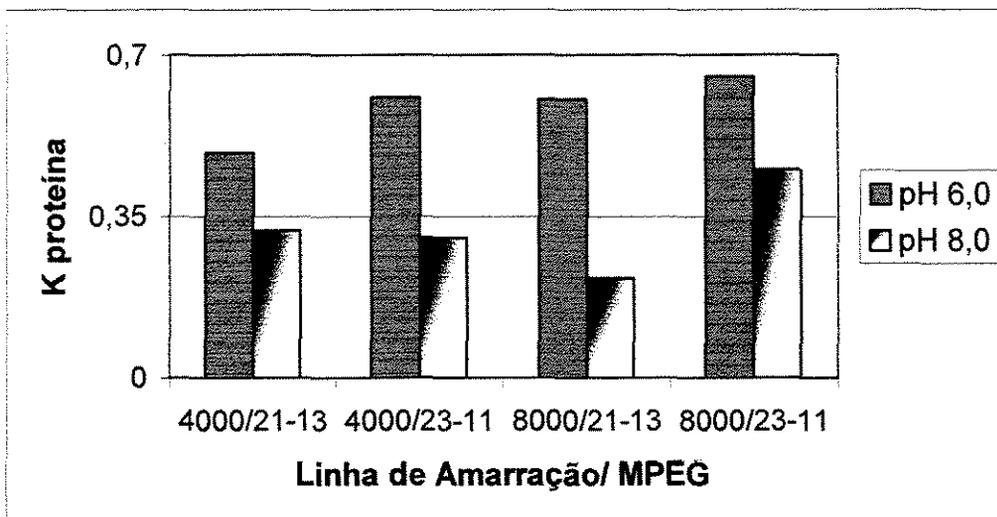


Figura 4.1: Efeito do pH no coeficiente de partição

4.1.2. Variação 1.2 – Linha de amarração 11/21 %m/m e 13/23 %m/m

Nesse item foram analisadas as linhas de amarração 11/21%*m/m* e 13/23%*m/m*, variando novamente o pH, massa molar do PEG e a concentração global dos componentes (linha de amarração), tendo a concentração da fase POLICAJU maior que da fase PEG, e usando o caldo do abacaxi. Com a variação de todos esses fatores foram calculados os efeitos, a partir do coeficiente de partição da proteína. A tabela 4.3. mostra os efeitos e os níveis que foram estudados nessa variação.

Tabela 4.3: Discriminação dos efeitos e níveis da variação 1.2.

Efeitos	Nível (-)	Nível (+)
(1) pH	6,0	8,0
(2) Linha de amarração	11/21	13/23
(3) Massa molar PEG	4000	8000

A tabela 4.4. mostra as estimativas e o desvio padrão calculados para cada efeito, bem como a suas interações para essa variação.

Tabela 4.4 – Valores dos efeitos calculados para variação 1.2.

	Estimativa ± desvio padrão
Média	0,893 ± 0,192
Efeitos Principais:	
(1) pH	- 0,765 ± 0,383
(2) Linha de amarração	0,234 ± 0,383
(3) Massa molar PEG	0,365 ± 0,383
Interação dois fatores:	
12	- 0,295 ± 0,383
13	- 0,288 ± 0,383
23	0,769 ± 0,383
Interação três fatores:	
123	- 0,768 ± 0,383

Os cálculos mostram que são efeitos significativos o pH, bem como a interação entre os três fatores e a interação entre os fatores 2 (linha de amarração) e 3 (massa molar do PEG) que apresentou o melhor resultado.

O aumento da massa molar do polímero aumenta a seletividade do sistema, porém diminui o valor do coeficiente de partição, favorecendo a fase POLICAJU. Na tabela 4.5., podemos observar que se aumentando a massa molar do polímero, a linha de amarração que apresenta um menor valor de K é a menos concentrada em POLICAJU.

Tabela 4.5: Comportamento do K para variação 1.2 em pH 8,0.

pH 8,0	Massa Molar PEG	
	4000	8000
Linha de Amarração	4000	8000
11/21	0,201	0,137
13/23	0,712	0,145

O PEG é um polímero composto por grupos $-CH_2 - CH_2 -$ ligados entre si por uma ligação éter. A solubilidade das proteínas em solução deste polímero tem sido interpretada por vários autores em termos do volume excluído do polímero (ATHA et al., 1981; POLSON et al., 1964). Segundo a teoria desenvolvida, as proteínas são excluídas estericamente de zonas do solvente ocupadas pelo polímero, sendo as solubilidades proporcionais ao volume do solvente disponível (solvente sem PEG). Assim, quanto maior for o volume excluído do polietileno glicol menor é o volume de solvente disponível, o que implica uma diminuição de solubilidade das proteínas na fase rica em polímero e conseqüentemente uma diminuição do coeficiente de partição (ALBERTSSON, 1986). Sendo o PEG um polímero que possui um grupo hidroxila ($-OH$) ligado a cada um dos grupos $-CH_2 - CH_2 -$ terminais, é de se esperar que para cada determinada concentração, a sua hidrofobicidade diminua com a diminuição da massa molar, uma vez que aumenta a representação dos grupos hidrofílicos terminais (KULA, 1985).

A influência da massa molar do polímero também está relacionada à massa molar da proteína. Foi observado que a partição de aminoácidos ou proteínas de baixa massa molar não é muito influenciada por variações da massa molar dos polímeros. Contudo, com proteínas de alta massa molar, a partição é influenciada pela variação da massa molar dos polímeros formadores de fase (ALBERTSSON, 1986).

A alteração da massa molar do PEG pode provocar variações na composição das fases em equilíbrio, como alterações nos diagramas de fases, influenciando a partição de biomateriais.

4.1.3. Variação 2.1 – Linha de amarração 11/23 %m/m e 13/21 %m/m

Foram analisadas as linhas de amarração de 13/21 %m/m e 11/23 %m/m, variando-se pH, massa molar do PEG e a concentração dos componentes nas fases (linhas de amarração), tendo a concentração da fase POLICAJU maior que a da fase PEG, e usando como proteína a Bromelina P.A. com concentração de 2 mg/L. Com a variação de todos esses fatores foram calculados os efeitos, a partir do coeficiente de partição da proteína. A tabela 4.6. mostra os efeitos e os níveis que foram estudados nessa variação.

Tabela 4.6: Discriminação dos efeitos e níveis para variação 2.1.

Efeitos	Nível (-)	Nível (+)
(1) pH	6,0	8,0
(2) Linha de amarração	21/13	23/11
(3) Massa molar PEG	4000	8000

A tabela 4.7. mostra as estimativas e o desvio padrão calculados para cada efeito, bem como a suas interações para essa variação.

Tabela 4.7 – Valores dos efeitos calculados para variação 2.1.

	Estimativa ± desvio padrão
Média	0,476 ± 0,0266
Efeitos Principais:	
(1) pH	-0,035 ±0,053
(2) Linha de amarração	0,078 ±0,053
(3) Massa molar PEG	0,059 ±0,053
Interação dois fatores:	
12	0,093 ± 0,053
13	0,091 ± 0,053
23	0,220 ± 0,053
Interação três fatores:	
123	0,108 ± 0,053

Nesta variação, o efeito mais significativo é a combinação da linha de amarração e a massa molar do polímero. A figura 4.2 ilustra a influência desses parâmetros no sistema.

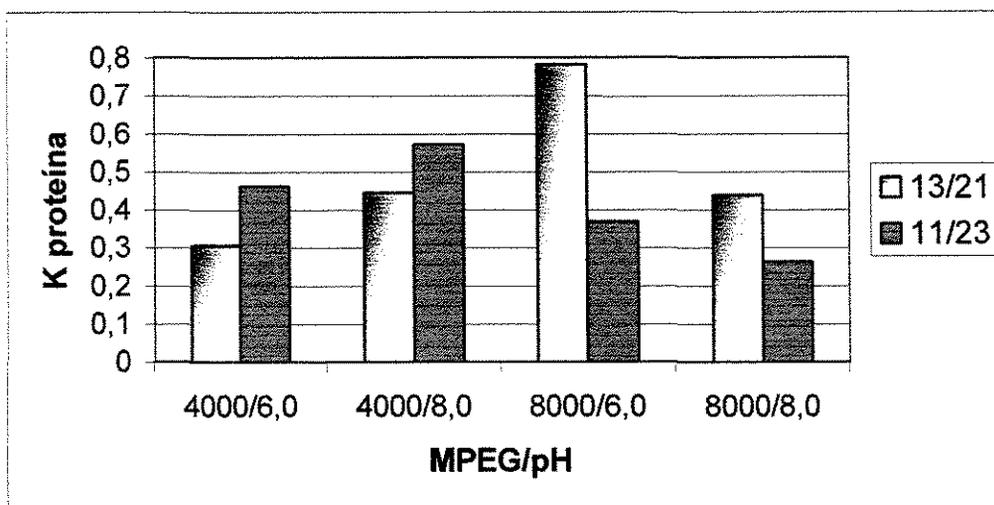


Figura 4.2: Comportamento do coeficiente de partição para variação 2.1.

Para essa variação os melhores valores de coeficiente de partição são 0,305 e 0,263. É interessante observar, através do gráfico acima, que esses valores de coeficiente de partição são obtidos para linhas de amarração, massa molar do polímero e valores de pH diferentes. O melhor valor do coeficiente de partição ($K=0,263$) é quando a concentração da fase POLICAJU é maior que o dobro da concentração da fase PEG.

É possível observar também através do gráfico, que para a linha de amarração 11%/m em polietileno glicol e 23%/m em POLICAJU, o aumento da massa molar do PEG diminui o coeficiente de partição.

O efeito da massa molar do polímero pode ser atribuído ao aumento de grupos hidrofílicos terminais em PEG em cadeias pequenas, o qual diminui a hidrofobicidade total, e também ao efeito do volume excluído, que aumenta com o aumento da massa molar do polímero.

Com os valores de coeficiente obtidos, verificou-se que tanto nos ensaios feitos com o caldo do abacaxi como nos ensaios feitos com a Bromelina P.A., a proteína teve a mesma tendência de partição, se concentrando na fase inferior, rica em POLICAJU, e que ambos os ensaios obtiveram valores de coeficiente de partição mais ou menos parecidos e que variaram num intervalo de 0,100 a 0,900.

4.1.4. Variação 2.2 – Linha de amarração 11/21 %m/m e 13/23 %m/m

Nesse item foram analisadas as linhas de amarração 11/21 %m/m e 13/23 %m/m, variando novamente o pH, massa molar do PEG e a concentração global dos componentes, mantendo a concentração da fase POLICAJU maior que da fase PEG, e usando como proteína a Bromelina P.A. com concentração de 2 mg/L. Variando-se todos esse fatores foram calculados os efeitos, a partir do coeficiente de partição da proteína. A tabela 4.8. mostra os efeitos e os níveis que foram estudados nessa variação.

Tabela 4.8: Discriminação dos efeitos e níveis para variação 2.2.

Fatores	Nível (-)	Nível (+)
(1) pH	6,0	8,0
(2) Linha de amarração	21/11	23/13
(3) Massa molar PEG	4000	8000

A tabela 4.9. mostra as estimativas e o desvio padrão calculados para cada efeito, bem como a suas interações para essa variação.

Tabela 4.9 – Valores dos efeitos calculados para variação 2.2.

	Estimativa ± desvio padrão
Média	0,797 ± 0,084
Efeitos Principais:	
(1) pH	- 0,0891 ± 0,168
(2) Linha de amarração	- 0,221 ± 0,168
(3) Massa molar PEG	- 0,152 ± 0,168
Interação dois fatores:	
12	- 0,470 ± 0,168
13	- 0,388 ± 0,168
23	- 0,249 ± 0,168
Interação três fatores:	
123	0,301 ± 0,168

Nessa variação, o pH não apresenta efeito significativo, mas a sua interação com a linha de amarração apresenta o melhor efeito significativo.

A figura 4.3 ilustra o comportamento do coeficiente de partição nos ensaios feitos para essa variação. Para a mesma linha de amarração, o aumento no pH provoca uma diminuição no coeficiente de partição, e, aumentando-se as concentrações das fases do sistema, têm-se menores valores de coeficiente de partição, isto é, melhores separações. A diminuição da linha de amarração aliada à diminuição do pH denota no maior grau de separação. Isso acontece em PEG 8000 onde se tem um coeficiente de partição igual a 0,1999 e a concentração da fase POLICAJU quase o dobro da concentração da fase PEG.

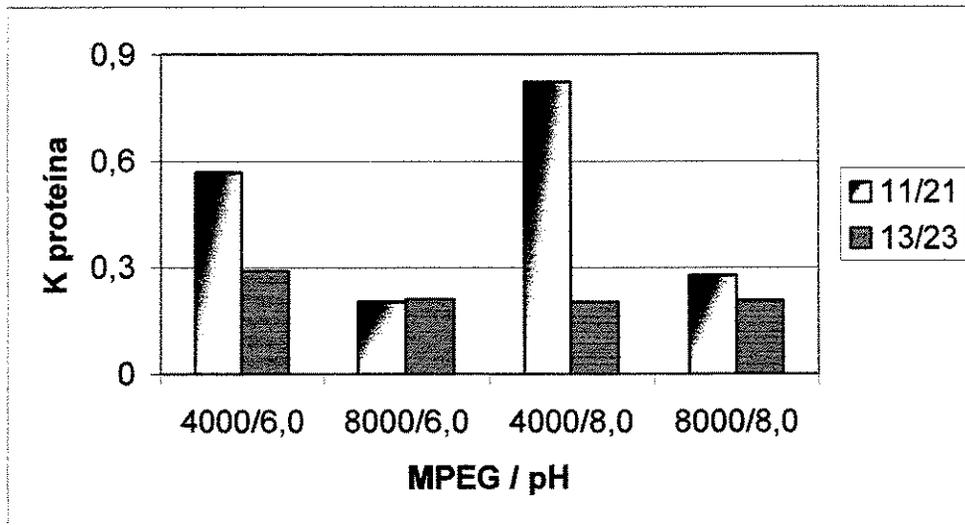


Figura 4.3: Comportamento do coeficiente de partição na variação 2.2.

Para essa variação de ensaios, não foram obtidos valores de coeficientes de partição próximos aos obtidos nos ensaios usando o caldo do abacaxi, sendo os valores de coeficiente de partição dos ensaios usando o caldo do abacaxi maiores que os obtidos usando Bromelina P.A.. Os resultados mostraram também que não se obteve uma mesma tendência de partição. Em alguns ensaios observou-se que a proteína se concentrou na fase superior, rica em Polietileno glicol.

5. COMPARAÇÃO DOS SISTEMAS PEG/SAL E PEG/POLICAJU PARA BROMELINA PRESENTE NO CALDO DO ABACAXI

Esse capítulo vai mostrar algumas diferenças entre os sistemas Polietileno glicol e sal (Fosfato de potássio) e Polietileno glicol e Polissacarídeo da goma do cajueiro utilizando a mesma proteína, a Bromelina. Os dados do sistema Polietileno glicol e sal são de BERTEVELLO, 2001.

Como o coeficiente de partição mede a concentração da proteína na fase superior em relação à concentração de proteína na fase inferior, observa-se através dos resultados demonstrados nas figura 5.1 e 5.2 que no sistema PEG/Sal a proteína se concentrou na fase superior rica em PEG, pois apresentam valores de coeficiente de partição maiores que 1, enquanto que no sistema PEG/POLICAJU ela se concentrou na fase inferior rica em POLICAJU por apresentarem valores de coeficiente de partição menores que 1.

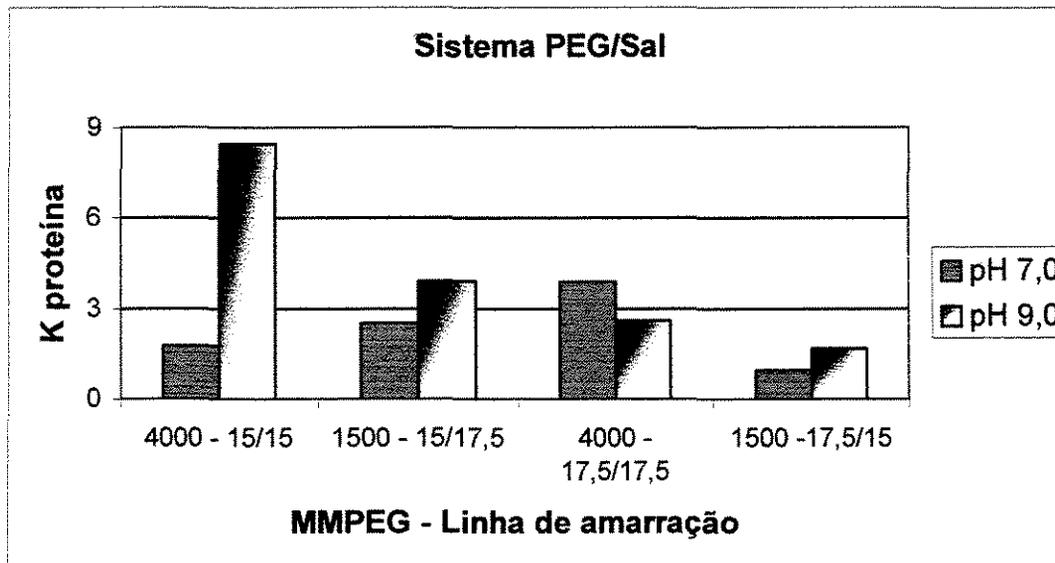


Figura 5.1: Comportamento dos coeficientes de partição no sistema PEG/Sal.

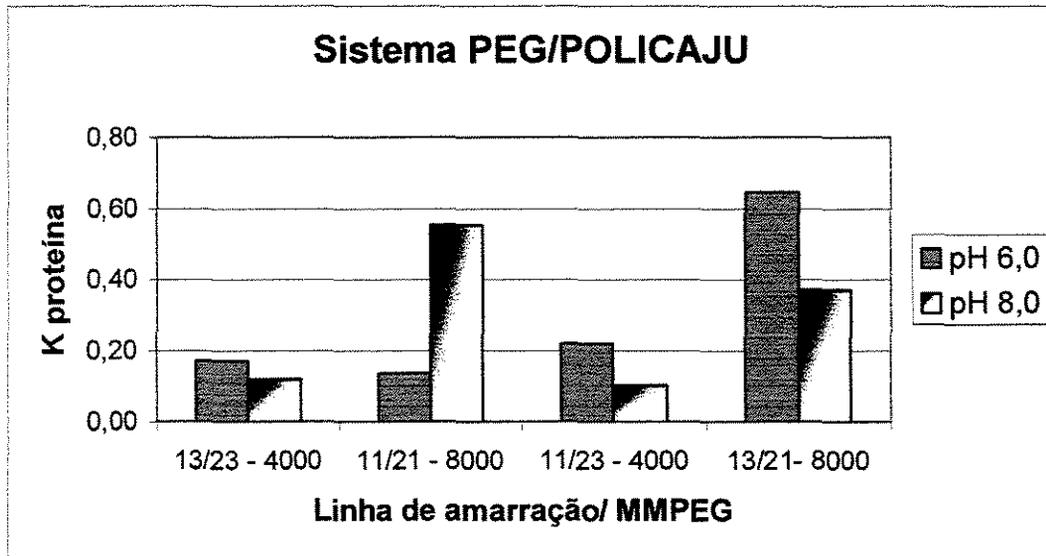


Figura 5.2: Comportamento do coeficiente de partição no sistema PEG/POLICAJU.

Observa-se também que no sistema Polietileno glicol e sal (fosfato de potássio) a maioria dos valores de coeficiente de partição são próximos de 1, enquanto no sistema Polietileno glicol e Polissacarídeo da goma do cajueiro (POLICAJU) esses valores são mais distantes, portanto apresentam uma melhor separação.

É importante observar que para formação das fases, em sistemas PEG/POLICAJU a concentração da fase goma tem que sempre ser maior que a concentração da fase PEG, pois caso contrário não forma duas fases. Em sistemas PEG/Sal não se tem esse tipo de problema, podendo usar qualquer concentração tanto de PEG quanto de sal para formar as duas fases.

Como os sistemas polietileno glicol e sal (fosfato de potássio) apresentam baixa densidade e baixa viscosidade, é possível o uso desses sistemas para uma extração líquido-líquido em contínuo. O mesmo não acontece com os sistemas polietileno glicol e polissacarídeo da goma do cajueiro (POLICAJU), pois a fase POLICAJU é muito viscosa, o que dificulta o seu uso.

No sistema PEG/Sal tem-se o melhor resultado quando a concentração das fases do sistema é 15 %m/m em PEG e 15% m/m em fosfato de potássio, o pH é igual a 9,0 a massa molar do PEG 4000. Já no sistema PEG/POLICAJU, o

melhor valor de coeficiente de partição é quando a concentração da fase goma é maior que o dobro da concentração da fase PEG (11%*m/m* em PEG e 23%*m/m* em POLICAJU), a massa molar do polímero é de 4000 e o pH é mais elevado (pH igual a 8,0).

6. CONCLUSÕES

Tendo em vista o estudo feito para determinação do coeficiente de partição no sistema bifásico aquoso PEG/POLICAJU, o que foi exposto e discutido, parece-nos lógico concluir que:

- Para a formação das duas fases aquosas é necessário que relativamente, a concentração da fase POLICAJU seja maior que a concentração da fase PEG;
- A *Bromelina*, na maioria das condições testadas, se concentrou na fase inferior rica em POLICAJU;

- Os resultados apresentados nos ensaios usando o caldo do abacaxi e nos ensaios usando a Bromelina P.A. demonstraram que a proteína teve a mesma tendência na maioria dos ensaios, se concentrando na fase inferior, rica em POLICAJU, e que os valores de coeficiente de partição apresentaram-se numa faixa de intervalo parecida ou próxima.
- Com o planejamento fatorial, observou-se que o pH é o efeito mais significativo. Alterando-se o valor do pH, tem-se variação no valor do coeficiente de partição.
- O sistema PEG8000 11%*m/m* /POLICAJU 21%*m/m*, nas condições testadas, foi o que apresentou a melhor separação da proteína, tendo K igual a 0,137.
- A partir de uma comparação feita entre o sistema PEG/POLICAJU e o sistema PEG/Sal (Fosfato de Potássio), o sistema PEG/POLICAJU apresenta melhores valores de coeficiente de partição, portando melhor separação da proteína.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

O sistema PEG/POLICAJU mostrou-se viável tecnicamente para a purificação da proteína escolhida. A possibilidade de estudar o comportamento de outras biomoléculas neste sistema, bem como aprofundar os conhecimentos das variáveis envolvidas na partição desta proteína é bastante interessante. A aplicação deste sistema no processo contínuo e sua utilização em larga escala também é uma possibilidade a ser estudada.

Outra sugestão é a utilização de outros tipos de sistemas para a separação da *bromelina*, tais como, ultrafiltração e a utilização de métodos cromatográficos na identificação da mesma.

Um estudo econômico do processo, visto que a matéria-prima da *bromelina*, o abacaxi, é uma fruta abundante no nosso país, seria interessante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTSSON, P.A., Partition of Cell Particles and Macromolecules, John Wiley, 3rd., 1986.
- ALBERTSSON, P.A.; TJERNELD, F., Phase Diagrams. Methods in Enzymology, v.228, p.3-13, 1994
- ALMEIDA, M. C., VENÂNCIO, A., TEIXEIRA, J. A, AIRES-BARROS, M. R. Cutinase purification on poly(ethylene glycol)-hydroxypropyl starch aqueous two-phase systems, Journal of Chromatography B, v.711, p. 151-159, 1998.
- ALSOP, R.M., Industrial productions of dextrans. Progress Industrial Microbial, v.18, p.1-44, 1983.
- ANDERSON, D.M.W.; BELL, P.C.; MILLAR, J.R.A. Composition of gum exudates from *Anacardium occidentale*. Phytochemistry, oxford, v.13, p.2189 – 2193, 1974.
- ASENJO, J.A., Aqueous two-phase for: I. Systems, principles and manipulation of selectivity.II.Processes and models. São Paulo, 1994. Apostila Instituto de Pesquisas Tecnológicas.
- ASENJO, J.A., Industrial prospects of aqueous two-phase processes. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, V. 59, P.109, 1994
- ASENJO, J.A., Separation processes in biotechnology. New York, Marcel, Dekker, 1990
- ATHA, D. H. W., BELL, P. C.; MILLAR, J. R. A. Composition of gum exudatos from *Anacardium occidentale*. Phytochemistry, oxford, v.13, p. 2189-2193, 1974.
- BAMBERGER, S.; BROOKS, D.E.; SHARP, K.A.; VAN ALSTINE, J.M.; WEBWE, T.J., Preparation of phase system and measurement of their physicochemical properties. IN: BROOKS, D.E.; WALTER, H.; FISHER, D.

- Partitioning in aqueous two phase systems. Orlando, Academic Press, 1985.
- BANDEIRA, C.T. Relatório Técnico da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa – CNPCa, v.6, p.1 – 2, 1991
- BASKIR, J.N., HATTON,T.A., SUTTER, U.W. *Protein partitioning in two-phase aqueous polymer systems*, *Biotechnology Bioeng.*, v.34, p.541-558, 1989.
- BELTER P.A., CUSSLER, E.L.; HU, W.S. Biosseparations: downstream processing for biotechnology. Minneapolis, Jhn Wiley & Sons, 1988.
- BERTEVELLO,L.C. Estudo do processo de recuperação e separação de bromelina utilizando sistema de duas fases aquosas em micro-coluna de extração. Tese de Doutorado, 105 p., Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.
- BOLAND , J. M.; HESSELINK, P.G..M.; PAPAMICHAEL, N. ; HUSTED, H. *Extractive purification as enzymes from animal using aqueous two-phase systems: Pilot scale studies.* *Journal of Biotechnolugy*, v. 19, p. 19-34, 1991.
- BRADFORD, M. M., *A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities for protein utilizing the principle of protein-dye binding.* *Analytical Biochemistry*, v. 72, 1976.
- BROOKS, D.SHARP, K. FISHER, D. *Theoretical Aspects of partitioning.*IN: Partitioning in aqueous two-phase systems, H. Walter, D.E. BROOKS, D.FISHER, academic Press, Orlando, 1985.
- BRUNS, R.E.; SCARMÍNIO, I.S.; BARROS NETO, B., Planejamento e Otimização de Experimentos, 2ª edição, Editora UNICAMP, São Paulo, 1996. 299p
- CABEZAS Jr, H. *Theory of phase formation in aqueous two-phase systems* *Journal of Chromatography B*, V. 680, p. 3-30, 1996.

- CABRAL, J.M.S., AIRES-BARROS, M.R., *Liquid-liquid extraction of biomolecules using aqueous two-phase systems*. IN: JOHN WILEY & SONS LTD. Recovery process for biological materials, New York; p. 273-301, 1993.
- CESAR, A.C.W., SILVA, R. e LUCARINI, A.C., *Recuperação das Enzimas Proteolíticas Presentes na Casca e Talo do Abacaxi*, R I C, 01, 47-54 , São Carlos, 1999.
- CESAR, A.C.W. Otimização dos parâmetros de extração líquido-líquido em duas fases aquosas na recuperação da bromelina presente no abacaxi, Campinas, 2000. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual de Campinas.
- COIMBRA, J.S.R., Desempenho de um extrator tipo Grassier na separação de proteínas do soro de queijo usando sistemas aquosos bifásicos. Tese de doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 1995.
- DIAMOND, A.D., HSU, J.T., *Aqueous Two-phase Systems for Biomolecule Separation*, IN: Advances in Biochemical Engineering Biotechnology, Managing (ed), Springer- Verlag Berlin Heidelberg, v.47, p. 90-134, 1992
- EITEMAN, M.A., *Temperature-dependent phase inversion and its effect on partitioning in the poly(ethylene glycol) ammonium sulphate aqueous two-phase system*, Journal of Chromatography A, v. 668, p. 13-19, 1994
- FORCINITI, D.; HALL, C.K.; KULA, M.R. *Influence of polymer molecular weight and temperature on phase composition in ATPS*. Fluid Phase Equilibria, v. 61, p. 243-262, 1991.
- FORCINITI, D.; HALL, C.K.; KULA, M.R. *Protein partition at the isoelectric point: influence of polymer molecular weight and concentration and protein size*. Biotechnology and Bioengineering, v. 38, p. 986-994, 1991.

- GUAN, Y. LILLEY, T. e TREFFRY, T. , A New Excluded Volume Theory and Its Application to the Coexistence Curves of Aqueous Two-Phase Systems, *Macromolecules*, 26 (1993), 3971-3979
- GUAN, Y.; TREFRY, T.E., LILLEY, T.H. *Application of a statistical geometrical theory to aqueous two-phase systems*. *Journal of Chromatography A*, 668, p-31-45, 1994.
- HARRIS, J.M., ALPANI, M. *Polymer-ligands used affinity partitioning and their synthesis*. IN: WLATER, H.; BROOKS, D.E., FISHER, D. (eds), Partition in aqueous two-phase systems. Academic press, Orlando, Fla, p.589-625, 1985.
- HARRIS, J.M. Poly(ethylene glycol) chemistry: biotechnical and biomedical applications, Ed Plenum, NY, 1992
- HUSTEDT, H; KRONER, K.H.; KULA, M.R.Applications of phase partitioning in the biotechnology. In: BROOKS, D.E.; WALTER, H.; FISHER, D.Partitioning in aqueous two-phase systems. Orlando, Academic Press, 1985.
- JOHANSSON, G. *Partitioning procedures and techniques: cells, organelles and, membranes*. *Methods in Enzymology*, v.228, p. 42-63, 1994.
- KRONER, K.H., HUSTEDT, H. e KULA, M-R, Extractive Enzyme Recovery: Economic Considerations, *Proc. Biochem. Eng.*, Fiechter A., Berlin, vol 24. (1982), 73-118
- KULA, M.R., *Purification of enzymes by liquid-liquid extraction*, IN: Advances in Biochemical Bioengineering, A.Fiechter (ed), Springer-Verlag, 1982.
- KULA, M-R, *Comprehensive Biotechnology*, COONEY, C. L. and HUMPREY, A. E. (eds), Pergamon Press, New York, v. 24, p. 73-118, 1982.
- LAHORE, H.M.F., MIRANDA, M.V., FRAILE, E.R., BONINO, M.J.B.J.; CASCONI, O.,Partition behaviour and purification of a Mucor bacilliformis acid proteases in aqueous two-phase systems. *Process Biochemistry*, v.30, p. 615-621, 1995

- LEHNINGER, A.L., Princípios de Bioquímica, Savier, 1995.
- LIMA, V.P.M.S. Cultura do Cajueiro do Nordeste do Brasil, Banco do Nordeste do Brasil, ETENE, Fortaleza – Ceará, Brasil, p.405-421, 1988.
- MARQUES, M.R., XAVIER – FILHO, Enzymatic and inhibitory activities of Cashew tree gum exudate. *Phytochemistry*, Oxford, v.30, p.1431-1433, 1991.
- MATIASSON, B.LING, T.G.I., *Extraction in aqueous systems for biotechnology*. IN: VENAL, N.S., HUDSON, M.J., *Biochemistry and Biotechnology*, p. 270-292, 1987.
- MILLER, J.N.B. *Industrial Gums*, *Encyclopaedia of Polymer Science and Engineering*, John Wiley & Sons (Eds.), v.7, p. 589, 1987.
- MURACHI, T. Bromelain enzymes. In: LORAND, L. Methods in Enzymology, v.XLV, p.475-85, New York, Academic Press, 1976.
- OLIVEIRA, L.A. Caracterização do sistema bifásico aquoso polietileno glicol / polissacarídeo da goma do cajueiro, Campinas, 1999. Tese de Mestrado, 95 p. Universidade Estadual de Campinas, SP, 1999.
- PAPAMICHAEL, N. BOERNER, B. e HUSTED, H. Continuous Aqueous Phase Extraction of Proteins: Automated and Recycling of Process Chemicals, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 54 (1992)
- PATHAK, S.P.; SUDSHA.; SAWANT, S.B.; JOSHI, J.B. New salt polyethylene glycol systems for two phase aqueous extraction. *The Chemical Engineering Journal*, v. 46, p. B31-B34, 1991
- PAULA, R.C.M.; RODRIGUES, J.F. *Composition and rheological properties of cashew tree gum, the exudate polysaccharide from Anarcadium occidentale L.*, *Carbohydrate polymers*, v.26, p.177-181, 1995.
- POLSON, A., POTGIETE, G.M., LARGIER, J.F., MEARS, G.E.F., JOUBERT, F.J., *Biochemical and Biophysical Acta*, v. 82, p.463, 1964.
- PONTES, U.R. Rev. Farm. Bioquim., v.2, p. 83 - 91, 1971.

- PORTO, A.L.F., Extração líquido-líquido de proteínas utilizando sistemas de duas fases aquosas em coluna de discos perfurados rotativos. Campinas, 1998, 98 p. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, 1998.
- ROWAN, A.D.; BUTTLE, D.J. and BARRETT, A.J. The cysteine proteinases of the pineapple plant. Biochemical Journal, v.266, n.3, p.869-75, 1990.
- SCHMIDT, A.S.; ANDREWS, B.A.; ASENJO, J.A., *Correlations for the partition behaviour of proteins in aqueous two-phase systems: effect of overall protein concentration*. Biotechnology and Bioengineering, v. 50, p. 617-626, 1996.
- SCOPES, R.K. Protein Purification: principles and practice, 2. ed. New York, Springer Verlag, 1994, 329 p.
- SCHLUCK, A., MAURER, G., KULA, M.R., *Influence of eletrostatic interactions on partitioning in aqueous polyethylene glycol/dextran biphasic systems*. Biotechnology and Bioengineering, v.46, p.443-451, 1995.
- SUH, H.J.; LEE, H.; CHO, H.Y. and YANG, H.C. Purification and characterization of bromelain isolated from pineapple. Journal of the Korean Agricultural Chemical Society, v.35, n.4, p.300-7, 1992
- WALTER, H., JOHANSSON, G., *Partitioning in aqueous two-phase systems; na overview*. Analytical Biochemistry, v.155 p.215-242, 1986.
- WALTER, H., JOHANSSON, G., BROOKS, D.E., *Partitioning in aqueous two-phase systems: recent results*. Analytical Biochemistry, v.197, p.1-18, 1991.
- WALTER, H., JOHANSSON, G. Aqueous two-phase systems. Academic Press, New York, 1994.
- WU, Y.T., LIN, D.Q., ZHU, Z.Q., MEI, L.H., *Prediction of liquid-liquid equilibria of polymer-salt aqueous two-phase systems by a modified Pitzer's virial equation*. Fluid Phase Equilibria, v. 124, p.67-79, 1996

YANG, W.Y., LIN; C.D., CHU, I. LEE, C.J., *Extraction of cephalosporin C from whole broth and separation of desacetyl cephalosporin C by aqueous two-phase partition*. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 43, p. 439-445, 1994.

ANEXOS

TABELA 1 – Valores de coeficiente de partição do gráfico da variação 1.1.

Concentração das Fases PEG/POLICAJU	pH	Massa Molar PEG	K
13/21	6,0	4000	0,489
11/23	6,0	4000	0,608
13/21	6,0	8000	0,603
11/23	6,0	8000	0,654
13/21	8,0	4000	0,319
11/23	8,0	4000	0,304
13/21	8,0	8000	0,216
11/23	8,0	8000	0,452

TABELA 2 – Valores de coeficiente de partição do gráfico da variação 2.1.

Concentração das Fases %PEG/%POLICAJU	pH	Massa Molar PEG	K
13/21	6,0	4000	0,305
11/23	6,0	4000	0,463
13/21	6,0	8000	0,783
11/23	6,0	8000	0,369
13/21	8,0	4000	0,446
11/23	8,0	4000	0,572
13/21	8,0	8000	0,438
11/23	8,0	8000	0,263

TABELA 3 – Valores de coeficiente de partição do gráfico da variação 2.2.

Concentração das Fases %PEG/%POLICAJU	pH	Massa Molar PEG	K
11/21	6,0	4000	0,569
13/23	6,0	4000	0,290
11/21	6,0	8000	0,205
13/23	6,0	8000	0,211
11/21	8,0	4000	0,824
13/23	8,0	4000	0,203
11/21	8,0	8000	0,278
13/23	8,0	8000	0,209

TABELA 4 – Valores de coeficiente de partição do sistema PEG/SAL.

Concentração das Fases %PEG/%SAL	pH	Massa Molar PEG	K
15/15	7,0	4000	1,767
15/15	9,0	4000	8,466
15/17,5	7,0	1500	2,529
15/17,5	9,0	1500	3,908
17,5/17,5	7,0	4000	3,886
17,5/17,5	9,0	4000	2,614
17,5/15	7,0	1500	0,969
17,5/15	9,0	1500	1,691

TABELA 5 – Valores de coeficiente de partição do sistema PEG/POLICAJU.

Concentração das Fases %PEG/%POLICAJU	pH	Massa Molar PEG	K
13/23	6,0	4000	0,170
13/23	8,0	4000	0,119
11/21	6,0	8000	0,136
11/21	8,0	8000	0,553
11/23	6,0	4000	0,219
11/23	8,0	4000	0,101
13/21	6,0	8000	0,646
13/21	8,0	8000	0,371