



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

*“Extração e Recuperação da Bromelina em Sistemas de Duas Fases
Aquosas PEG4000 – POLICAJU”*

Autor: Gilsinei Marques Campese

Orientador: Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi

Tese apresentada à comissão de Pós-graduação da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do Título de Doutor em Engenharia Química.

Área de Concentração: Sistemas de Processos Químicos e Informática.



Campinas-São Paulo-Brasil

Fevereiro/2004

UNIDADE	<u>BA</u>
Nº CHAMADA	<u>Unicamp</u> <u>C154e</u>
V	EX
TOMBO BC/	<u>58782</u>
PROC.	<u>6-117-09</u>
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	<u>11,00</u>
DATA	<u>02-07-09</u>
Nº CPD	

CM00198288-3

Bibid: 317488

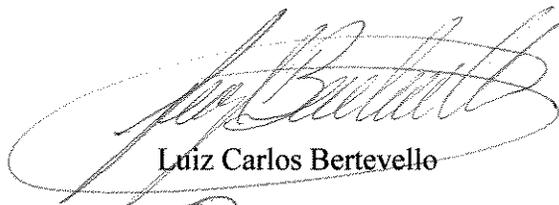
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

C154e Campese, Gilsinei Marques
 Extração e recuperação da bromelina em sistemas de
 duas fases aquosas PEG4000 - POLICAJU / Gilsinei
 Marques Campese.--Campinas, SP: [s.n.], 2004.

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

1. Bromelina. 2. Escoamento bifásico. 3. Separação
 da fase. I. Tambourgi, Elias Basile. II. Universidade
 Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia
 Química. III. Título.

Tese de Doutorado , defendida por Gilsinei Marques Campese , em 04 de fevereiro de 2004
e aprovada pelos professores doutores:



Luiz Carlos Bertevello



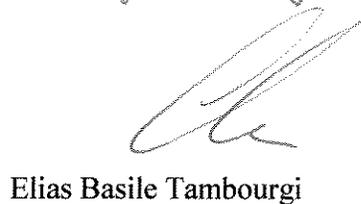
Douglas Alves Cassiano



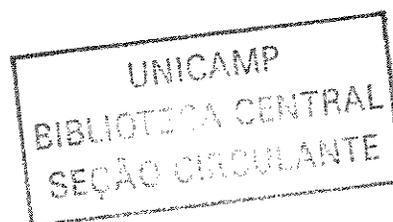
Ana Maria Frattini Fileti



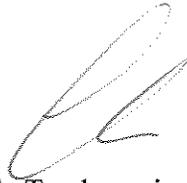
Elisabete Jordão



Elias Basile Tambourgi



Esta versão corresponde à final da tese de doutorado defendida por Gilsinei Marques Campese , em 04 de fevereiro de 2004.

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized 'E' followed by a smaller 'L' and a horizontal line.

Prof Dr Elias Basile Tambourgi – orientador

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir concluir mais uma etapa em minha carreira profissional.

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

À minha esposa Samira, com muito carinho, por sempre estar ao meu lado, mesmo quando estamos distantes e por nunca deixar desistir dos meus objetivos e ao meu filho Ibrahin Henrique por ser fonte de minha inspiração.

Às alunas de Iniciação Científica, Pâmela e Clélia, pela colaboração na realização desta pesquisa.

À Ana Paula Rabelo pela amizade e por algumas sugestões na elaboração deste trabalho.

À minha maravilhosa família, Euclides, meu pai, Neuza, minha mãe e Benedito, Geovane e Geane meus irmãos, por todo amor recebido, pelo incentivo, apoio e participação ao longo de toda esta caminhada, a todos os meus sobrinhos e cunhados.

Aos amigos Alexandre Simões, Alexandre Teixeira, Adriana, Ana, Arnaldo, Priscila, Tatiana, Christian, Jones e me perdoem os que não mencionei.

A Embrapa por ter cedido a goma do polissacarídeo do cajueiro.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro.

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

Minhas desculpas, novamente, pelas minhas ausências forçadas, Ibrahin Henrique e Samira

Eu amo vocês!!!!!!

Campese, G. M. “Extração e Recuperação da Bromelina em Sistemas de Duas Fases Aquosas PEG4000 – POLICAJU”, Tese de Doutorado Apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas.

RESUMO

O sistema de duas fases aquosas explora a capacidade de dois polímeros, ou de um polímero e um sal, se separarem em duas fases aquosas sempre que certas concentrações mínimas sejam excedidas. Neste trabalho, o objetivo é a determinação do índice de recuperação da bromelina do caldo do abacaxi, utilizando, para isso, uma microcoluna agitada por campânulas pulsantes, para três tamanhos de linhas de amarração, três pH's diferentes e três vazões de alimentação. A caracterização desse sistema bifásico aquoso é formada por um polímero regional, o polissacarídeo do cajueiro (Policaju). Sendo o elevado custo dos polímeros envolvidos o principal entrave à aplicação em grande escala da partição bifásica aquosa, este sistema apresentou a possibilidade em reduzir esse custo, aumentando a competitividade da partição bifásica aquosa como processo alternativo frente aos processos tradicionais de recuperação de bioprodutos. Os resultados demonstraram um aumento do índice de recuperação com o aumento da velocidade de rotação e com o aumento da composição do sistema. A análise do perfil de extração contínua da bromelina do caldo do abacaxi demonstrou que o maior índice recuperação da proteína foi obtido para as seguintes condições: sistema 13%PEG4000-22%Policaju em uma microcoluna pulsada com 3 campânulas à velocidade de 60 rpm com velocidade total de alimentação 11,12mL/min e pH 8,0 que foi de 68,82%.

Palavras Chaves: Bromelina, Sistemas de duas Fases Aquosas, Polietileno Glicol, Policaju, Índice de recuperação.

**EXTRACTION AND RECOVERY OF BROMELAIN IN PEG4000 –
POLICAJU AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEMS**

ABSTRACT. Aqueous two-phase system explores the possibility of solutions of two polymers or one polymer and one salt separating into two immiscible aqueous phases, when certain critical concentrations are exceeded. This work was characterised by the KAWASE recovery index analysis of the bromelain of pineapple juice, using a pulsed column for three sizes of tie lines, three different pH's and three feeding flows. The characterisation of a new aqueous two-phase system is based on a regional polymer, the polysaccharide of cashew nut tree (*Policaju*). Since the cost of the phase forming polymers is the main drawback on the large scale application of aqueous two-phase partition, this system showed the possibility of decreasing this cost by increasing the applicability of biphasic partition as an alternative technique to the traditional recovery processes of bio products. The results showed an increase of the recovery index with an increase of the rotation speed and with an increase of the system composition. The profile analysis of continuous extraction of the bromelain of pineapple juice demonstrated that the largest protein recovery was obtained for the following conditions: 13%PEG4000-22% Cashew nut tree system in pulsed column with 3 rotative disks at the speed of 60 rpm with total of feeding speed of 11,12 mL/min, and pH 8,0 which was 68,82%.

KeyWords: Bromelain, Aqueous Two-Phase Systems, Polyethylene Glycol, Cashew Nut Tree gum, Recovery Index

ÍNDICE

1 – INTRODUÇÃO	1
1.1–OBJETIVOS	5
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
2.1 – INTRODUÇÃO	6
2.2 – PROTEÍNAS	6
2.3 – ENZIMAS	6
2.4 – DESNATURAÇÃO DAS PROTEÍNAS	7
2.5– PROTEÍNA EM ESTUDO	8
2.6 – ABACAXI	10
2.6.1 – CULTIVO E COLHEITA	10
2.6.2 - CARACTERIZAÇÃO DA FRUTA	11
2.6.3 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA	11
2.7 – CONSUMO DA BROMELINA	12
2.8 – POLIETILENO GLICOL	13
2.9 – POLISACARÍDEO DO CAJUEIRO (Policaaju)	13
2.10 – FOSFATO DE POTÁSSIO (Monobásico e Dibásico)	20
2.11 – SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	20
2.11.1 – EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO	21
2.11.1.1 – CONCEITOS BÁSICOS	23
2.11.1.2 – COLUNAS PULSADAS	25
2.11.1.2.1 – REGIÕES DE OPERAÇÃO EM COLUNAS PULSADAS	26
2.11.1.3 –EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO	27

2.12 – DIAGRAMA DE FASES _____	29
2.12.1 – TERMODINÂMICA DO DIAGRAMA DE FASES _____	30
2.12.2 – FATORES QUE INFLUENCIAM O COMPORTAMENTO DO DIAGRAMA DE FASES _____	30
2.12.3 – PROPRIEDADES FÍSICAS DAS FASES _____	32
2.13 - TIPOS DE SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS _____	33
2.14 – SISTEMAS BIFÁSICOS AQUOSOS MAIS ESTUDADOS _____	34
2.15 – RECUPERAÇÃO DOS PRODUTOS _____	35
2.16 – RECICLAGEM DOS POLÍMEROS _____	37
2.17 – ASPECTOS ECONÔMICOS _____	37
3 – MATERIAIS _____	39
3.1 - POLÍMEROS CONSTITUINTES DOS SISTEMAS BIFÁSICOS AQUOSOS _____	39
3.2 – PROTEÍNA _____	39
3.3 - OUTROS REAGENTES _____	39
3.4 - EQUIPAMENTO EXPERIMENTAL _____	40
3.4.1 – INTRODUÇÃO _____	40
3.4.2 – EQUIPAMENTOS _____	40
3.4.3 – CAMPÂNULAS _____	40
3.4.4 – DESCRIÇÃO DO EQUIPAMENTO _____	42
3.5 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL – operação da micro-coluna _____	45
4 – MÉTODOS _____	46
4.1 – DETERMINAÇÃO DOS TEMPOS DE RESIDÊNCIA _____	46
4.2 - ISOLAMENTO DO POLISSACARÍDEO DO CAJUEIRO (POLICAJU) _____	46
4.2 - PREPARO DA AMOSTRA _____	47

4.3 - DADOS EXPERIMENTAIS _____	48
4.4 - PREPARAÇÃO DOS SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS _____	50
4.4.1 - EXTRAÇÃO CONTÍNUA DA BROMELINA _____	50
4.4.2 - DETERMINAÇÃO DA PROTEÍNA TOTAL _____	51
4.4.2.1 - PREPARAÇÃO DO REAGENTE DE BRADFORD _____	51
4.4.2.2 - DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO PROTÉICO _____	51
4.4.2.3 - CÁLCULO DO ÍNDICE DE RECUPERAÇÃO DO SOLUTO _____	51
4.4.2.4 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA _____	52
4.4.4.2.1 – PROCEDIMENTO _____	52
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO _____	53
5.1 - CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS DE TRABALHO _____	54
5.1.1 - COMPOSIÇÃO DOS SISTEMAS BIFÁSICOS AQUOSOS _____	55
5.2 - EXTRAÇÃO CONTÍNUA UTILIZANDO MICRO-COLUNA DE CAMPÂNULAS PULSANTES _____	56
5.3 - EFEITO DA COMPOSIÇÃO DO SISTEMA NO ÍNDICE DE RECUPERAÇÃO ____	57
5.4 - EFEITO DA VAZÃO TOTAL NO ÍNDICE DE RECUPERAÇÃO BROMELINA__	62
5.5 - EFEITO DO pH NO ÍNDICE DE RECUPERAÇÃO DA PROTEINA _____	67
6 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA _____	72
7 - COMPARAÇÃO DE CUSTOS PARA SISTEMA BIFASICOS _____	74
8 - PERSPECTIVAS PARA OS SISTEMAS BIFÁSICOS AQUOSOS _____	76
9 – CONCLUSÃO _____	77
10 - SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS _____	79
11 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	80

1 - INTRODUÇÃO

A bromelina é uma protease de origem vegetal encontrada no abacaxi e em outras espécies de plantas da família Bromeliaceae, que está presente na fruta e na planta, principalmente no caule de onde é obtida comercialmente. Entretanto a quantidade produzida ainda é pequena em relação às necessidades de mercado, o que torna a bromelina, um produto de alto valor comercial, que não é produzida no Brasil. Este estudo tenta viabilizar a fabricação da bromelina aqui no país, já que é um dos grandes produtores de abacaxi. A atividade proteolítica é o principal parâmetro de avaliação da qualidade e do valor comercial da bromelina. Sua importância econômica está relacionada com a produção de fármacos, com a indústria alimentícia, indústrias têxteis e fabricação de couros.

A bromelina comercial é obtida do caule do abacaxi após moagem, prensagem, filtração e precipitação do suco deste talo. Muitos precipitantes clássicos podem ser utilizados na preparação da enzima bruta ou no fracionamento da enzima, tais como: sulfato de amônio, metanol, isopropanol e acetona, combinados com variações do pH do suco. Contudo, no caso da preparação industrial da bromelina, a acetona é o precipitante mais conveniente.

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

Nesse sentido a extração líquido-líquido aplicada à biotecnologia é um campo tecnológico extremamente importante para o desenvolvimento de novos métodos de extração e purificação de proteínas ("downstream processing").

O avanço no desenvolvimento de pesquisas no campo da bioseparação tem sido limitado pela complexidade do processamento de produtos farmacêuticos e biológicos. De fato, 50 a 90% do custo para a obtenção de um produto biológico está na estratégia de purificação, havendo necessidade de se buscar técnicas de bioseparação eficientes e econômicas para se atingir altos índices de purificação e recuperação, além de preservar a atividade biológica da molécula DIAMOND & HSU (1992).

Quando se trata de moléculas, parâmetros tais como solubilidade e estabilidade, estão muito relacionados ao meio de extração normalmente aplicado nas indústrias. Vários são os critérios usados para a seleção de um meio de extração para aplicações biotecnológicas, dentre eles podemos citar MATIASSEN & LING (1987): Não ser tóxico para o sistema biológico; ser de fácil separação do produto; ser barato e disponível em grande quantidade; ser possível esterilizar; ser imiscível em solução de água; não possuir capacidade de formar emulsões estáveis com o material biológico; não ser inflamável; não ser tóxico para o homem.

A separação de proteínas de meios aquosos por precipitação é um dos métodos mais tradicionais para a recuperação e parcial purificação de biomoléculas. 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.

desenvolvidos novos processos de purificação, que visam a redução dos custos e do tempo de processo, diminuição do número de etapas necessárias e aumento da eficiência da separação e o grau de pureza dos produtos. Entre estes processos está a extração líquido-líquido, que pode ser usada como uma etapa de pré-purificação, substituindo um outro método de separação que seja mais caro ou reduzindo o número de etapas necessárias ao processo.

A extração líquido-líquido utilizando sistemas de duas fases aquosas tem sido uma área de grande interesse nos últimos anos. Muitos trabalhos têm sido realizados visando a aplicação destes sistemas na separação, em escala laboratorial, de vários biomateriais, como proteínas e organelas celulares, PORTO (1998); RABELO (1999); HIROSE (2001), por ser um método eficiente, versátil e de baixo custo. Estes sistemas são constituídos por duas fases parcialmente miscíveis que promovem a separação dos produtos em condições amenas e em um ambiente adequado de forma a preservar suas principais características. Sendo compostas de 70 a 90% de água, sendo seu uso apropriado para purificação de materiais biológicos, reduzindo assim o risco da desnaturação das biomoléculas. A separação de fases é resultante da incompatibilidade, em soluções, do polímero-polímero ou polímero-sal que ocorrem em função da concentração destes compostos.

Um exemplo de sistema de duas fases aquosas para fins de recuperação de bioproduto está relatado nos trabalhos de HUGHES *et al.* (1988), os quais purificaram parcialmente a proteína Albumina do Soro Bovino (BSA), a partir do plasma sangüíneo, usando sistema de duas fases aquosas com um único estágio de extração. KITAHARA *et al.* (1993) utilizaram sistema de duas fases aquosas formadas pelo copolímero F68/Sal para estudar a separação de anticorpos a partir

do extrato bruto de várias culturas de hidribromas. Neste caso, a extração com sistema bifásico aquoso mostrou-se um método de separação e concentração simples e rápido, com alta capacidade de recuperação.

Entre os sistemas bifásicos aquosos mais estudados em partição aquosa destaca-se o sistema Polietileno glicol-Dextrana. A utilização do Polietileno glicol (PEG) torna-se vantajosa devido ao baixo custo do polímero e às propriedades físico-químicas favoráveis. Por outro lado, a Dextrana apresenta um inconveniente: 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-Sais KULA *et al.* (1982), BOLAND *et al.* (1991); PAPAMICHAEL *et al.* (1992).

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

Outra forma para evitar o elevado custo associado ao sistema PEG-Dextrana é a utilização de polímeros alternativos, destacando-se o sucesso obtido pelo Hidroxipropilamido, comercializado sob o nome comercial de Reppal PES TJERNELD *et al.* (1986); STURESSON *et al.* (1990), o qual possibilitou uma elevada redução no custo dos reagentes necessários à formação de fases TJERNELD *et al.* (1986).

O exsudado do cajueiro, produzido pela *Anacardium occidentale* L., planta nativa do nordeste brasileiro, consiste num heteropolissacarídeo ramificado (arabinogalactana ácida) exsudado naturalmente ou através de incisões do tronco e ramos da árvore como uma goma ou resina PAULA & RODRIGUES (1995). Estudos preliminares indicam que o polissacarídeo apresenta características atrativas para aplicação como polímero constituinte de sistemas bifásicos aquosos SARUBBO (2000).

Normalmente, os processos de extração de partículas biológicas têm sido realizados de modo descontínuo; recentemente, a utilização de processos contínuos tem recebido impulso com a extração contínua em colunas operando em contracorrente, uma vez que o processamento contínuo apresenta inúmeras vantagens como a automação do processo, redução no tempo de processamento e menor espaço físico ocupado, uma vez que as unidades não são volumosas KULA (1990); BOLAND (1990). O interesse do emprego de SBA na extração líquido-líquido reside na disponibilidade de equipamentos já desenvolvidos, cujo desempenho é, ao menos em parte, conhecido. No entanto, o projeto destes equipamentos tem por base estudos realizados em sistemas tradicionais, enquanto as pesquisas voltadas aos sistemas de interesse atuais se

concentram na escolha de solventes, na determinação do equilíbrio de fases e dos coeficientes de partição, evidenciando a necessidade do estudo operacional e de transferência de massa para esta operação unitária aplicada a bioseparações.

Assim, este trabalho teve como objetivo, o estudo da aplicação de um polímero regional de baixo custo a técnicas de separação bifásica aquosa na recuperação da bromelina. Pretendeu-se mostrar que os dados compilados ao longo das últimas três décadas para sistemas bifásicos aquosos formados por polímeros como a Dextrana podem ser transpostos para sistemas formados por polímeros alternativos como por exemplo o polissacarídeo do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) e PEG 4000, através do estudo da influência do processo (linha de amarração, pH e vazão total de alimentação) na proteína total .

1.1 - OBJETIVOS

GERAL

Extração e purificação da bromelina existente no abacaxi através dos dados das linhas de amarração obtidos por SARUBBO (2000) com a caracterização de sistemas bifásicos aquosos formados pelo polissacarídeo do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) e PEG 4000.

ESPECÍFICOS

Estudar o comportamento do sistema para processamento contínuo através da utilização de uma microcoluna agitada por campânulas pulsantes e calcular o índice de recuperação da proteína.

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – INTRODUÇÃO

Neste capítulo será apresentada uma revisão sobre os principais tópicos relacionados a este trabalho e os fundamentos teóricos relacionados ao tema estudado, como proteínas, processos de separação aplicados a biotecnologia, extração líquido-líquido.

2.2 - PROTEÍNAS

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

As proteínas são macromoléculas cuja estrutura é constituída de polipeptídios, que são cadeias extremamente longas de muitas unidades de aminoácidos, unidas por ligações peptídicas LEHNINGER (1986). As proteínas não são apenas as macromoléculas orgânicas mais abundantes nas células, mas também são extremamente versáteis em suas funções e constituem 50% do seu peso seco. São encontradas em todas as partes de todas as células. Atualmente, elas são comercialmente muito importantes, principalmente nas indústrias de alimentos e farmacêuticas. Existem muitas espécies diferentes de proteínas, cada uma especializada em determinada função biológica diferente.

2.3 – ENZIMAS

A maior parte da história da bioquímica é a 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. 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. E, 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 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 é muito estável 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, com 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 distinta de uma reação catalisada enzimaticamente é que ela ocorre no interior dos limites de uma cavidade, ou fenda, na estrutura molar da enzima chamado de sítio ativo. A molécula que se liga ao sítio ativo e que sofre a ação da enzima é chamado 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 dos mecanismos enzimáticos.

2.4. DESNATURAÇÃO DAS PROTEÍNAS

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

Ao se proceder ao isolamento e purificação de uma proteína, são introduzidas alterações físico-químicas no seu meio ambiente, que podem afetar sua estrutura espacial a ponto de ocasionar a perda de sua função biológica. A proteína é dita, então, *desnaturada*. A desnaturação pode ser provocada por vários tipos de tratamentos.

O aquecimento da proteína nativa provoca rompimento de ligações não-covalentes. Valores de pH muito baixo ou muito alto, afetando a ionização dos grupamentos da proteína conferem à

molécula uma elevada carga positiva (ou negativa), ocasionando repulsão intramolar, com exposição do interior hidrofóbico. A adição de solventes orgânicos polares (álcoois, por exemplo) ou de compostos com grande capacidade de formar pontes de hidrogênio (uréia, por exemplo) determina a desnaturação da proteína, porque estes últimos agentes estabelecem pontes de hidrogênio com radicais da proteína, substituindo ligações que mantêm a estrutura nativa.

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

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

2.5 – PROTEÍNA EM ESTUDO

Neste trabalho será estudada uma proteína existente no abacaxi. Bromelina é o nome genérico dado ao conjunto de enzimas proteolíticas encontradas nos vegetais da família Bromeliaceae, da qual o abacaxi é o mais conhecido. As enzimas proteolíticas encontradas nos talos recebem o nome de bromelina do talo e tem o número sistemático EC 3.4.22.4, e as encontradas no fruto recebem o nome de bromelina do fruto ou ainda, bromelina e tem o número sistemático EC 3.4.22.5. A bromelina é uma glicoproteína, tendo um resíduo oligossacarídeo por molécula, que está covalentemente ligado à cadeia peptídica. A bromelina do talo é uma enzima sulfídrica, e este grupamento é essencial para a sua atividade proteolítica. A bromelina do fruto é uma proteína ácida, e seu ponto isoelétrico foi determinado por focalização isoelétrica como pH 4,6 e mudanças conformacionais irreversíveis ocorrem em valores de pH maiores que 10,3 MURACCHI (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. A queda marcante de atividade da protease durante o período final de maturação não é acompanhada por uma mudança correspondente na concentração de proteínas. De acordo com GORTNER & SINGLETON (1965); SUBRAMANIAN *et al.* (1978); MOORE & CAYGILL (1979), SILVA & AROLA (1980), parece ser razoável supor que a bromelina seja transformada em outra proteína com função metabólica diferente, como enzima produtora de sabor e aroma, uma vez que os constituintes voláteis responsáveis pelo aroma são formados quando a atividade de protease está diminuindo.

Embora haja uma acentuada diminuição da atividade proteolítica durante a maturação, o abacaxi é o único fruto que possui concentrações relativamente altas de proteases no estado maduro. Essa é uma das vantagens da utilização das proteases do abacaxi em comparação com outras proteases vegetais. No mamão e no figo, tanto a papaína como a ficcina, somente são encontradas em altos níveis quando o fruto está verde; com o completo amadurecimento, a concentração das proteases praticamente desaparece. Diferentes partes da planta podem ser usadas como matéria-prima para a obtenção da bromelina: folhas, talos, polpa da fruta, casca e resíduos industriais do processamento do fruto.

Outras fontes de enzimas proteolíticas são as proteases microbianas, por exemplo: o *Bacillus subtilis*, *Aspergillus sp.*, *Actinomyces sp.*, e as proteases animais tripsina (EC 3.4.21.4) e pepsina (EC 3.4.23.1), além dos vegetais, papaína (EC 3.4.22.2) e ficcina (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 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 da 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 alta 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 em pH 7,0 e temperatura 60°C. A forma de bromelina comercialmente encontrada é a bromelina do talo, apesar da grande quantidade de resíduos de abacaxi proveniente das indústrias de conservas.

As preparações da bromelina são impuras e geralmente 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 37,0 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) descreve a presença de quatro proteases principais presentes em abacaxis (*Ananas comosus*): bromelina do fruto, bromelina do talo, ananaína e comosaína.

A bromelina aparece em maior concentração na parte inferior dos talos de plantas maduras. A porção central do talo contém mais proteases do que a porção mais externa. As outras partes, embora suculentas, possuem pouca ou nenhuma protease detectável segundo HEINICKE & GORTNER (1957) e TISSEAU (1976).

2.6 - ABACAXI

2.6.1 – CULTIVO E COLHEITA

O abacaxizeiro é uma planta muito sensível ao frio, mas resiste bem à seca. Exige, por isso, clima quente ou mesotérmico, onde não há perigo de ocorrência de geadas. A temperatura média favorável situa-se entre 21 e 27°C. Quando a temperatura se mantém acima de 32°C, verificam-se danos na planta, quando a temperatura cai abaixo de 20°C, a planta entra em estado de inatividade MEDINA (1978). Portanto, o Brasil possui um clima muito favorável para a produção do fruto, dando ao país o segundo lugar no ranking mundial de produção do abacaxi, contribuindo com mais de 13% da produção mundial.

O abacaxizeiro frutifica dentro de 24 meses após o plantio, quando as mudas são do tipo coroa. De modo geral, pode-se obter de 15 a 20 mil frutas por hectare, em cada safra, servindo este valor como média para as variedades.

A época da colheita está intimamente relacionada à época de plantio e ao tipo e idade da muda. O plantio no Estado de São Paulo é feito de dezembro a fevereiro, no período que coincide com a colheita das frutas (época de maior produção) e, conseqüentemente, época favorável para a obtenção de mudas.

2.6.2 – CARACTERIZAÇÃO DA FRUTA

Em vista da grande comercialização do abacaxi, tanto no mercado interno como externo, e também para a indústria, cuja produção agrícola vem aumentando de ano para ano, os produtores devem procurar manter um padrão de qualidade da fruta a fim de garantir sua comercialização. Para isso, é necessário que sejam observadas algumas características importantes em relação à fruta:

COR: a cor revela nas frutas o seu grau de maturação, o que, apesar de ser uma apreciação subjetiva, permite distinguir a qualidade do produto. O abacaxi deverá apresentar uma coloração uniforme, porém sem estar muito maduro, o que é indispensável, tanto para a indústria como para o mercado consumidor.

TAMANHO: a uniformidade de tamanho é bastante importante, principalmente para a indústria, onde os diferentes comprimentos e diâmetros das frutas afetam a regulação das máquinas (ginacas, principalmente).

SABOR: é importante conhecer a relação Brix/acidez total titulável da variedade que vai ser comercializada ou industrializada. Essa relação varia de ano para ano, de acordo com as condições climáticas (principalmente), e também com a estação do ano. Há, portanto, grandes variações entre as safras de verão e inverno.

FORMA: esta característica afeta o descascamento mecânico e, portanto o rendimento, devendo a fruta ser de forma cilíndrica para evitar uma perda excessiva de polpa nessa operação. A variedade *Smooth Cayenne* de origem havaiana, apresenta frutas mais uniformes e cilíndricas do que a variedade Pérola (brasileira), que vem facilitar em muito o trabalho das ginacas e um menor desperdício do fruto na indústria de compotas.

2.6.3 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA

O abacaxi apresenta uma variação muito grande na sua composição química, de acordo com a época em que é produzido. De modo geral, a sua produção ocorre no verão, sendo sua colheita uniformizada através da indução química do seu florescimento.

Neste caso, as frutas apresentam maior teor de açúcares e menor acidez. Por outro lado, as frutas produzidas fora da época, ou seja, as frutas temporãs, apresentam alta acidez e baixo teor de açúcares, visto que a produção ocorre nos meses que a temperatura ambiente é baixa.

O valor nutricional das frutas de abacaxi depende, principalmente, dos seus açúcares solúveis, das vitaminas e dos sais minerais que contém, uma vez que os teores de proteínas e de gorduras são relativamente baixos.

O abacaxi é uma das frutas mais consumidas nos países tropicais; sua polpa sucosa, saborosa e ligeiramente ácida é muito refrescante. Ao lado das qualidades organolépticas, que o distinguem universalmente, há seu alto valor dietético, comparável ao das melhores frutas tropicais. O suco de abacaxi é um alimento energético, pois um copo do mesmo propicia cerca de 150 calorias ao organismo humano. O teor de açúcares varia em geral em torno de 12 a 15%, dos quais aproximadamente 66% são de sacarose e 34% de açúcares redutores. As cinzas, que apresentam 0,4-0,6% do peso total, são ricas em bases, principalmente em potássio, ao qual seguem o magnésio e cálcio, geralmente em partes iguais, e essas características permanecem em sua maioria nos resíduos triturados do abacaxi para o processamento da bromelina, sendo então este resíduo de grande interesse por suas características de alta riqueza nutricional.

2.7 – CONSUMO DA BROMELINA

A utilização da bromelina na indústria alimentícia ainda não se apresenta como um mercado atrativo, pois vem sendo largamente utilizada a papaína no amaciamento de carnes, e a grande barreira seriam romper o cartel de indústrias produtoras desta enzima, pois o consumidor só compra a carne amaciada ou 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.

A indústria de cervejas, onde a bromelina pode ser utilizada como clarificante, aboliu o seu uso alegando que esta enzima produzia resíduos de difícil retirada dos tanques de armazenagem do produto.

A principal concentração está na indústria farmacêutica brasileira uma das indústrias que mais investe em tecnologias e novos produtos. Recursos aplicados pelas empresas em suas operações foram da ordem de US\$ 2 bilhões no período de 1994 a 2000. De 2001 a 2005, estão previstos investimentos anuais em torno de US\$ 200 milhões segundo a (FEBRAFARMA).

2.8 – POLIETILENO GLICOL

O Polietileno glicol (PEG), $\text{HO}-(\text{CH}_2 \text{CH}_2\text{O})_n - \text{CH}_2 \text{CH}_2\text{OH}$, é um poliéter sintético neutro, linear ou de cadeia ramificada obtido por polimerização do óxido de etileno e disponível em uma variedade de massas molares, de poucas centenas a milhares de daltons. Os dois grupos terminais (hidroxilas) são normalmente usados para ligação por afinidade e outros grupos. Solubiliza-se em água e em solventes orgânicos. É também conhecido pelos nomes comerciais de poliglicol E®, carbovax® e pluacol®, dependendo da empresa que o fabrica. Para massas molares acima de 20.000 daltons são denominados óxidos de polietileno, PEO, são fornecidos em forma de soluções incolores estáveis ou pastas se possuem massas molares menores que 1000. Os de massas molares elevadas, acima de 1000, são encontrados na forma de pó ou de flocos brancos, podendo ser estocados a temperatura ambiente, embora a 4°C a ocorrência de oxidação em soluções seja retardada Harris (1992).

O PEG foi aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration), por não ser antigênico nem imunogênico, é muito utilizado na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica, principalmente por excluir, em ambiente aquoso, outros polímeros de sua vizinhança, não se solubilizando com eles. Está sujeito a modificações químicas rápidas controlando a solubilidade e aumentando o tamanho das moléculas às quais se liga. Não provoca a diminuição da atividade de células e proteínas, sendo biodegradável e atóxico Harris (1992).

2.9 - POLISSACARÍDEO DO CAJUEIRO (Policaju)

Gomas podem ser definidas genericamente como substâncias poliméricas que, em solvente ou agente de inchamento apropriado e mesmo a baixas concentrações, são capazes de formar dispersões ou soluções altamente viscosas ou até mesmo gel. Com esta definição, o termo aplica-se a uma vasta variedade de substâncias, incluindo hidrocarbonetos de alto massa molar, polissacarídeos e seus derivados, além de alguns polímeros sintéticos RODRIGUES *et al.* (1993); ROLLER & DEA (1992).

Industrialmente, no entanto, o termo goma, é mais específico e está associado a polissacarídeos e seus derivados. O solvente ou agente de inchamento é, neste caso, a água.

As gomas industriais podem ser classificadas em naturais e modificadas. As naturais podem ser obtidas de exsudados de árvore, de sementes, de algas ou por fermentação microbiológica. As modificadas são as derivadas de polissacarídeos insolúveis, como por

exemplo, a celulose. A TABELA 1 apresenta exemplos de gomas industriais classificadas pela fonte.

Gomas são substâncias incolores, inodoras, insípidas e não tóxicas. Essas propriedades aliadas a outras mais específicas, conferem às gomas inúmeras aplicações tecnológicas. As principais indústrias consumidoras de gomas hidrossolúveis são: a de detergente, a têxtil, a de adesivos, a de papel, a de tinta, além da alimentícia, farmacêutica e de cosméticos. Nestas indústrias são usadas como agentes espessantes, gelificantes, emulsificantes, floculantes, clarificantes e controladores de caloria. São empregadas também como adesivo e inibidor de cristalização, formador de filme e estabilizador de suspensão SPECIAL REPORT (1991).

TABELA 1 - Exemplos de gomas industriais classificadas pela fonte

CLASSIFICAÇÃO DAS GOMAS INDUSTRIAIS QUANTO A FONTE	
NATURAIS	MODIFICADAS
Exsudado de plantas	Carboximetilcelulose
Gomas arábica, caraia, tragacanto, do cajueiro	Hidroximetilcelulose Hidroxietilcelulose
Extraídas de algas	Carboximetilamido
Ágar, Alginato, Carragenana	Acetato de Amido
Extraídas de sementes	Hidroximetilamido
Goma Guar	Hidroxipropilamido
Fermentação microbiológica	Carboximetilguar
Dextrana, Xantana	Alginato de propileno glicol

As gomas vegetais oriundas de árvores (ou exsudados vegetais) são constituídas principalmente por heteropolissacarídeo, sendo produzidas espontaneamente após injúria mecânica ou invasão microbiana através dos troncos, galhos ou frutos, constituindo-se como parte do metabolismo normal da planta. Sua produção parece estar relacionada com algum mecanismo protetor do vegetal JONES & SMITH (1949); MARQUES & XAVIER-FILHO (1991). As gomas vegetais podem ser classificadas de acordo com propriedades físicas como solubilidade e viscosidade, com relação à presença de ácidos urônicos (gomas ácidas ou neutras) e também se utilizando a estrutura química do heteropolissacarídeo SMITH & MONTGOMERY (1959); ASPINNAL (1969); STEPHEN (1983).

O uso de gomas naturais, provenientes dos exsudados e extratos de plantas, vem tomando grande impulso pelas múltiplas e lucrativas possibilidades de industrialização. O exsudado do cajueiro, produzido pela *Anacardium occidentale* L., planta nativa do nordeste brasileiro (FIGURA 1), consiste num heteropolissacarídeo ramificado (arabinogalactana ácida) exsudado naturalmente ou através de incisões do tronco e ramos da árvore como uma goma ou resina de coloração amarelada e solúvel em água MENESTRINA *et al.* (1998); PAULA & RODRIGUES (1995).



FIGURA 1 - Exsudado obtido de *Anacardium occidentale* L.

A goma possui característica semelhante à goma arábica, podendo substituí-la como cola líquida para papel, na indústria farmacêutica, em cosméticos, e como aglutinante de cápsulas e comprimidos, e na indústria alimentícia como estabilizante de sucos, cervejas e sorvetes. Desta forma, o polissacarídeo do cajueiro representa um uso alternativo não convencional, podendo ser utilizado com diferentes finalidades. Existem estudos da goma do cajueiro com árvores provenientes da Índia (Madras), Nova Guiné (Papua) ANDERSON *et al.* (1974); ANDERSON *et al.* (1975) e também com árvores brasileiras, destacando-se o estado do Ceará como maior produtor do país MENESTRINA *et al.* (1998); PAULA & RODRIGUES (1995); RODRIGUES *et al.* (1993). A goma do cajueiro é constituída por unidades de galactose, arabinose, glicose, ácido urônico, manose e xilose. Entretanto, tem sido verificado que a percentagem dos monossacarídeos varia de acordo com a região geográfica. Um possível fragmento estrutural da goma pode ser observado na FIGURA 2. A TABELA 2 mostra a composição da goma de *Anacardium occidentale* L. de diferentes regiões.

As árvores produzem cerca de 700g/ ano em goma. A produção de frutos em árvores com mais de 25 anos aumenta após a extração da goma PAULA & RODRIGUES (1995). Devido à importância da cultura do cajueiro em algumas regiões brasileiras, a goma tem apresentado,

recentemente, um crescente interesse industrial, embora a aplicação deste produto biotecnologicamente ainda não tenha sido explorada.

TABELA 2- Composição da goma de *Anacardium occidentale* de diferentes origens

COMPOSIÇÃO (%)	ÍNDIA	NOVA GUINÉ	BRASIL
Galactose	61	63	73
Arabinose	14	15	05
Glicose	08	09	11
Ramnose	07	07	04
Manose	02	01	01
Xilose	02	-	-
Ac. Glucorônico	06	05	06

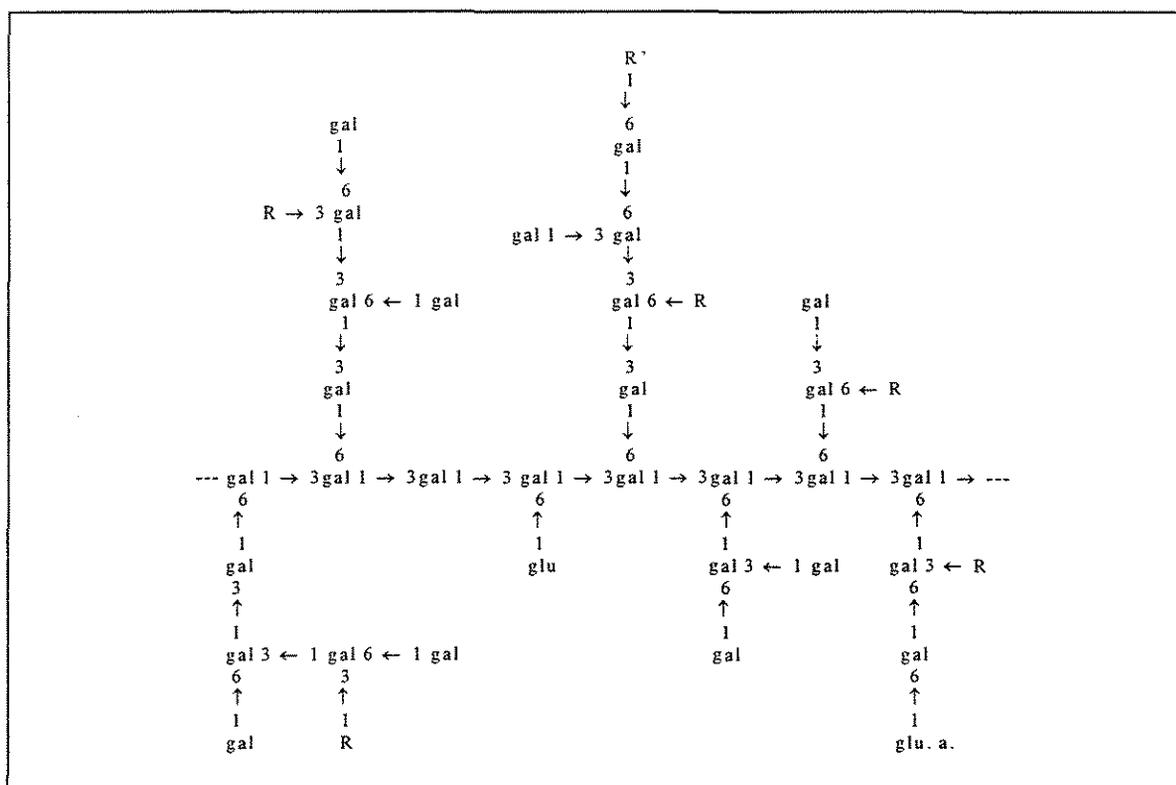


FIGURA 2- Um fragmento estrutural da goma de cajueiro. R representa D-manose, L-ramnose, L-arabinose ou cadeias de arabinose com ligação 1,2. R' representa D-glicose (glu) ou ácido D-glucurônico (glu. a.). Gal representa galactose.

Estudos recentes PAULA & RODRIGUES (1995) sobre a caracterização da goma do cajueiro mostram que esta é uma goma de baixa viscosidade. A viscosidade absoluta em soluções de 1% é de 1,0 mPas, encontrando-se dentro dos valores exigidos para a formação de uma dispersão de fases adequada, o que representa uma adequação da goma para aplicação como

componente de sistemas bifásicos aquosos, além de constituir um produto de fácil obtenção, já que o Nordeste brasileiro é rico nesta fonte natural.

SARUBBO (2000) obteve o diagrama de fase para o sistema PEG4000/Policaaju nos pH's 6,0, 7,0 e 8,0 à temperatura ambiente. Analisando o comportamento das binodais de cada sistema frente aos diferentes pH's verificou que não houve um deslocamento das binodais (FIGURA 3). Ainda não foram encontrados na literatura dados acerca da influência destes parâmetros sobre a binodal em sistemas polímero-polímero. Obteve as propriedades reológicas dos sistemas bifásicos aquosos que estão apresentados na tabela 3 e a razão das fases e tempos de separação dos sistemas bifásicos e estão apresentados na tabela 4.

Por outro lado, para sistemas PEG-Sal observa-se que a variação do pH provoca o deslocamento da binodal no sentido da maior concentração dos constituintes das fases com a diminuição do pH FRANCO (1992); HUDDLESTON *et al.*(1991). Para os sistemas bifásicos PEG-Sais de fosfato estudados por VIDEIRA & AIRES-BARROS (1994), a redução do pH de 8,0 para 7,0 aumentou a concentração de polímero e sais requeridos para a formação de fases. Este efeito pode ser explicado pelo aumento da proporção de $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ com a diminuição do pH. De fato, como o ânion monovalente é menos efetivo no "salting-out" do PEG, uma maior concentração de sal e/ou polímero torna-se necessária para obter um sistema bifásico. Estes resultados são corroborados por SARMENTO *et al.* (1994) e SEBASTIÃO *et al.* (1994) para sistemas PEG-Sais de fosfato.

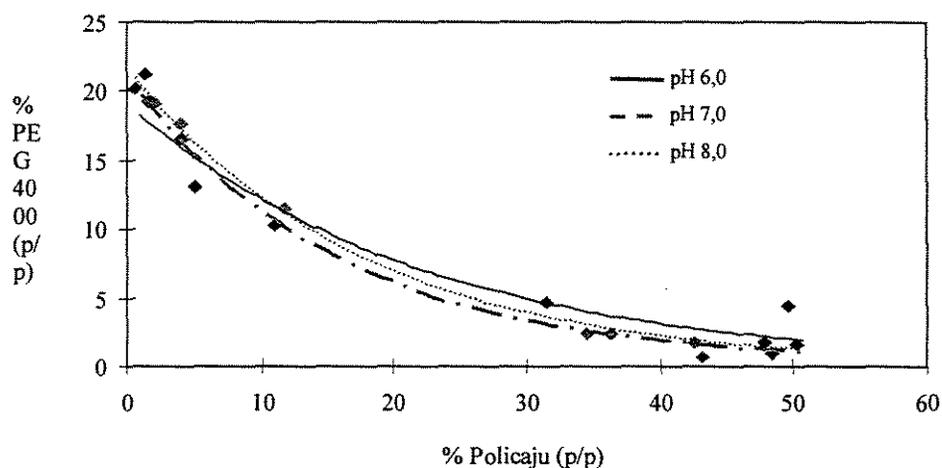


FIGURA 3- Diagrama de fases do sistema PEG 4000-Policaaju nos pH's 6,0, 7,0 e 8,0 a $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$.

As propriedades reológicas dos SBA's estudados, viscosidade e densidade estão apresentadas na TABELA 3.

TABELA 3 - Propriedades reológicas das fases dos diferentes SBA em estudo a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Linha de Amarração	pH	Fase superior		Fase inferior	
		Densidade (g/mL)	Viscosidade (cP)	Densidade (g/mL)	Viscosidade (cP)
9%PEG4000-18%Policaju	6,0	1,049	201,5	1,128	nd
11%PEG4000-20%Policaju	6,0	1,047	225,0	1,203	nd
13%PEG4000-22%Policaju	6,0	1,040	301,5	1,248	nd
9%PEG4000-18%Policaju	7,0	1,026	242,5	1,199	nd
11%PEG4000-20%Policaju	7,0	1,036	244,0	1,208	nd
13%PEG4000-22%Policaju	7,0	1,006	316,2	1,313	nd
9%PEG4000-18%Policaju	8,0	1,038	273,6	1,156	nd
11%PEG4000-20%Policaju	8,0	1,037	250,7	1,223	nd
13%PEG4000-22%Policaju	8,0	1,002	299,8	1,295	nd

nd- não determinado (> 983 cP)

SARUBBO (2000) verificou que, para as fases superiores, o aumento do comprimento da linha de amarração provocou o aumento da viscosidade devido ao aumento da concentração do sistema.

A alteração da viscosidade da fase inferior em função do pH é explicada pela variação da densidade de carga na molécula do Policaju. A redução do pH acarreta uma menor densidade de carga, ou seja, repulsão entre os grupos RCOO^- do ácido glucurônico, possibilitando que as cadeias se enovalem, diminuindo assim a viscosidade intrínseca.

Trabalhos realizados com soluções de pectina, goma arábica e polissacarídeo da palma gigante demonstraram a diminuição da viscosidade com a redução do pH. Essa mudança de viscosidade se deve à presença do ácido glucurônico nestas moléculas REYES (1978), corroborando com as observações visuais para o sistema constituído por Policaju.

Por outro lado, o aumento da temperatura acarretou a redução da viscosidade dos sistemas estudados, possibilitando a quantificação deste parâmetro para a maioria das fases inferiores dos sistemas estudados.

As viscosidades das fases dos sistemas PEG-Policaju na temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) são superiores às de outros sistemas polímero-polímero como PEG-Dextrana e PEG-

Maltodextrina TJERNELD *et al.* (1986); SZLAG & GIULIANO (1988), encontrando comparações nos sistemas Klucel-L-Pluronic P105 SKUSE *et al.*(1992) e PEG-Hidroxioprilamido bruto VENÂNCIO *et al.* (1993).

A razão de fases e o tempo de separação dos SBA testados estão apresentados na TABELA 4.

De um modo geral, a razão de fases diminui com o aumento da linha de amarração e com a redução do pH. O mesmo comportamento foi observado para o sistema PEG-Arabinogalactana CHRISTIAN *et al.* (1998).

O tempo de separação das fases em sistemas PEG-Policaju foi bastante curto quando comparado aos tempos de separação para outros sistemas descritos na literatura como Klucel-Pluronic P105 SKUSE *et al.* (1992), que embora possua propriedades semelhantes ao sistema PEG-Policaju, exibe tempos de separação muito superiores, entre 1200 e 7200 segundos.

TABELA 4 - Razão de fases e tempo de separação das fases dos diferentes SBA em estudo

Sistema ("Linha de Amarração")	PH	Temperatura (°C)	Razão de fases	Tempo de separação das fases (segundos)
9%PEG4000-18% Policaju	6,0	25 ± 2	2,1	45
11%PEG4000-20%Policaju			2,0	90
13%PEG4000-22% Policaju			1,9	180
9%PEG4000-18%Policaju	7,0	25 ± 2	3,3	45
11%PEG4000-20%Policaju			2,1	100
13%PEG4000-22%Policaju			1,9	165
9%PEG4000-18%Policaju	8,0	25 ± 2	3,7	50
11%PEG4000-20%Policaju			2,0	100
13%PEG4000-22%Policaju			2,0	120

Sarubbo,2000.

De um modo geral, o aumento da linha de amarração aumentou o tempo de separação das fases para todos os casos estudados devido ao aumento da viscosidade (TABELA 3), com o aumento da concentração do sistema.

A aplicação em larga escala de sistemas bifásicos aquosos está muito condicionada ao requerimento relativamente alto de reagentes químicos. Por outro lado, o tempo reduzido

requerido para a separação das fases, o que afeta diretamente os custos de energia, consiste no maior fator do baixo custo operacional destes sistemas. Desta forma, a análise do tempo de separação das fases dos sistemas estudados demonstrou que são necessários apenas poucos minutos para se atingir o equilíbrio de fases, independentemente dos comprimentos da linha de amarração e dos pH's testados. Uma vez que a rapidez do equilíbrio de fases é fundamental para o "scale up" de um processo CABRAL & AIRES-BARROS (1993), os sistemas PEG-Policaju parecem atender perfeitamente a esta condição, facilitando a viabilidade comercial não só da aplicação do sistema, mas também do equipamento necessário ao processo de separação.

2.10 – FOSFATO DE POTÁSSIO MONOBÁSICO E DIBÁSICO.

Os fosfatos são sais inorgânicos, amplamente conhecidos. São utilizados em sistemas bifásicos aquoso do tipo polímero/sal e, portanto, formar duas fases na presença do polímero. Além disto, apresentam um menor custo em relação a dextrana e maior facilidade de utilização industrial FORCINITI *et al.* (1991-a).

O fosfato de potássio monobásico, que também é conhecido como fosfato diácido de potássio, tem massa molar 136,09 g/mol e sua fórmula molecular é KH_2PO_4 (anidro). Em solução a 5% e temperatura de 25°C seu pH fica entre 4,1 a 4,5. A sua cinética de dissolução em água é lenta, sendo necessário aquecer o sistema para a dissolução total do sal a altas concentrações.

O fosfato de potássio dibásico anidro tem massa molar 171,18 g/mol e sua fórmula molecular é K_2HPO_4 . Em solução a 5% e temperatura de 25°C seu pH fica entre 8,5 a 9,6 e apresenta cinética de dissolução em água mais rápida que o monobásico.

2.11 – SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

O processo de separação e purificação de bioprodutos, também chamado "downstream processing", é atualmente um segmento muito importante na indústria tecnológica, pois pode chegar a representar de 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 iniciar um processo de purificação é o grau de pureza exigido para a proteína. Proteínas para fins terapêuticos ou de uso direto em seres humanos necessitam de um alto grau de pureza, o que não é necessário para enzimas que serão aplicadas em processos industriais. Em uma purificação em larga escala, o processo normalmente consiste de 4 a 6 etapas

que podem ser divididas em dois grupos. O primeiro é formado pelos processos de recuperação da proteína que consiste nas seguintes etapas:

- Separação das células; • Ruptura das células; • Separação dos fragmentos;
- Concentração da proteína.

No segundo grupo o objetivo é purificar a proteína, utilizando-se das seguintes etapas:

- Pré-tratamento ou isolamento primário; • Purificação de alta resolução;
- Refinamento final.

Para purificação de proteínas encontram-se muitas dificuldades, do ponto de vista técnico, e exige um elevado número de etapas. Por exemplo, a remoção dos fragmentos das células é difícil devido ao pequeno tamanho das partículas e viscosidade da solução. As etapas de concentração podem levar a baixos rendimentos e reprodutibilidade limitados. Os procedimentos de alta purificação, como a cromatografia, são limitados pela escala de operações e pelo custo das resinas. Por isso, a extração líquido-líquido vem despertando tanto interesse a fim de ser utilizada como uma etapa intermediária de separação, que substitui métodos de separação mais caros ou diminui o número de etapas de separação necessárias ao processo RABELO (1999).

A purificação e separação de proteínas baseadas nos princípios de partição em sistemas de duas fases aquosas têm sido muito desenvolvidas nos últimos anos. Essa técnica de extração parece ser especialmente adequada para as primeiras etapas dos procedimentos de separação, mas pode substituir etapas cromatográficas ou ser aplicada antes da cromatografia HUSTEDT *et al* (1985).

2.11.1 - EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

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

A extração líquido-líquido, um dos principais métodos de separação adotados industrialmente, é um processo que envolve a transferência de massa entre dois líquidos imiscíveis ou parcialmente miscíveis. Na extração líquido-líquido, a separação de um componente de uma solução líquida homogênea ocorre pela adição de um constituinte líquido,

insolúvel ou parcialmente solúvel. O soluto difunde-se no solvente com uma velocidade característica até atingir as concentrações de equilíbrio em cada uma das fases formadas. Este processo de separação é baseado na distribuição do soluto entre duas fases e na miscibilidade parcial dos líquidos.

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

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

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

Embora aplicada com sucesso há muito tempo, como uma técnica de separação laboratorial, sua utilização a nível industrial iniciou-se nas primeiras décadas do século XX, quando se procurava um método que resolvesse o problema da remoção de hidrocarbonetos aromáticos do querosene. Principalmente depois da Segunda Guerra Mundial, teve grande desenvolvimento na indústria, alcançando os mais diversos setores. Atualmente, é empregada com sucesso, em larga escala, em vários setores industriais tais como, extração de metais, extração de compostos orgânicos, como ácidos e álcool, purificação de antibióticos, indústria farmacêutica e para tratamentos de efluentes industriais, entre outros. Sua maior aplicação concentra-se na indústria petroquímica e mais recentemente a extração líquido-líquido vem sendo estudada e aplicada na área de Biotecnologia para a purificação e extração de biomateriais, como enzimas e proteínas.

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

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

A extração líquido-líquido pode ser realizada de diversas formas por meio de vários tipos de equipamentos, mas sempre seguindo os mesmos princípios básicos de contato entre os líquidos, transferência de massa, equilíbrio de fases e separação de fases. Esta separação de fases comumente ocorre pelo processo de decantação RABELO (1995).

2.11.1.1 - CONCEITOS BÁSICOS

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

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

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

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

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

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

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

Os solventes utilizados devem ser compostos que tenham densidades diferentes da densidade de alimentação. Por esse motivo, as expressões "fase leve" e "fase pesada" são usadas

para nomear as correntes que fluem na coluna. A fase de menor densidade é chamada de "fase leve" e a fase de maior densidade é chamada "fase pesada".

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

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

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

"Backmixing" (ou mistura axial) - é o retorno axial da fase dispersa. A fase dispersa escoar em sentido oposto ao esperado. Ele faz com que o gradiente de concentração, que é a força-motriz da transferência de massa na coluna, diminua, prejudicando a taxa de transferência da massa e a eficiência de separação. A alta velocidade da fase contínua pode fazer com que esta carregue as gotas da fase dispersa em sentido oposto ao do escoamento dessa fase. Pode ocorrer também devido à presença de gotas muito pequenas ou turbulência excessiva.

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

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

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

2.11.1.2 - COLUNAS PULSADAS

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

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

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

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

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

DUARTE *et al.* (1992) apresentaram um estudo da hidrodinâmica e transferência de massa em uma coluna pulsada de discos e coroas. O sistema líquido ternário usado foi água-ácido málico-álcool amílico, sendo que a transferência de massa se realizou da fase contínua (água) para a fase dispersa (álcool amílico). A intensidade de pulsação, definida pelo produto da amplitude e frequência, variou de 0,6 a 1,8 cm/s. Verifica-se que há um aumento de eficiência com o aumento da velocidade de pulsação até um máximo, a partir do qual esta começa a diminuir. Eficiências superiores a 90% foram encontradas (esta eficiência é baseada na comparação com o equilíbrio – Eficiência de Murphree). Os dados de equilíbrio para este sistema foram determinados experimentalmente.

RABELO (1999) utilizou uma micro-coluna por campânulas pulsadas utilizando um sistema de duas fases aquosas para a purificação do Citocromo b5 e Ascorbato Oxidase HIROSE (2001) utilizou também a mesma micro-coluna com sistema de duas fases aquosas para a extração da Tripsina.

2.11.1.2.1 – REGIÕES DE OPERAÇÃO EM COLUNAS PULSADAS

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

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

1-Região de operação de completa inundação: SEGE e WOODFIELD (1954) definiram o ponto de inundação ("flooding") como sendo a condição de operação em que as correntes de alimentação da coluna e de entrada do solvente são impossibilitadas de escoarem em contracorrente. Ou seja, as correntes entram e saem da coluna por uma mesma extremidade, sem que possa acontecer um contato adequado entre elas. As gotas da fase que deve se dispersar na

fase contínua são rejeitadas por esta fase. Não se dispersam e assim, não ascendem até o topo da coluna, devido às condições nas quais o equipamento é operado. Este tipo de operação é totalmente indesejável em qualquer equipamento de contato contínuo.

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

3-Região de operação de mistura-decantação: A operação de mistura-decantação, segundo SEGE E WOODFIELD (1954), ocorre em baixas cargas (vazão total que entra na coluna) e frequências, sendo caracterizada pela separação das duas fases (leve e pesada), sob a forma de camadas distintas entre os pratos durante o pulso. Este tipo de operação é altamente estável, porém menos eficiente quando comparada com a operação da mesma coluna em condições de emulsão.

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

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

2.11.1.3 EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO

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

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

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

$$I_R = \frac{c_f - c_r}{c_f} \quad (1)$$

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

c_r é a fração mássica de soluto no refinado.

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

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

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

$$E^* = \frac{y_f - y_r}{y_f - y_r^*} \quad (2)$$

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

Chegou-se a esta definição por meio de uma modelagem, fazendo-se uso de conhecimentos de análise dimensional. Esta equação representa a relação entre a eficiência obtida no equipamento (eficiência ideal) e a que seria obtida se o tempo de contato entre as fases fosse suficiente para se atingir o equilíbrio (eficiência real), portanto representa o desvio em relação ao equilíbrio. Esta equação é muito importante para fins de comparação e projeto de equipamentos de extração. Nesta definição, y_r^* é a concentração de soluto (fração molar) que se encontraria na fase refinada se o sistema estivesse em equilíbrio com a fase extrato. Para uso da equação 2, é necessário o conhecimento das condições de equilíbrio para o sistema líquido ternário, o que pode ser obtido experimentalmente ou através de teorias termodinâmicas.

2.12 - DIAGRAMA DE FASES

Em princípio a maioria, se não todos, os polímeros hidrofílicos, naturais ou sintéticos miscíveis com a água mostram separação de fase em uma mistura com um segundo polímero ou com sais. As composições das fases e as concentrações das misturas polímero-polímero ou polímero-sal necessárias para que ocorra a separação das fases podem ser representadas num diagrama de fases. A Figura 4 representa esquematicamente o diagrama de fases para um sistema polímero A – polímero B – água. Neste, as concentrações dos polímeros são expressas em % (p/p), designando-se por binodal a linha curva que divide o diagrama em duas áreas distintas. A separação das fases ocorre apenas quando as misturas dos dois polímeros possuem composições representadas por pontos acima da binodal (ponto F), enquanto que misturas representadas por pontos abaixo da binodal (ponto D) resultam numa solução homogênea CABRAL & AIRES-BARROS (1993).

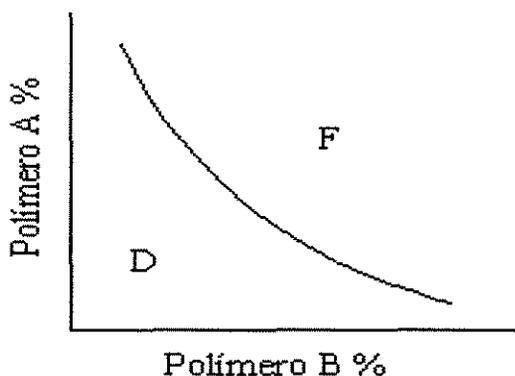


Figura 4: Diagrama de fases representativo de um sistema polímero A – polímero B – água. Misturas representadas por pontos acima da curva (ponto F) resultam em sistemas bifásicos, enquanto que misturas representadas por pontos a baixo da curva (ponto D) resultam em sistemas unifásicos.

O comprimento das linhas de amarração é responsável por muitos efeitos envolvidos na partição dos componentes. A teoria de Flory-Huggins prevê que o coeficiente de partição aumenta exponencialmente com o aumento da diferença da composição entre as fases. De maneira geral o aumento das linhas de amarração promove alteração da partição das proteínas CARLSON (1988).

2.12.1 – TERMODINÂMICA DO DIAGRAMA DE FASES

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

$$\Delta G_m = \Delta H_m - T\Delta S_m, \quad (3)$$

em que ΔG_m , ΔH_m , ΔS_m e T referem-se à energia livre de Gibbs de mistura, à entalpia de mistura, entropia de mistura e temperatura, respectivamente. Se ΔG_m é negativo, a mistura dos polímeros com água resultará numa solução homogênea. Se ΔG_m é positivo, a separação de fases ocorrerá. A teoria de FLORY-HUGGINS (1941) sugere que se as concentrações das soluções de polímeros são baixas, existirá apenas um pequeno ganho de entropia na mistura dos polímeros em água. Entretanto, uma vez que a cadeia do polímero tem uma área superficial muito maior do que os compostos de baixa massa molar, as interações entre os segmentos das duas moléculas de polímero, que são geralmente desfavoráveis, levarão a um ΔH_m positivo que dominará o ΔG_m da expressão (FLORY, 1953). O ΔG_m positivo resultará na separação das fases. Portanto pode-se concluir pelo uso da teoria de FLORY-HUGGINS (1941) que a água não possui um papel importante na separação das fases, mas sim apenas as interações entre os polímeros.

Por outro lado, ZASLAVSKY *et al.* (1989) afirmam que a estrutura da água também deve ser considerada na separação de fases. Sua teoria baseia-se nas propriedades físico-químicas da água (constante dielétrica, tempo de relaxamento dielétrico, afinidade relativa da água para o grupo CH_2 e polaridade total), ou seja, a água não se comportaria como um solvente inerte sendo capaz de interagir em múltiplas ligações covalentes, como também em pontes de hidrogênio em um único segmento dos polímeros hidrofílicos envolvidos. Estes autores baseiam-se no fato de que se alterando diferentes fatores tais como temperatura, solventes orgânicos, sais inorgânicos, efeitos similares são produzidos no comportamento do diagrama de fases. O ponto que esses fatores têm em comum é afetar a estrutura da água.

2.12.2 – FATORES QUE INFLUENCIAM O COMPORTAMENTO DO DIAGRAMA DE FASES

O diagrama de fases de um determinado sistema pode ser influenciado por muitos fatores como a concentração e massa molar dos polímeros, temperatura, adição de sais e pH, embora os

mecanismos e os efeitos através dos quais estes parâmetros influenciam a separação das fases ainda não estejam completamente compreendidos KULA *et al.* (1982).

De modo geral, aumentando a massa molar de um dos polímeros a separação das fases é obtida com concentrações mais baixas de polímeros, isto é, a binodal sofre um deslocamento no sentido da origem no diagrama de fases e as fases apresentam um maior conteúdo em água. Quanto maior for a diferença entre as massas molares dos polímeros, mais assimétrica será a binodal ALBERTSSON (1986).

O efeito da temperatura é muito diferente de sistema para sistema, dependendo do tipo de polímero usado. Normalmente, sistemas bifásicos aquosos compostos por polímero-sal, como os sistemas PEG-fosfatos, formam mais facilmente duas fases a temperaturas elevadas, ocasionando uma diminuição nas concentrações de polímero e sal necessários à formação de duas fases. Pelo contrário, sistemas polímero-polímero, como o PEG-Dextrana, formam com mais facilidade duas fases a temperaturas mais baixas, o que promove uma aproximação da binodal da origem do diagrama de fases.

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

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

2.12.3 - PROPRIEDADES FÍSICAS DAS FASES

A tensão interfacial entre as fases em SBA é muito pequena, algumas ordens de grandeza inferiores às correspondentes dos sistemas aquoso-orgânico e orgânico-orgânico, sendo, no entanto mais elevada em sistemas PEG-Sal do que em sistemas PEG-Dextrana KULA (1985). Sistemas bifásicos aquosos compostos por Dextrana e Polietileno glicol exibem tensões interfaciais da ordem de 10^{-7} Ncm⁻¹, enquanto sistemas butanol-água e etanol-soluções salinas apresentam valores cerca de mil vezes superiores. Assim, a agitação mecânica da mistura produz bolhas muito pequenas, mesmo sem grande consumo de energia, o que contribui significativamente para que o equilíbrio na formação das fases se estabeleça rapidamente. Esta baixa tensão interfacial dos SBA minimiza também a desnaturação de biomoléculas que condensam na interface, preservando a sua atividade biológica ALBERTSSON (1986). A tensão interfacial aumenta, no entanto com a concentração dos polímeros, ou seja, com o afastamento do ponto crítico DIAMOND & HSU (1992).

Devido ao elevado conteúdo em água nos SBA, a densidade das fases é aproximadamente igual a 1 ALBERTSSON (1986). A diferença de densidade entre as fases nestes sistemas também é pequena, sendo maior para sistemas PEG-fosfatos (0,04-0,1) do que para sistemas PEG-Dextrana (0,02-0,07) KULA (1985).

A viscosidade das fases está diretamente relacionada com o aumento da massa do polímero; geralmente, quanto maior for a massa molar do polímero, mais elevada é a viscosidade das duas fases em equilíbrio ALBERTSSON (1986). Entretanto, o aumento da viscosidade com a massa molar do polímero pode ser minimizado pelo fato de que, quando se usam polímeros de elevada massa molar, são necessárias concentrações mais baixas destes polímeros para a formação das fases. De fato, a viscosidade de uma solução de polímero é extremamente dependente da sua concentração TJERNELD & JOHANSSON (1990); CABRAL & AIRES-BARROS (1993).

A pressão osmótica das fases é pequena devido às elevadas massas molares dos polímeros formadores das fases. Quando as fases estão em equilíbrio, a pressão osmótica é a mesma para

ambas. Em elevadas concentrações dos polímeros, a pressão osmótica é independente da massa molar ALBERTSSON (1986).

O tempo necessário para obter a separação das fases depende da diferença de densidade, das viscosidades e da tensão interfacial das fases. Pontos próximos ao ponto crítico, onde a diferença de densidade entre as fases é muito pequena, e pontos afastados do ponto crítico, onde a viscosidade é elevada devido ao aumento da concentração dos polímeros, requerem tempos de separação longos. O tempo de separação das fases depende também do tempo necessário para que as pequenas bolhas coalesçam, dando origem a bolhas maiores, pelo que a baixa tensão interfacial que caracteriza estes sistemas dificulta a separação das fases. O tempo de separação das fases depende ainda da razão de volumes entre as fases se estas tiverem viscosidades diferentes. Se a fase mais viscosa for a de maior volume, a separação das fases será mais lenta. Os sistemas PEG-Dextrana e PEG-Sal são os que possuem tempos de separação mais curtos (5-30 minutos), enquanto que os sistemas Dextrana-Ficol e Dextrana-Metilcelulose possuem os tempos de separação mais longos (1-6 horas) ALBERTSSON (1986).

As propriedades físicas dos sistemas bifásicos aquosos podem ser alteradas por manipulação de sua concentração e composição dos polímeros e sais. Sendo aquosos, os sistemas podem ser tamponados ou tornados isotônicos. Deste modo, a partição de moléculas e de partículas biológicas pode ser explorada para obtenção de separações que de outro modo seriam difíceis de serem realizadas DIAMOND & HSU (1992).

2.13 - TIPOS DE SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS

Existe uma grande variedade de polímeros hidrofílicos, naturais ou sintéticos, capazes de gerar a separação das fases ao se misturarem com um segundo polímero ou um composto de baixa massa molar, como um sal. Alguns exemplos desses sistemas encontram-se na tabela 5. Entre eles, os mais estudados são PEG/Dextrana e PEG/Fosfato de Potássio. Nos livros de ALBERTSSON (1971, 1986) encontram-se detalhados vários sistemas de duas fases aquosas com os respectivos diagramas de equilíbrio, descrevendo também as suas propriedades físico-químicas.

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

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

Tabela 5 - Exemplos de sistemas de duas fases aquosas ALBERTSSON (1986).

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

2.14 – 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 SBA podem ser empregados na separação de biomoléculas. No entanto, quando se considera o aumento de escala onde critérios como custo,

quantidade de reagentes, tempo de separação das fases e reciclagem dos componentes não podem ser desconsiderados, os números de sistemas capazes de conjugar os requisitos necessários é bastante reduzido.

Estes sistemas parecem exibir características fundamentais, apresentam propriedades físicas favoráveis, como baixa viscosidade em ambas as fases e uma razoável diferença de densidade entre 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).

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

Sistemas bifásicos PEG-Sais apresentam, no entanto, alguns problemas que limitam sua aplicabilidade. Estes sistemas formam-se com elevadas concentrações de sal em ambas as fases, normalmente superiores a 1M, o que pode causar a desnaturação de estruturas biológicas LIN *et al.* (1996); KULA *et al.* (1989). Estes sistemas apresentam ainda o inconveniente de adicionarem elevadas concentrações de fosfatos e sulfatos aos efluentes industriais. Para superar este problema, estudos com o sistema PEG-Citrato têm sido efetuados para a substituição dos sistemas anteriores VENÂNCIO (1996).

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

2.15 - RECUPERAÇÃO DOS PRODUTOS

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

Os primeiros trabalhos encontrados na literatura ALBERTSSON (1986) reportavam que a remoção dos polímeros do sistema era um obstáculo para a aplicação de SBA em larga escala. No

entanto, observa-se, por exemplo, que a ultrafiltração pelo uso de membranas semi-permeáveis com poros seletivos é uma forma rápida e eficiente de se remover os polímeros. Considerando o sistema tradicional PEG-Dextrana, como a massa molar do PEG é bem menor e a massa molar da Dextrana bem maior do que a massa molar da maioria das proteínas, este método torna-se bastante viável, permitindo que a membrana retenha a proteína, promovendo simultaneamente a remoção do PEG. Esta técnica ainda permite ganhos na purificação, já que outras proteínas menores ou partículas contaminantes podem ficar retidas na membrana. Um dos métodos mais comuns baseia-se na transferência da molécula biológica para uma fase com baixa concentração de polímero. Assim, quando a proteína se encontra acumulada na fase PEG, pode-se recorrer à adição de um sal que leve à formação de um novo SBA. Utilizando-se condições apropriadas, a proteína pode ser re-extraída e se concentrar na fase rica em sal HUSTEDT *et al.* (1978); CABRAL & AIRES-BARROS (1993). O sal, por sua vez, poderá ser removido por filtração em membrana utilizando ultrafiltração ou diálise. As proteínas também podem ser removidas por adsorção em trocadores iônicos HUSTEDT *et al.* (1978); ALBERTSSON (1986). Para sistemas PEG-Dextrana, uma vez que ambos os polímeros são neutros, eles não se ligarão aos trocadores e podem ser removidos por lavagem, deixando a proteína ligada à matriz. Para polímeros carregados, bastaria ajustar o pH e a força iônica. O inconveniente é a possibilidade de ocorrer uma alta pressão das gotas quando soluções poliméricas viscosas são processadas em coluna. Outras possibilidades incluem a centrifugação para moléculas ou partículas de elevada massa molar ABERTSSON (1986). ALBERTSSON (1986) também descreve um método específico para a recuperação de moléculas biológicas da fase inferior de sistemas PEG-Dextrana. Por adição de sulfato de amônia ou fosfato de potássio ao sistema PEG-Dextrana, a concentração de PEG na fase inferior vai diminuindo gradualmente até ser completamente excluída desta fase. A partir deste ponto, a molécula biológica pode ser precipitada da fase inferior por adição de sulfato de amônia.

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

Um recente desenvolvimento no campo da separação bifásica aquosa é combinar SBA's com a separação induzida pela temperatura. Vários trabalhos sobre este processo alternativo de purificação estão disponíveis na literatura ALRED *et al.*(1993); FARKAS *et al.*(1996); LI *et al.* (1997); PERSSON *et al.*(1999), SVENSSON *et al.* (1999). São exemplos de polímeros

“termoseparadores” o PEG, Álcool polivinílico e Etilhidroxietilcelulose. A separação de fases por indução pela temperatura torna possível separar o polímero da substância biológica isolada, permitindo recuperar o polímero “termoseparador”. O processo de purificação é composto por dois passos. No primeiro, um sistema bifásico composto pelo polímero “termoseparador” como polímero predominante da fase superior e Dextrana ou Hidroxipropilamido como polímero predominante da fase inferior, é utilizado na partição da biomolécula, de modo que esta se concentre na fase superior. No segundo passo, a fase superior é isolada e o aquecimento acima de uma temperatura crítica, característica para cada sistema, levará a uma nova formação de fases, de modo que o polímero termoseparador fica concentrado na fase inferior, enquanto que a fase superior é uma fase aquosa praticamente livre de polímero, que concentra a molécula biológica, a qual pode ser recuperada por ultrafiltração ou diálise JOHANSSON *et al.* (1996).

2.16 - RECICLAGEM DOS POLÍMEROS

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

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

2.17 - ASPECTOS ECONÔMICOS

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

O conhecimento em sistemas bifásicos aquosos e suas habilidades de partição de moléculas biológicas têm sido estudada por mais de 30 anos. Desde então, o interesse nesta área

mostrou-se reduzido até o fim dos anos 80, quando uma série de pesquisas tomou lugar dentro do mundo científico MATIASSON & LING (1987).

A extração de proteínas em sistemas bifásicos aquosos consiste num processo que requer um custo relativamente alto de reagentes. Uma análise econômica da recuperação e purificação da enzima formato desidrogenase a partir de *Candida biondii* demonstrou que o uso de sistemas bifásicos aquosos possui vantagens econômicas quando comparado a outros métodos. O tempo de operação reduzido, que influi diretamente nos custos de energia, constitui o maior fator do baixo custo operacional da partição com sistemas bifásicos aquosos CABRAL & AIRES-BARROS (1993).

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

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

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

3 – MATERIAIS

3.1 - POLÍMEROS CONSTITUINTES DOS SISTEMAS BIFÁSICOS AQUOSOS

Foi utilizado polietileno glicol (PEG) de peso molecular 4000, por apresentar melhores resultados em trabalhos anteriores.

A goma do cajueiro, de peso molecular 110.000 Da, foi coletada como exsudado natural de árvores de *Anacardium occidentale* L. (produtoras do caju amarelo) de diferentes localidades do estado de Pernambuco, no período de dezembro a março, a qual foi cedida pela Embrapa.

3.2 - PROTEÍNA

Será estudada a proteína existente no abacaxi. Bromelina é o nome genérico dado ao conjunto de enzimas proteolíticas encontradas nos vegetais da família Bromeliaceae, da qual o abacaxi é o mais conhecido. As enzimas proteolíticas encontradas nos talos recebem o nome de bromelina do talo e tem o número sistemático EC 3.4.22.4, e as encontradas no fruto recebem o nome de bromelina do fruto ou ainda, bromelina e tem o número sistemático EC 3.4.22.5. A bromelina é uma glicoproteína, tendo um resíduo oligossacarídeo por molécula, que está covalentemente ligado à cadeia peptídica. A bromelina do talo é uma enzima sulfídrica, e este grupamento é essencial para a sua atividade proteolítica. A bromelina do fruto é uma proteína ácida, e seu ponto Isoelétrico foi determinado por focalização isoelétrica com pH 4,6 e mudanças conformacionais irreversíveis ocorrem em valores de pH maiores que 10,3 MURACCHI (1976).

3.3 - OUTROS REAGENTES

Os principais reagentes utilizados ao longo do trabalho experimental estão apresentados na TABELA 6.

TABELA 6 - Soluções e reagentes utilizados ao longo do trabalho experimental

Reagente	Pureza	Fornecedor
Dihidrogenofosfato de potássio	99%	Nuclear
Hidrogenofosfato de potássio	99%	Nuclear
Comassie Blue G- 250	----	Vetec
Etanol	98%	Merck
Hidróxido de sódio	97%	Synth

Continuação da Tabela 6.

Acido sulfúrico	95-97%	Merck
Acido Tricloroacético	97%	Sigma
Acido ortofosfórico	85%	Synth
Caseína	Pura	Synth
Tirosina	97%	Sigma
Tartarato duplo de sódio e de potássio	99%	Vetec

3.4 – EQUIPAMENTO EXPERIMENTAL

3.4.1 - INTRODUÇÃO

Neste capítulo são apresentados detalhes da montagem da micro-coluna agitada por campânulas pulsantes usada neste trabalho e os procedimentos adotados para a obtenção dos resultados experimentais. Nos experimentos foram usados sistemas de duas fases aquosas formados por PEG (Polietileno Glicol), policaju (exsudado do cajueiro) e tampão fosfato de potássio em pH 6,0, 7,0 e 8,0, para a extração da proteína.

3.4.2 - EQUIPAMENTOS

- Agitador de toque modelo MA 162, MARCONI, Brasil.
- Agitador magnético com aquecimento modelo 119, Nova Ética, Brasil.
- Balança analítica modelo AL200, MARTE, BRASIL.
- Centrífuga de bancada modelo Z252MR, HERMLE.
- Espectrofotômetro modelo GBC911, MICRONAL, Brasil.
- Bombas peristálticas de um canal ATTA, Japão.
- Micropipetas automáticas finnpipette, FRANÇA.
- Viscosímetro digital BROOKFIELD DV-II.
- Banho termostatizado modelo 100, FANEM, Brasil.

3.4.3 - CAMPÂNULAS

O uso de campânulas em colunas pulsadas é proposto visando obter-se uma agitação eficiente, mas suave, para aplicação em processos de separação de compostos lábeis, como as proteínas. Sendo a agitação suave, pretende-se evitar a desnaturação das biomoléculas, que ocorre

quando são introduzidas ao sistema excessiva energia mecânica e agitação extremamente vigorosa.

Além disso, as campânulas aumentam o tempo de contato entre as fases na coluna e fazem com que ocorra uma dispersão uniforme das gotas, o que favorece a transferência de massa. Com o sistema de agitação composto por campânulas pulsantes, as fases que entram na coluna comportam-se da maneira mostrada na figura 5. Como pode ser visto, a fase leve entra na microcoluna pelo fundo e fica retida na campânula. A peneira, da qual a campânula é constituída, não deixa a maior parte da fase leve passar espontaneamente. A campânula retém a fase leve por um tempo maior do que outros dispositivos comumente usados para promover a agitação. Deste modo, ocorre um aumento do tempo de contato entre as fases.

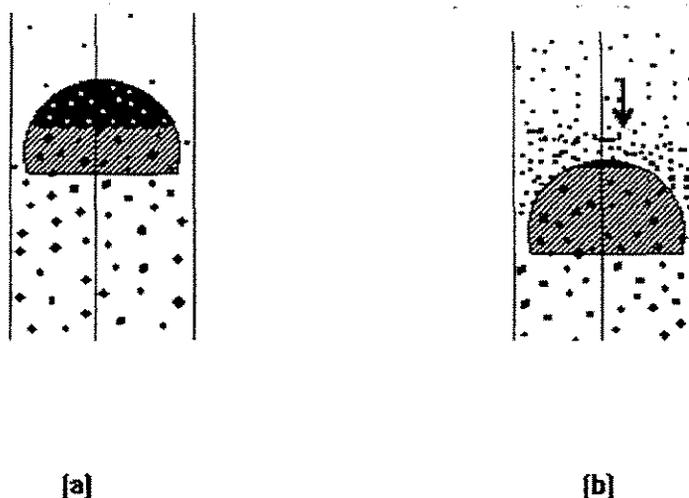


Figura 5 – Agitação por meio de campânulas pulsantes numa coluna de extração líquido-líquido pulsada. (a) campânula parada durante o intervalo entre os pulsos. (b) movimento descendente durante o pulso.

Durante o pulso, quando a campânula desce, o líquido mais leve (de menor densidade) que fica concentrado no interior da campânula, é forçado a passar pelos furos da peneira. A fase leve é “quebrada” em gotas bem pequenas. Uma importante característica da agitação obtida por meio do uso de campânulas pulsantes é a formação de uma dispersão, bastante uniforme e de gotas pequenas, da fase leve na fase contínua, como pode ser visto na figura 5. Essas características são favoráveis à transferência de massa no sistema. Quando a campânula sobe, o

movimento ascendente faz com que as fases misturem-se ainda mais. As campânulas devem ser constituídas de material inerte que não reaja com as soluções usadas na extração.

3.4.4 - DESCRIÇÃO DO EQUIPAMENTO

Um esquema da micro-coluna de campânulas é mostrado na figura 6. Esta micro-coluna é constituída de um tubo de vidro de 190 mm de altura; 28,4 mm de diâmetro externo e 25,4 mm de diâmetro interno.

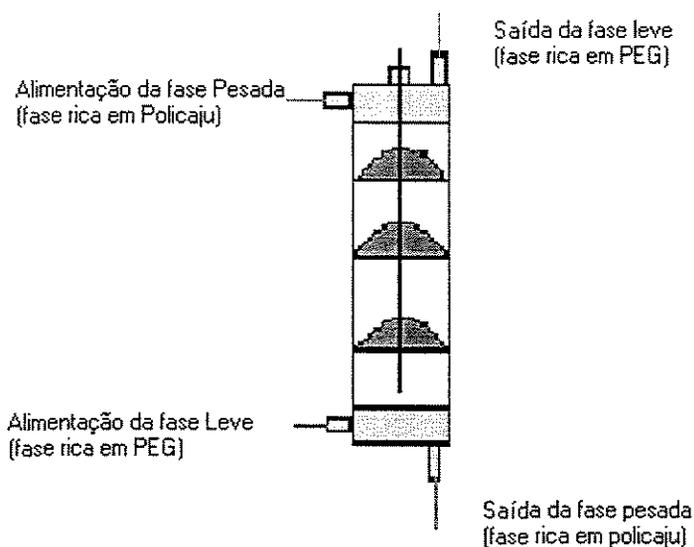


Figura 6 – Esquema da micro-coluna de campânulas pulsantes.

No centro desta micro-coluna, está localizada uma haste de aço inox, na qual estão soldadas três campânulas, distanciadas 40 mm uma da outra. O diâmetro da base da campânula é 24,9 mm. A peneira de aço de inox, da qual a campânula é constituída, tem MESH 24 e, portanto, possui uma área livre para escoamento de 38%. Na figura 7, é mostrada a fotografia de uma haste na qual estão soldadas duas campânulas. Durante um pulso, a campânula movimenta-se aproximadamente 28 mm para baixo e 28 mm para cima, o que faz com que a amplitude do pulso seja de aproximadamente 56 mm.



Figura 7 – Campânulas soldadas à haste, formando o dispositivo de agitação da micro-coluna.

Os bocais de alimentação e saída das fases são de aço inox e possuem um diâmetro interno de 36,5 mm e 68,5 mm de diâmetro externo. Na figura 8, é mostrada uma fotografia da micro-coluna utilizada neste trabalho.

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

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

Os tubos para conduzir as entradas e saídas das fases são de viton, que é um material resistente à ação da maioria dos solventes. O viton foi escolhido para permitir que outros sistemas sejam usados, já que os sistemas de duas fases aquosas não são corrosivos. A temperatura dos experimentos foi a ambiente.

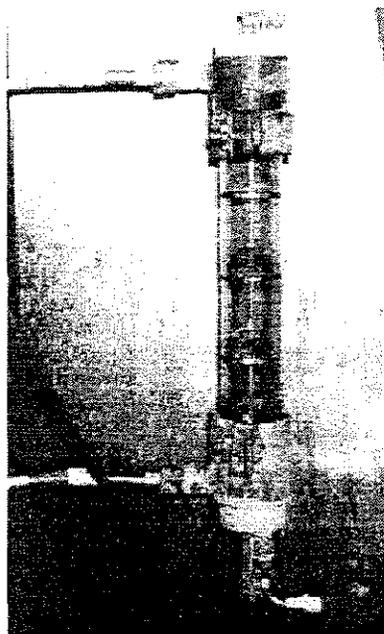


Figura 8 – Micro coluna de campânulas pulsantes.

Na figura 9, encontra-se uma figura da montagem experimental, composta por duas bombas peristálticas, a micro-coluna, o controlador de pulsos e o dispositivo que fornece os pulsos ao sistema.

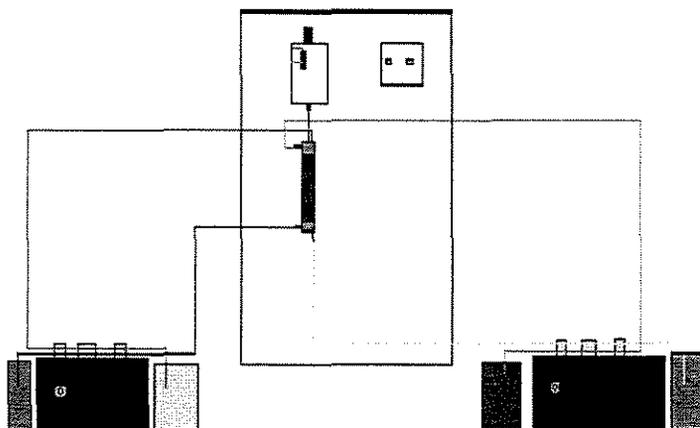


Figura 9 – Montagem do Sistema de Extração líquido-líquido.

3.5 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL – OPERAÇÃO DA MICRO-COLUNA

Para a operação da micro-coluna, com a finalidade de obter-se dados relativos à recuperação da proteína, foi usado o procedimento descrito a seguir:

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

Optou-se por este modo de controle do nível porque, como pode ser visto nas figuras 8 e 9, para fixar a coluna ao suporte e para construir a parte superior da coluna por onde o sistema de pulsação é introduzido e onde está o bocal de saída, usou-se aço-inox, o que impede a visualização das fases no topo e no fundo da coluna. Assim, não é possível que o controle do nível de líquido na coluna seja feito por meio da visualização das fases no interior do equipamento.

Após este procedimento, inicia-se a contagem do tempo de operação do equipamento e deixando a micro-coluna operando por sessenta minutos. O tempo de operação da micro-coluna foi escolhido baseado em trabalhos anteriores, embora tenha sido observado que, algumas vezes, o estado estacionário foi atingido num tempo menor (aproximadamente quarenta minutos), determinado através do tempo de residência.

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

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

4 – MÉTODOS

4.1 – DETERMINAÇÃO DOS TEMPOS DE RESIDÊNCIA PARA OPERAÇÃO DA MICRO COLUNA

Os tempos de residência foram calculados utilizando o volume da coluna pela vazão total de alimentação.

$$\tau = \frac{\text{Volume}_{\text{coluna}}}{\text{Vazão Total Alimentação}} \quad (1)$$

Onde o volume da micro coluna é de 280mL.

Tempo de residência para a vazão total de 7,06mL/min

$$\tau = \frac{280\text{mL}}{7,06\text{mL}/\text{min}} = 39,66 \text{ min} \quad (2)$$

Tempo de residência para a vazão total de 9,00 mL/min

$$\tau = \frac{280\text{mL}}{9,00\text{mL}/\text{min}} = 31,11 \text{ min} \quad (3)$$

Tempo de residência para a vazão total de 11,12 mL/min

$$\tau = \frac{280\text{mL}}{11,12\text{mL}/\text{min}} = 25,18 \text{ min} \quad (4)$$

4.2 - ISOLAMENTO DO POLISSACARÍDEO DO CAJUEIRO (POLICAJU)

A goma bruta (isenta de cascas e folhas) foi submetida ao método de RINAUDO & MILLAS (1991) modificado: a goma foi triturada e dissolvida em solução aquosa a 20%, sendo filtrada em tela de serigrafia e precipitada com etanol comercial (3x volume), de modo a separar o polissacarídeo dos monos e oligopolissacarídeos, que permaneceram em solução. O precipitado assim obtido foi deixado em repouso durante a noite a 4°C e novamente filtrado e lavado com etanol concentrado. O precipitado assim obtido foi submetido a secagem em estufa a 35°C ou a temperatura ambiente. O álcool utilizado foi recuperado e reaproveitado para nova precipitação da goma. O processo permitiu um rendimento de 85-90% em polissacarídeo (Policaju). O processo de purificação está esquematizado na FIGURA 10.

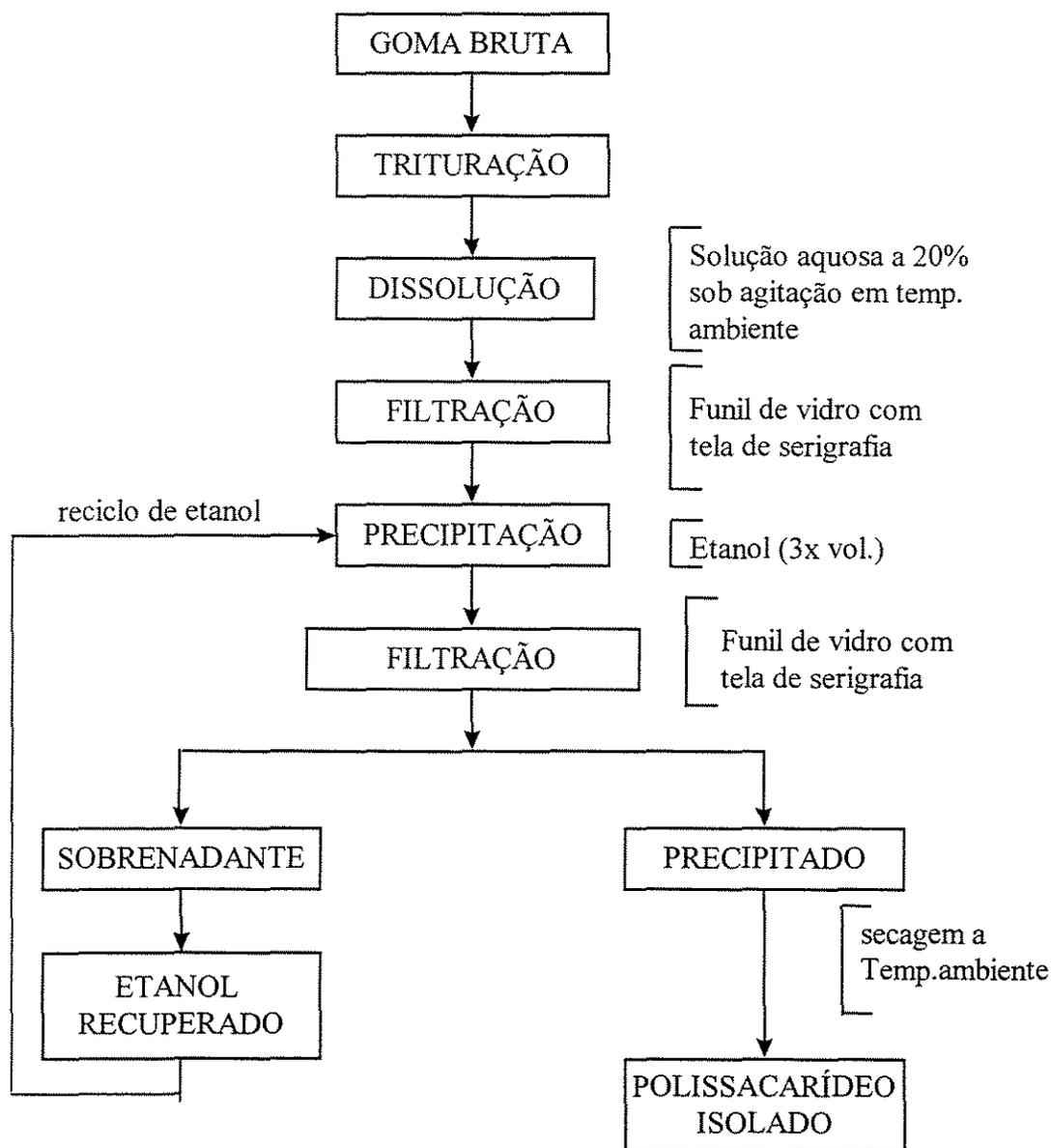
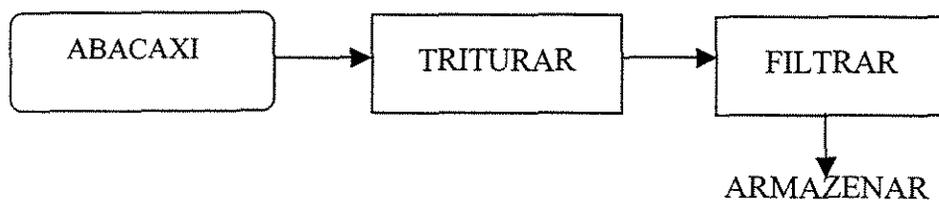


FIGURA 10 - Fluxograma de isolamento do polissacarídeo do cajueiro (Policaju).

4.3 – PREPARO da AMOSTRA

As amostras foram preparadas com abacaxi hawai, triturando a polpa do mesmo e filtrando em seguida para eliminar as fibras, armazenando à baixa temperatura. Para realizar os ensaios as amostras eram retiradas no dia anterior para que fossem descongeladas, e no dia seguinte utilizada nos ensaios.



4.4 – DADOS EXPERIMENTAIS

Para a realização deste trabalho foi utilizados um sistema com três níveis e três variáveis para avaliar a influência das variáveis no índice de recuperação da proteína. Usando um fatorial 3^3 , compreendendo 27 ensaios que foram feitos em duplicata.

A seguir, são apresentadas as variáveis estudadas neste trabalho: linhas de amarração, pH e vazão de alimentação.

Variável	Nível inferior (%p/p)	Nível médio (%p/p)	Nível superior (%p/p)
Linha de amarração	18%Goma / 9%PEG	20%Goma / 11%PEG	22%Goma / 13%PEG
pH	6,0	7,0	8,0
Vazão Total de alimentação (mL/min)	7,06	9,00	11,12

Os níveis referentes aos pHs: O ponto isoelétrico da Bromelina é 4,6 e por isso deve-se trabalhar com valores superiores a esse ponto e também se deve levar em conta que em 10,3 ocorre mudanças irreversíveis na estrutura da bromelina, por isso a escolha do pH 6,0 e 8,0 com um ponto intermediário 7,0, que são todos valores de pHs neutros que evita a desnaturação da proteína. Foi verificado por ROWAN *et al.* (1990) que a bromelina do fruto tem uma alta 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 em pH 7,0 e temperatura 60°C.

Vazão de Alimentação: os pontos 3,53 mL/min e 5,56 mL/min, são os valores mínimos e máximos que se conseguia trabalhar nas bombas encontradas em nosso laboratório, e conseqüentemente procurou-se trabalhar com uma vazão intermediária que foi 4,50 mL/min. Obs. Os valores apresentados na tabela acima refere-se a vazão total de alimentação como tínhamos duas entradas soma-se as vazões totalizando os valores encontrados na tabela.

Linha Amarração: Usou-se os valores apresentados por SARUBBO (2000) que havia realizado sua determinação e é a região que forma duas fases aquosas, que é o interesse em se trabalhar.

Para facilitar o entendimento, os níveis estão relacionados com letras e números, para isso temos:

Para linha de amarração:

18%Goma / 9%PEG – A,

20%Goma / 11%PEG – B,

22%Goma / 13%PEG – C.

Para o pH:

pH 6,0 – 1,

pH 7,0 – 2,

pH 8,0 – 3.

Para a vazão de alimentação:

Vazão 7,06 (mL/min) – X,

Vazão 9,00 (ml/min) – Y,

Vazão 11,12 (mL/min) – Z.

Os testes realizados estão distribuídos de acordo com a Tabela 7.

Tabela 7 – Modelo de Distribuição dos ensaios, usando fatorial 3³.

Ensaio	Linha de Amarração	pH	Vazão de alimentação
1	A	1	X
2	A	1	Y
3	A	1	Z
4	A	2	X
5	A	2	Y
6	A	2	Z
7	A	3	X
8	A	3	Y
9	A	3	Z
10	B	1	X
11	B	1	Y
12	B	1	Z
13	B	2	X
14	B	2	Y
15	B	2	Z

Continuação da Tabela 7

Ensaio	Linha de Amarração	pH	Vazão de alimentação
16	B	3	X
17	B	3	Y
18	B	3	Z
19	C	1	X
20	C	1	Y
21	C	1	Z
22	C	2	X
23	C	2	Y
24	C	2	Z
25	C	3	X
26	C	3	Y
27	C	3	Z

4.4 - PREPARAÇÃO DOS SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS

Os sistemas bifásicos aquosos Policaju / PEG 4000 foram preparados por pesagem das quantidades apropriadas de reagentes para obter a composição desejada da fase inferior e superior das linhas de amarração determinadas por SARUBBO (2000) em pH 6,0, 7,0 e 8,0 e solução tampão 15mM obedecendo a relação entre fosfato monobásico e dibásico, à temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$). Neste trabalho a extração em contínuo foi feita após a diluição 1:20 das composições das fases inferior e superior determinadas por Sarubbo.

4.4.1- EXTRAÇÃO CONTÍNUA DE BROMELINA EM SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS

Os sistemas de duas fases aquosas utilizadas para a extração contínua em colunas de extração líquido-líquido foram preparados da seguinte maneira: quantidades pré-determinadas de Policaju, PEG e solução tampão foram pesadas, misturados e agitados em um agitador magnético por cerca de 2 horas, para que o sistema atinja o equilíbrio e os componentes sejam totalmente dissolvidos. O volume total das fases preparado era calculado de acordo com a vazão escolhida para o experimento, permitindo a operação da micro-coluna por sessenta minutos e o

preenchimento da micro-coluna com a fase pesada. A razão de sais mono e dibásico foram determinadas de modo a obter-se pH 6,0, pH 7,0 e pH 8,0.

4.4.2 – DETERMINAÇÃO DA PROTEÍNA TOTAL

4.4.2.1 - PREPARAÇÃO DO REAGENTE BRADFORD

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

4.4.2.2 - DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO PROTÉICO

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

4.4.2.3 - CÁLCULO DO ÍNDICE DE RECUPERAÇÃO DO SOLUTO

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

$$I_R = \frac{c_f - c_r}{c_f} \quad (5 a)$$

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

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

$$I_r = \frac{C_f - C_r}{C_f} \quad (5.b)$$

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

4.4.2.4 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

Para a determinação da atividade proteolítica da bromelina, foi usado o mesmo método para a determinação da atividade em células de *S.cerevisiae* rompidas realizada conforme modificações das metodologias propostas por KUNITZ (1947) e WALTER (1984) e está descrita a seguir:

4.4.4.2.1 - PROCEDIMENTO

Pipetar em tubos de centrifuga separados: 2,5 mL de solução tamponada de caseína, nos tubos teste (T) e branco do substrato (B3), 2,5 mL de solução do ácido clorídrico 0,05M no tubo que será o branco da amostra (B1) e no tubo que será o branco do aparelho (B2), fazer isso para todas as amostras coletadas tanto superior como inferior.

Deixar em banho a 37°C por 3 a 5 minutos;

Adicionar 0,2 mL da amostra aos tubos T e B1, 0,2 mL de HCL 0,05M aos demais;

Misturar e deixar em incubando a 37°C por 10 minutos;

Ao fim do da incubação adicionar 5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,3M em todos os tubos coletados;

Deixar em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente;

Centrifugar por 20 minutos a 4.000g;

Ler a variação da absorbância do sobrenadante à 280nm;

A medida da atividade é feita através $A_T - A_{B1} - A_{B3}$, encontra-se o valor final da absorbância, e com o auxilio da curva de calibração encontra-se a concentração de tirosina, produzida pela ação da protease presente em 0,2 mL de amostra em 10 minutos a 37°C. e o resultado final, em atividade enzimática, é dado por:

Atividade = $0,02.C_{tir}$ ($\mu\text{mol}.\text{min}^{-1}$), ou Atividade= $0,002.C_{tir}$ (U/40g de amostra)

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

No início deste trabalho, tivemos um contratempo na obtenção da goma do polissacarídeo do cajueiro (POLICAJU), que era um dos componentes necessário para a realização dos testes de extração da proteína. Como a produção da goma é influenciada por estações climáticas favoráveis, e nesse período ocorreu muita chuva no nordeste brasileiro, dificultando a obtenção dessa goma para desenvolver o trabalho proposto inicialmente, fez-se necessário testar outras gomas para verificar se as mesmas formavam duas fases aquosas com polietileno glicol. Foram realizados testes com as seguintes gomas: Goma Guar, Carrageana e Xantana, mas não obtivemos sucesso, pois não conseguimos formar duas fases aquosas com essas gomas. Enquanto íamos elaborando testes com as gomas mencionadas anteriormente, tentávamos obter a goma de POLICAJU, pois se mostrava muito atrativa o seu uso, pois já havia sido feita análise da mesma por SARUBBO (2000), que obteve resultados significativos. Depois de algumas tentativas, tivemos sucesso junto à Embrapa de Pernambuco, que nos forneceu 500 gramas de goma para iniciarmos nosso trabalho de doutorado.

Procurou-se estudar a aplicação de um polímero regional de baixo custo a técnicas de separação em duas fases aquosas, possibilitando a redução dos custos no desenvolvimento de sistemas bifásicos aquosos como técnica alternativa aos processos tradicionais de recuperação. Pretendeu-se mostrar que os dados compilados ao longo das últimas três décadas para sistemas bifásicos aquosos formados por polímeros como a Dextrana podem ser transpostos para sistemas formados por polímeros alternativos, e, para isso, utilizaram-se os dados para as linhas de amarração do Policaju – PEG 4000 para os pHs; 6,0, 7,0 e 8,0 obtidos por SARUBBO (2000) na recuperação da Albumina do soro bovino para a determinação de outra proteína, que, nesse caso, será a Bromelina do caldo do abacaxi Hawai.

No estudo da extração contínua, avaliou-se o Índice de Recuperação do Sólido (porcentagem de proteína extraída).

5.1 - CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS DE TRABALHO

5.1.1 - COMPOSIÇÃO DOS SISTEMAS BIFÁSICOS AQUOSOS

Os sistemas bifásicos utilizados para a extração em contínuo neste trabalho foram determinados por SARUBBO (2000) entre Policaju – PEG 4000 à temperatura de 25°C para diferentes valores de pH's, e estão apresentados a seguir.

TABELA 8- Composição das fases do sistema PEG 4000-Policaju a 25°C ± 2°C, pH 6,0.

PEG 4000	Composição Total Do Sistema (% p/p)			Composição da Fase Superior (%p/p)			Composição da Fase Inferior (%p/p)		
	Goma	PEG	H ₂ O	Goma	PEG	H ₂ O	Goma	PEG	H ₂ O
Linha de Amarração									
A	18	9	73	5,52	13,54	80,94	36,35	2,37	61,28
B	20	11	69	1,66	19,23	79,11	43,22	0,63	56,15
C	22	13	65	0,59	20,24	79,17	47,84	1,68	50,48

TABELA 9- Composição das fases do sistema PEG 4000-Policaju a 25°C ± 2°C, pH 7,0.

PEG 4000	Composição Total Do Sistema (% p/p)			Composição da Fase Superior (%p/p)			Composição Da Fase Inferior (%p/p)		
	Goma	PEG	H ₂ O	Goma	PEG	H ₂ O	Goma	PEG	H ₂ O
Linha de Amarração									
A	18	9	73	10,93	10,25	78,82	31,47	4,64	63,89
B	20	11	69	4,12	16,58	79,30	48,43	0,98	50,59
C	22	13	65	1,29	21,32	77,39	50,27	1,54	48,19

TABELA 10- Composição das fases do sistema PEG 4000-Policaju a 25°C ± 2°C, pH 8,0.

PEG 4000	Composição Total do Sistema (% p/p)			Composição da Fase Superior (%p/p)			Composição da Fase Inferior (%p/p)		
	Goma	PEG	H ₂ O	Goma	PEG	H ₂ O	Goma	PEG	H ₂ O
Linha de Amarração									
A	18	9	73	11,75	11,56	76,69	34,49	2,36	63,15
B	20	11	69	4,00	17,59	78,41	42,55	1,74	55,51
C	22	13	65	2,03	19,14	78,83	49,71	4,37	45,92

5.2 – EXTRAÇÃO CONTÍNUA UTILIZANDO MICRO COLUNA DE CAMPÂNULAS PULSANTES

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

Os experimentos foram realizados usando um sistema de três níveis e três variáveis, ou seja, um fatorial 3^3 , compreendendo 27 ensaios no total. Trabalhou-se com frequência de pulsação constante 1:2 ou um pulso/2s, 33 pulsos/min. os resultados do índice de recuperação está distribuído de acordo com a tabela 11.

Tabela 11– Resultados do Índice de Recuperação da proteína, através da Distribuição dos ensaios segundo planejamento fatorial 3^3 .

Ensaio	Linha de Amarração	pH	Vazão de Alimentação	% Índice Recuperação Exp. 1	% Índice Recuperação Exp. 2	% Índice Recuperação Médio
1	A	1	X	51,84	52,94	52,39 ± 0,55
2	A	1	Y	52,62	53,46	53,04 ± 0,42
3	A	1	Z	53,75	54,61	54,18 ± 0,43
4	A	2	X	54,32	55,10	54,71 ± 0,39
5	A	2	Y	55,04	55,77	55,41 ± 0,36
6	A	2	Z	56,00	56,88	56,44 ± 0,44
7	A	3	X	54,66	55,64	55,15 ± 0,49
8	A	3	Y	56,21	57,13	56,67 ± 0,46
9	A	3	Z	57,88	58,74	58,31 ± 0,43
10	B	1	X	54,36	55,40	54,88 ± 0,52
11	B	1	Y	55,64	56,58	56,11 ± 0,47
12	B	1	Z	57,82	58,82	58,32 ± 0,50
13	B	2	X	59,41	60,31	59,86 ± 0,45

Continuação da Tabela 11.

Ensaio	Linha de Amarração	pH	Vazão de Alimentação	% Índice Recuperação Exp. 1	% Índice Recuperação Exp. 2	% Índice Recuperação Médio
14	B	2	Y	59,52	60,52	60,02 ± 0,50
15	B	2	Z	59,72	60,74	60,23 ± 0,51
16	B	3	X	60,03	61,01	60,52 ± 0,49
17	B	3	Y	62,35	63,29	62,82 ± 0,47
18	B	3	Z	63,30	64,36	63,83 ± 0,53
19	C	1	X	56,62	57,80	57,21 ± 0,59
20	C	1	Y	58,84	59,88	59,36 ± 0,52
21	C	1	Z	62,60	63,70	63,15 ± 0,55
22	C	2	X	61,63	62,83	62,23 ± 0,60
23	C	2	Y	64,20	65,32	64,76 ± 0,56
24	C	2	Z	64,54	65,72	65,13 ± 0,59
25	C	3	X	64,32	65,46	64,89 ± 0,57
26	C	3	Y	65,44	66,60	66,02 ± 0,58
27	C	3	Z	68,20	69,44	68,82 ± 0,62

5.3- EFEITO DA COMPOSIÇÃO DO SISTEMA NO ÍNDICE DE RECUPERAÇÃO

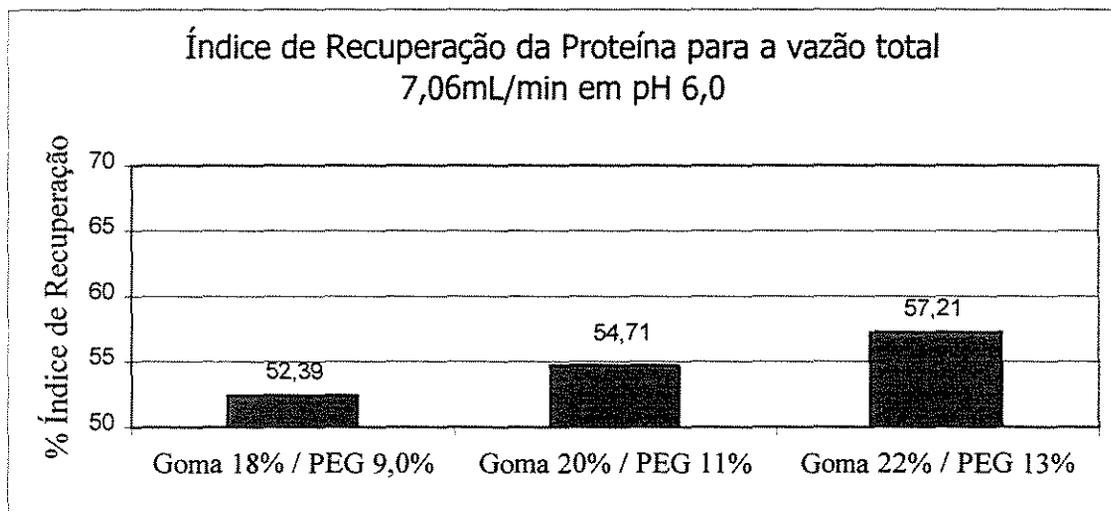


FIGURA 11 - Influência do comprimento da linha de amarração no índice de recuperação da proteína para o sistema PEG4000-Policaju em pH 6,0 a vazão 7,06 mL/min.

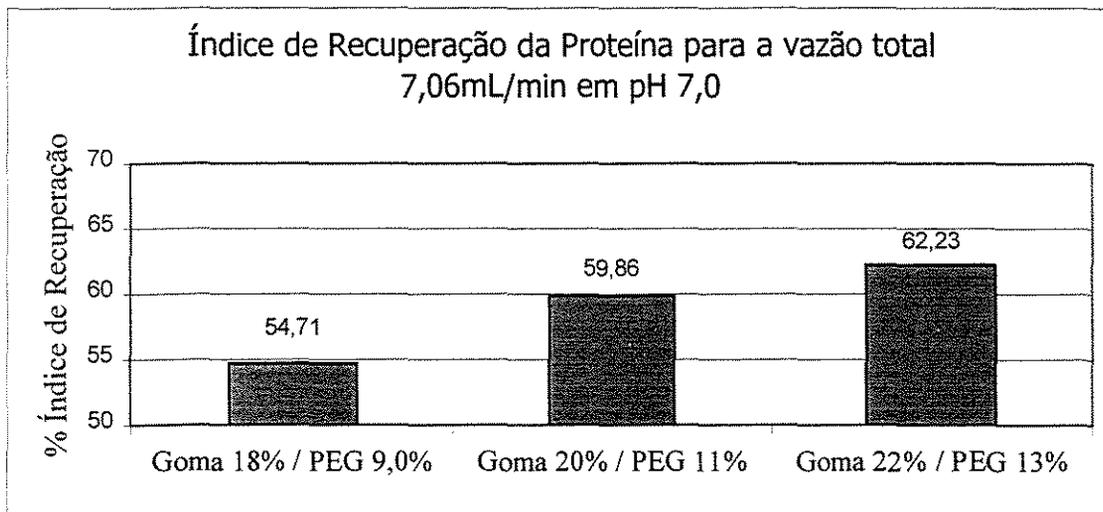


FIGURA 12 - Influência do comprimento da linha de amarração no índice de recuperação da proteína para o sistema PEG4000-Policaju em pH 7,0 a vazão 7,06 mL/min.

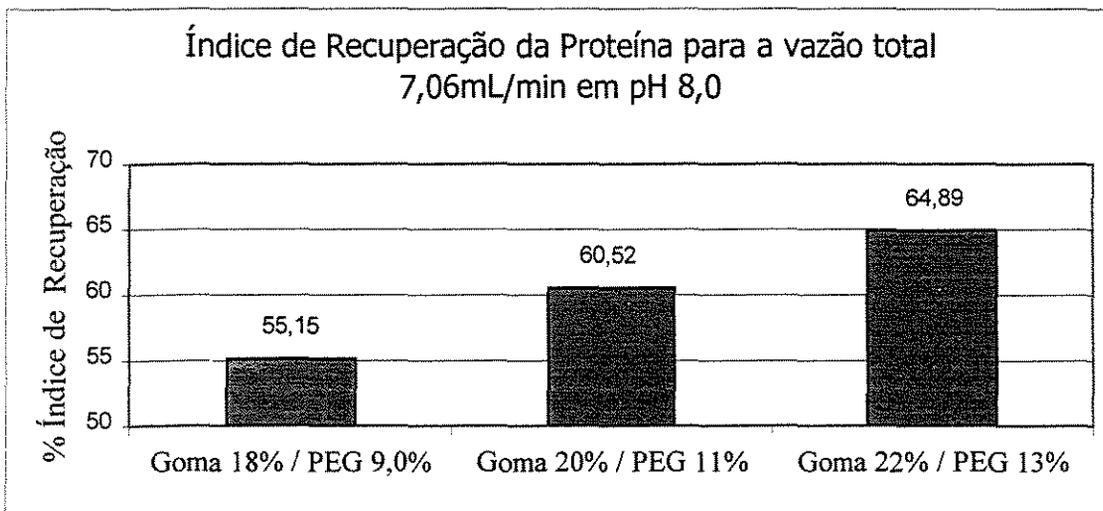


FIGURA 13 - Influência do comprimento da linha de amarração no índice de recuperação da proteína para o sistema PEG4000-Policaju em pH 8,0 a vazão 7,06 mL/min.

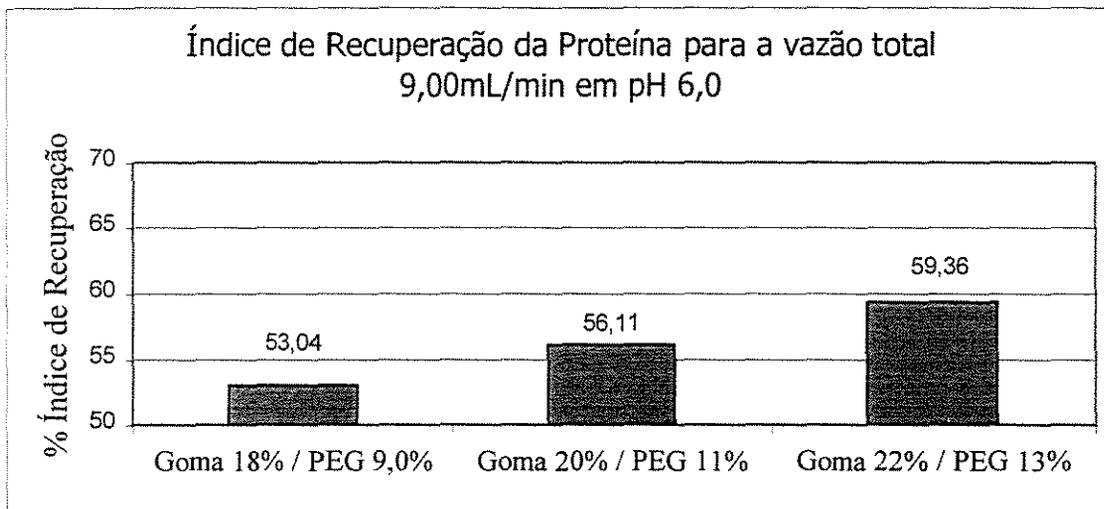


FIGURA 14 - Influência do comprimento da linha de amarração no índice de recuperação da proteína para o sistema PEG4000-Policaju em pH 6,0 a vazão 9,00 mL/min.

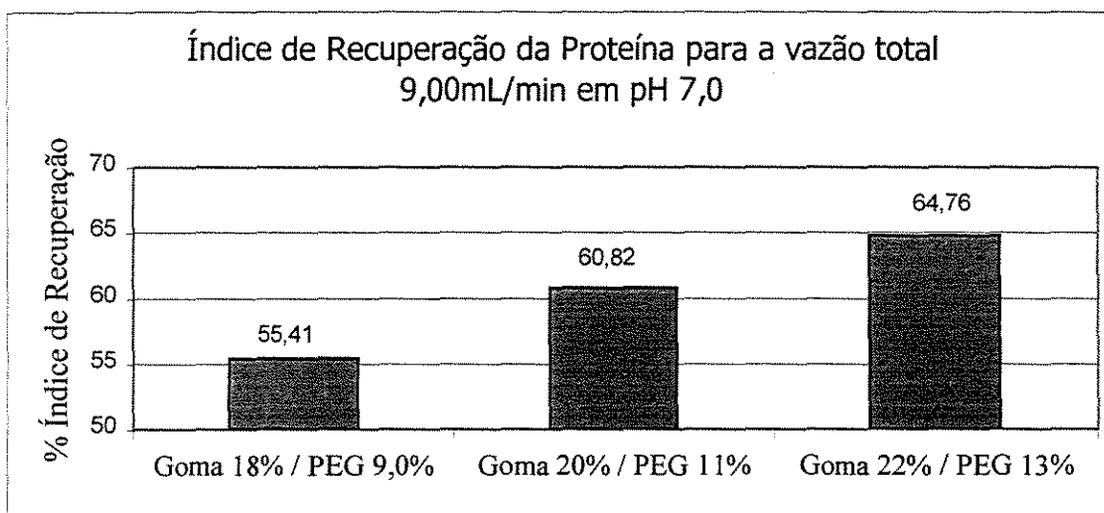


FIGURA 15 - Influência do comprimento da linha de amarração no índice de recuperação da proteína para o sistema PEG4000-Policaju em pH 7,0 a vazão 9,00 mL/min.

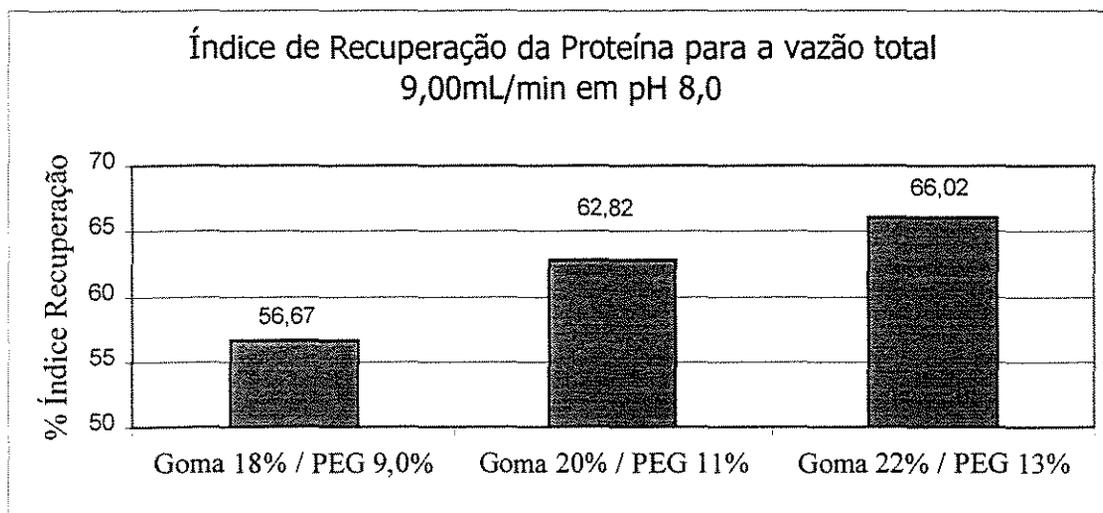


FIGURA 16 - Influência do comprimento da linha de amarração no índice de recuperação da proteína para o sistema PEG4000-Policaju em pH 8,0 a vazão 9,00 mL/min.

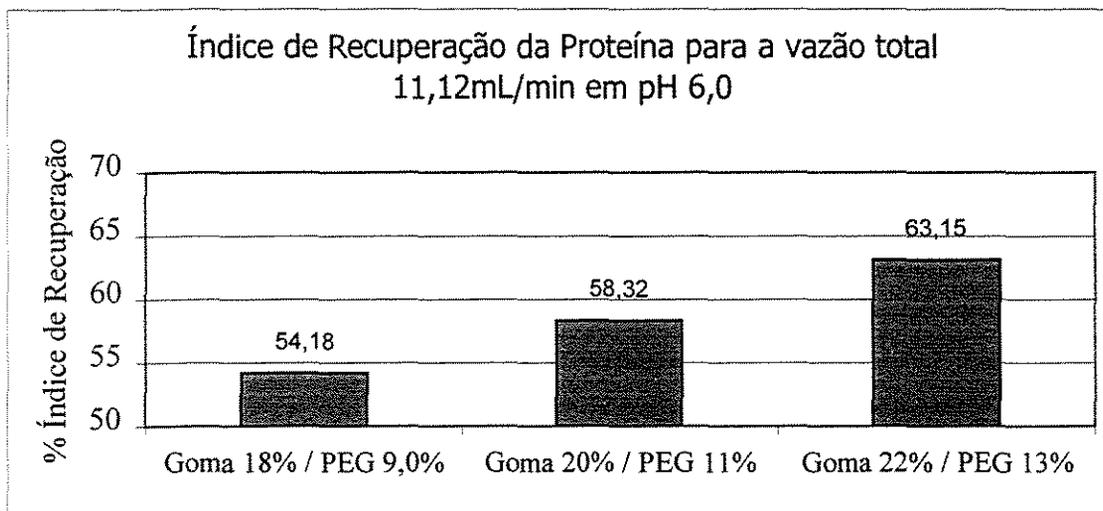


FIGURA 17 - Influência do comprimento da linha de amarração no índice de recuperação da proteína para o sistema PEG4000-Policaju em pH 6,0 a vazão 11,12 mL/min.

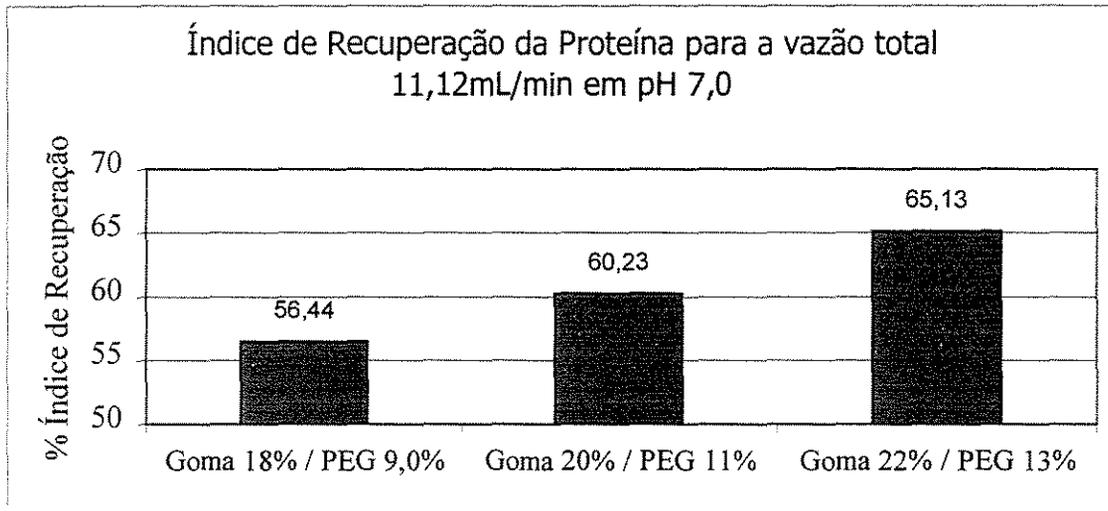


FIGURA 18 - Influência do comprimento da linha de amarração no índice de recuperação da proteína para o sistema PEG4000-Policaju em pH 7,0 a vazão 11,12 mL/min.

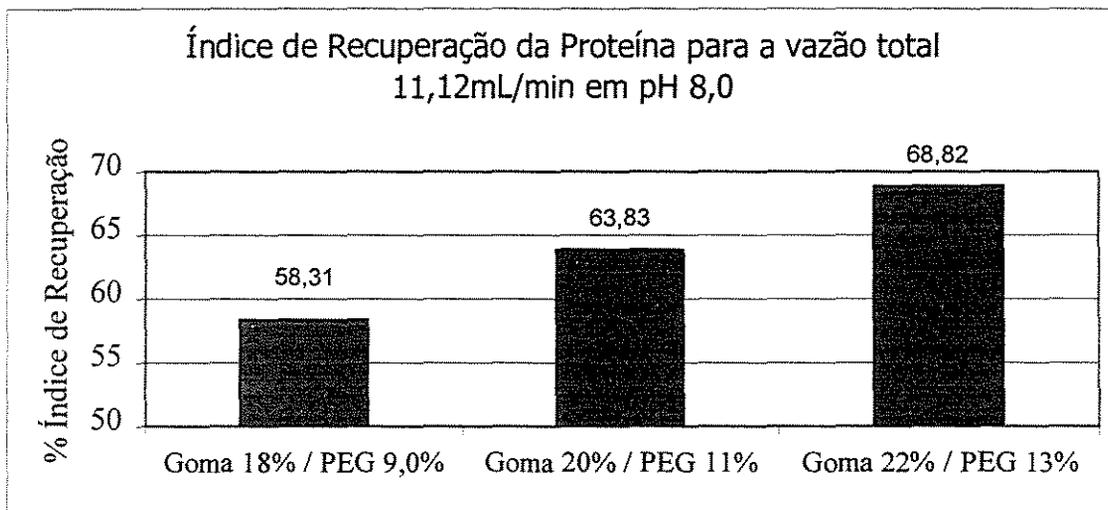


FIGURA 19 - Influência do comprimento da linha de amarração no índice de recuperação da proteína para o sistema PEG4000-Policaju em pH 8,0 a vazão 11,12 mL/min.

Analisando as figuras 11 a 19, observa-se, em todas elas, que a porcentagem do índice de recuperação é maior à medida que se aumenta o pH, vazão total de alimentação e concentração do

Policaju nas linhas de amarração. Foi observada a recuperação de 68,82% para a linha de amarração 22%Goma / 13%PEG na vazão total de alimentação 11,12 mL/min em pH 8,0. Resultado semelhante obteve BERTEVELLO (2001) trabalhando com sistema PEG1500 e sal, alcançando 70% de recuperação de proteína total para a bromelina do caldo do abacaxi; verificando que o aumento da linha de amarração aliada ao aumento do pH denota um maior grau de recuperação.

No grupo de trabalho de Bertevello (2003) uma das alunas fez a comparação dos sistemas PEG/SAL e PEG/POLICAJU em extração descontínua para a proteína bromelina, determinando o coeficiente de partição, e observou que, no sistema polietileno glicol e sal, grande parte dos valores dos coeficientes de partição são próximos de 1, enquanto para o sistema polietileno glicol e polissacarídeo do cajueiro (POLICAJU), esses valores são mais distantes, apresentam, portanto, uma melhor separação.

É importante observar que, para a formação de fases em sistemas PEG/POLICAJU, a composição da goma deve ser sempre maior que composição da fase PEG, pois caso contrário não há formação de fases. Em sistemas PEG/Sal não há este problema, podendo se usar qualquer concentração, tanto de PEG como de Sal, para formar fases.

Michelle Chen (FEI/SP), em sua tese de mestrado, fez comparações com extração descontínua para os sistemas PEG/SAL e PEG/POLICAJU, analisando o coeficiente de partição da proteína bromelina do caldo do abacaxi. Obteve, para o sistema PEG/SAL, um melhor resultado quando a concentração das fases do sistema é 15%PEG/15%SAL para um pH 7,0 e a massa molar do polímero 4000. Já para o sistema PEG/POLICAJU, o melhor resultado para o coeficiente de partição é quando a concentração da fase goma é maior que o dobro da fase PEG, ou seja, 23% Goma/11%PEG, para a massa molar do PEG 4000 em pH 8,0, resultado semelhante ao obtido neste trabalho para a recuperação da proteína bromelina descrito anteriormente.

SARUBBO (2000), utilizando uma coluna de extração do tipo PRDC, verificou que o índice de recuperação da albumina do soro bovino para os dois comprimentos de linhas de amarração utilizados em seu trabalho (18%Goma / 9% PEG4000 e 20% Goma / 11% PEG4000) em pH 6,0 foi semelhantes a 96% de recuperação.

5.4 - EFEITO DA VAZÃO TOTAL DE ALIMENTAÇÃO NO ÍNDICE DE RECUPERAÇÃO

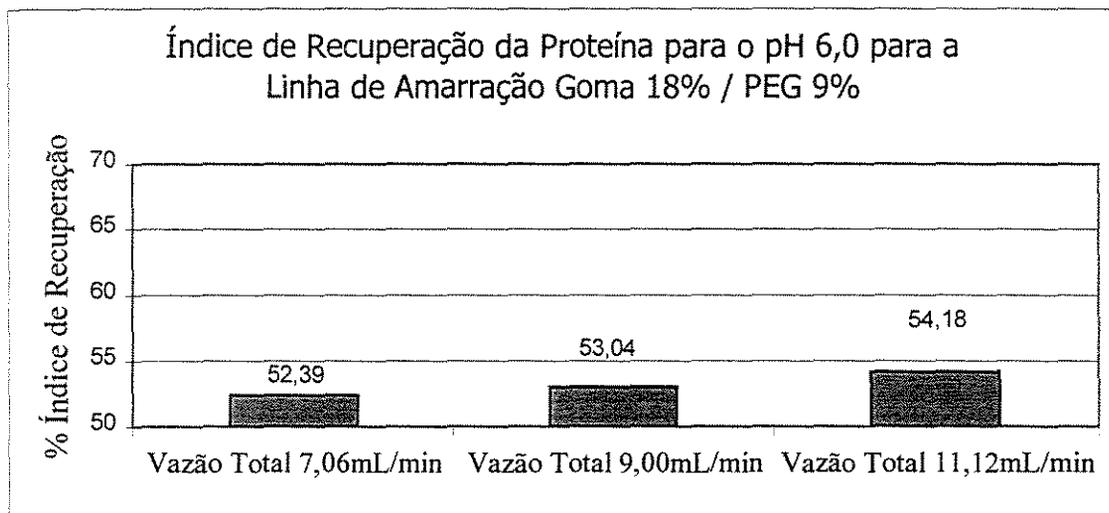


FIGURA 20 - Influência da vazão total no índice de recuperação da proteína para o sistema PEG4000-Policaju com concentração 18%Goma / 9%PEG em pH 6,0.

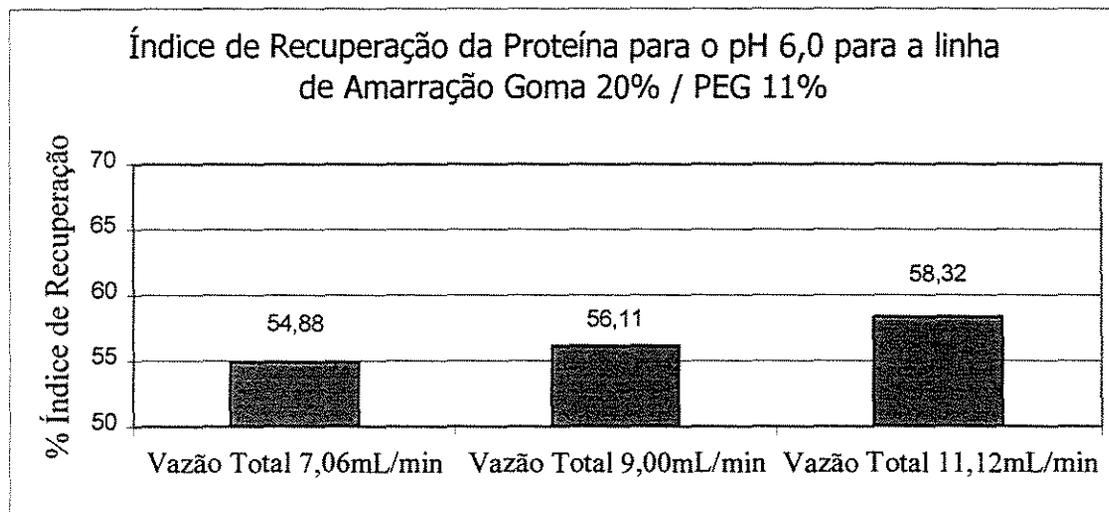


FIGURA 21 - Influência da vazão total no índice de recuperação da proteína para o sistema PEG4000-Policaju com concentração 20%Goma / 11%PEG em pH 6,0.

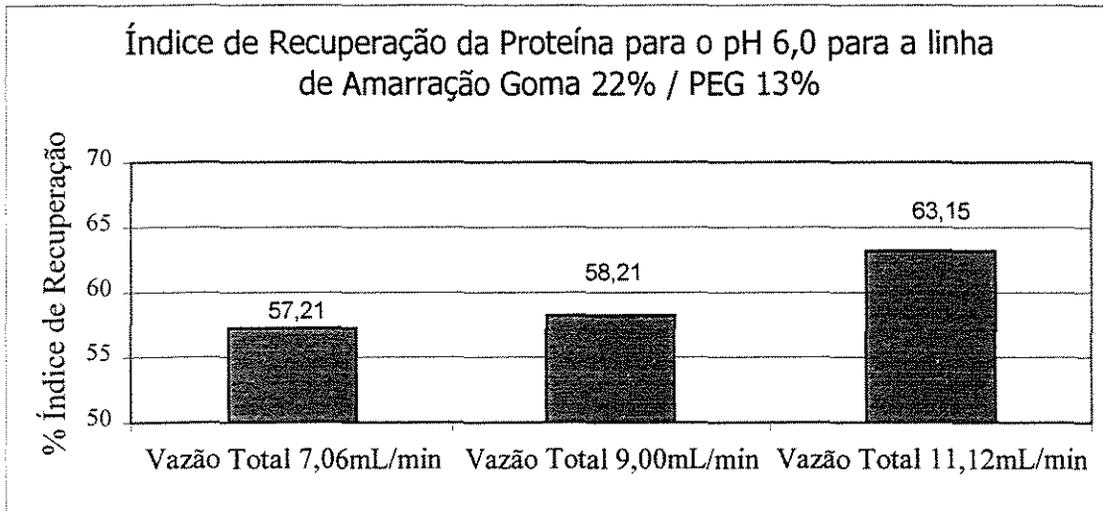


FIGURA 22 - Influência da vazão total no índice de recuperação da proteína para o sistema PEG4000-Policaju com concentração 22%Goma / 13%PEG em pH 6,0.

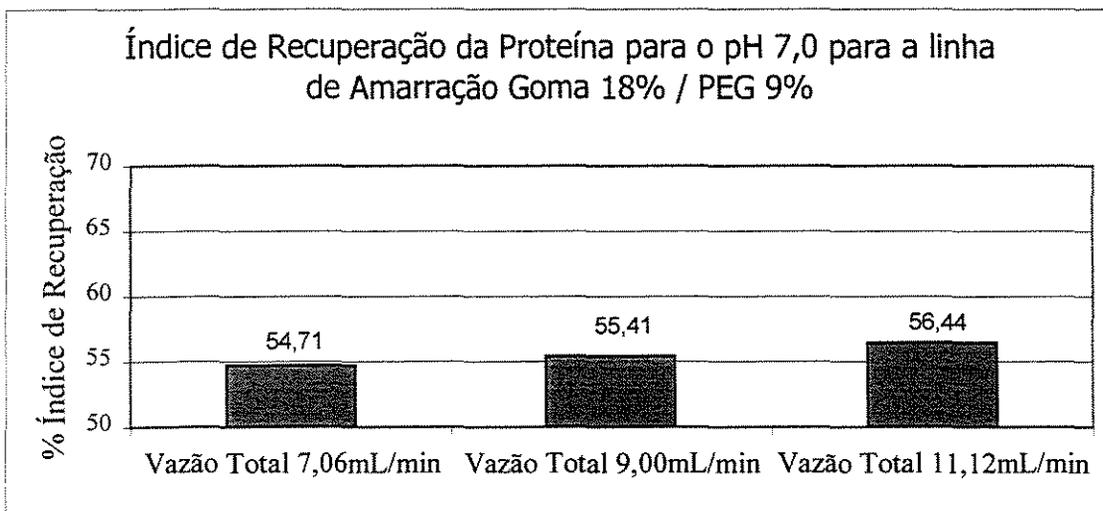


FIGURA 23 - Influência da vazão total no índice de recuperação da proteína para o sistema PEG4000-Policaju com concentração 18%Goma / 9%PEG em pH 7,0.

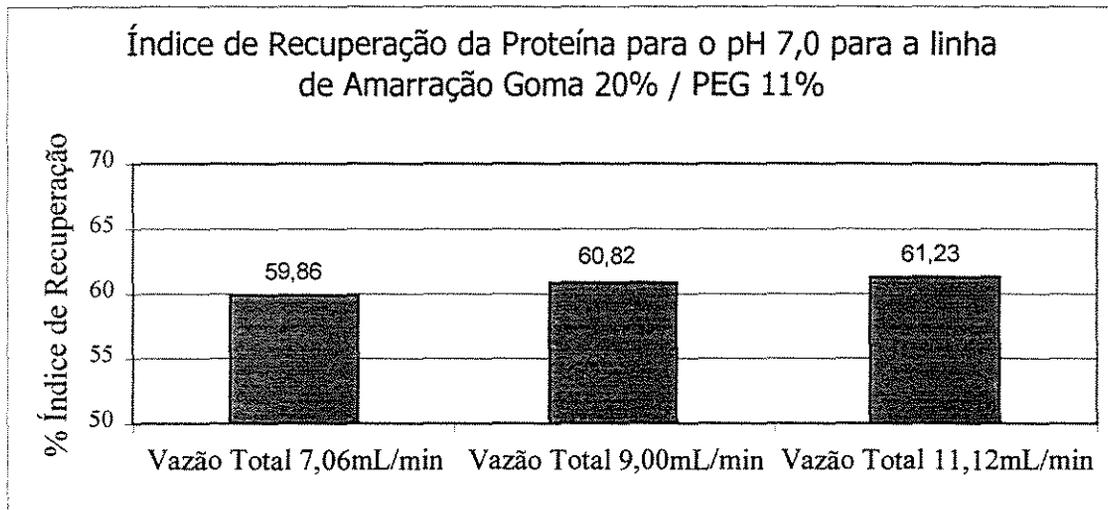


FIGURA 24 - Influência da vazão total no índice de recuperação da proteína para o sistema PEG4000-Policaju com concentração 20%Goma / 11%PEG em pH 7,0.

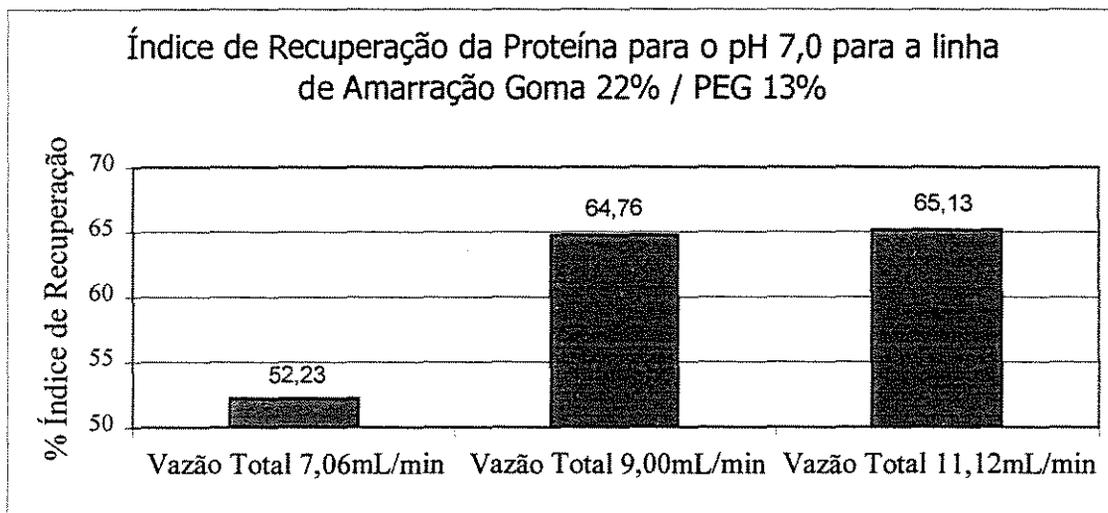


FIGURA 25 - Influência da vazão total no índice de recuperação da proteína para o sistema PEG4000-Policaju com concentração 22%Goma / 13%PEG em pH 7,0.

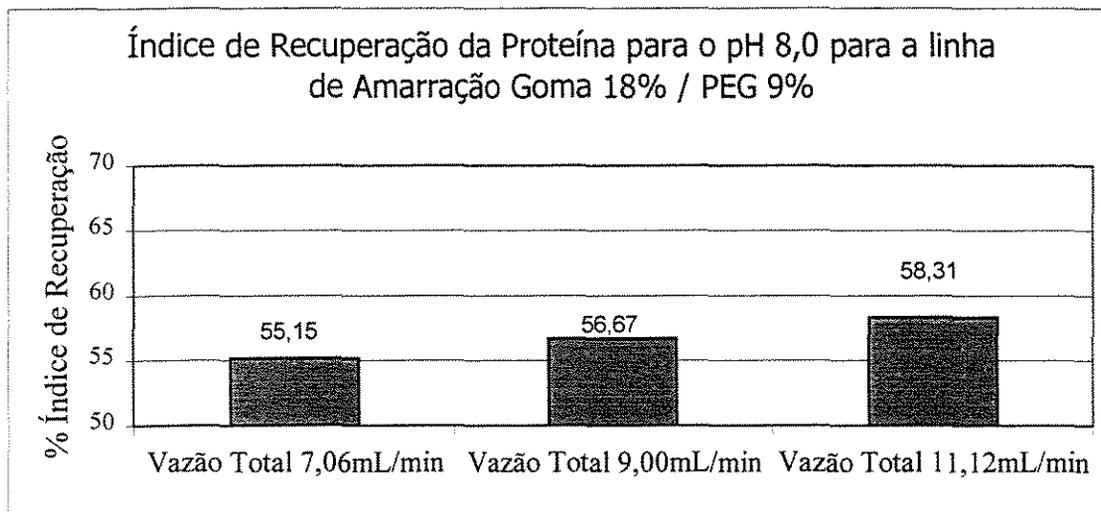


FIGURA 26 - Influência da vazão total no índice de recuperação da proteína para o sistema PEG4000-Policaju com concentração 18%Goma / 9%PEG em pH 8,0.

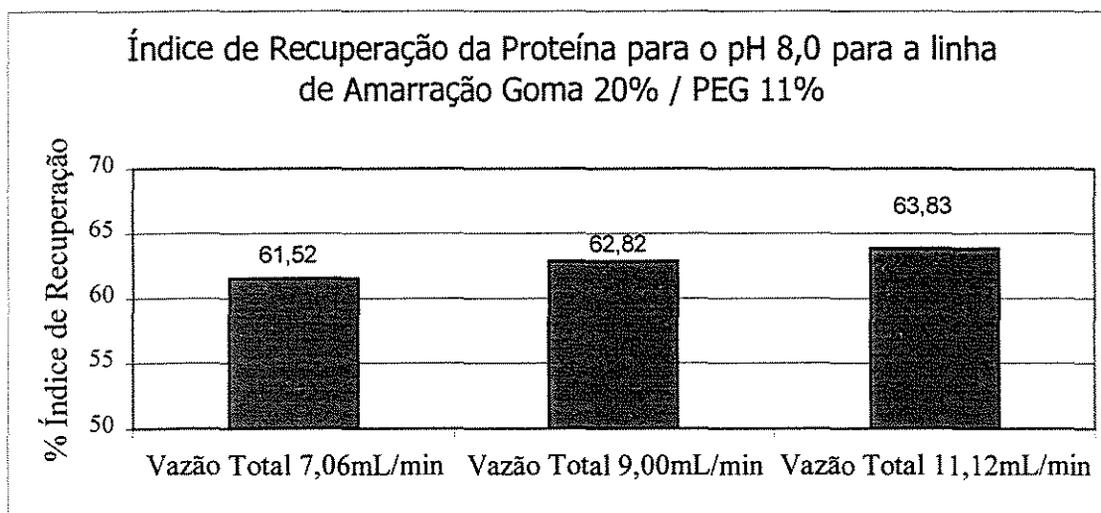


FIGURA 27 - Influência da vazão total no índice de recuperação da proteína para o sistema PEG4000-Policaju com concentração 20%Goma / 11%PEG em pH 8,0.

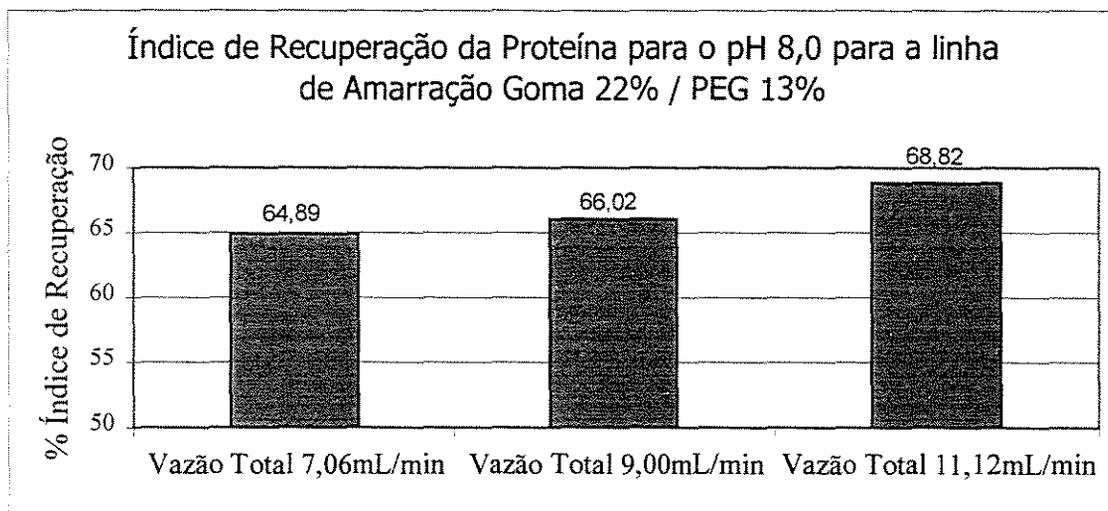


FIGURA 28 - Influência da vazão total no índice de recuperação da proteína para o sistema PEG4000-Policaju com concentração 22%Goma / 13%PEG em pH 8,0.

Para o desenvolvimento dessa tese, trabalhou-se com velocidades de alimentação constantes para a fase leve e a fase pesada, e os resultados da influência da vazão total de alimentação no índice de recuperação de proteína do caldo do abacaxi estão apresentados nas figuras 20 a 28. Observou-se, nos resultados obtidos, uma tendência de aumento da extração, ou seja, aumento do índice de recuperação da proteína 68,82% com o aumento da vazão total das fases, pois apresenta uma maior agitação, maior mistura, menor tamanho de gotas e maior número de gotas, o que melhora a transferência de massa. O mesmo foi verificado por RABELO (1999) na recuperação do citocromo b5 com o aumento da vazão total de alimentação. Acredita-se que o aumento da turbulência causada pela elevação da velocidade de escoamento possa proporcionar melhores índices de mistura das fases, fazendo com que ocorra aumento do índice de recuperação do soluto, já que aumenta a extração. SARUBBO (2000) observou que a velocidade da fase leve no índice de recuperação da albumina do soro bovino foi bastante elevada para suas condições de trabalho e não mostrou tendência regular com o aumento da velocidade dessa fase.

SARUBBO (2000) constatou que o índice de recuperação da albumina do soro bovino foi praticamente o mesmo para as velocidades de 60 e 140 rpm, aumentando pouco para a velocidade de 220 rpm utilizando uma coluna de extração PRDC. COIMBRA (1991) realizou um estudo da

eficiência da extração em PRDC na purificação de ácido láctico. O sistema utilizado foi ácido láctico-água-álcool isoamílico, e observou, para esse sistema, um aumento do índice de recuperação do soluto com a velocidade de rotação. Para o extrator de palhetas rotativas utilizando o sistema ácido acético-água-butanol, RABELO (1995) observou que o aumento da velocidade de rotação das palhetas também provocou o aumento do índice de recuperação.

5.5 – EFEITO DO pH NO ÍNDICE DE RECUPERAÇÃO DE PROTEÍNA

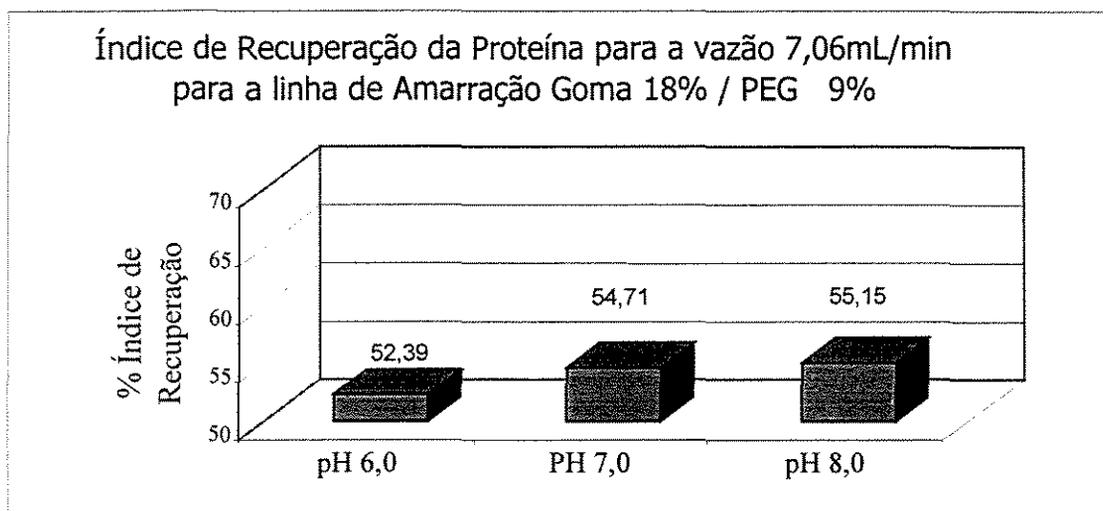


FIGURA 29 - Influência do pH no índice de recuperação da proteína para o sistema PEG4000-Policaju com concentração 18%Goma / 9%PEG a vazão total 7,06mL/min.

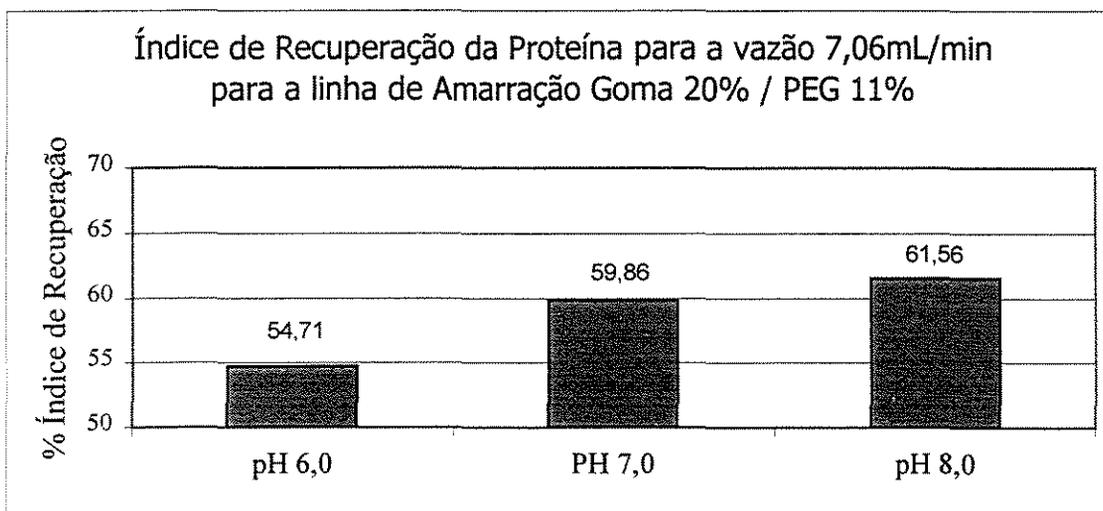


FIGURA 30 - Influência do pH no índice de recuperação da proteína para o sistema PEG4000-Policaju com concentração 20%Goma / 11%PEG a vazão total 7,06mL/min.

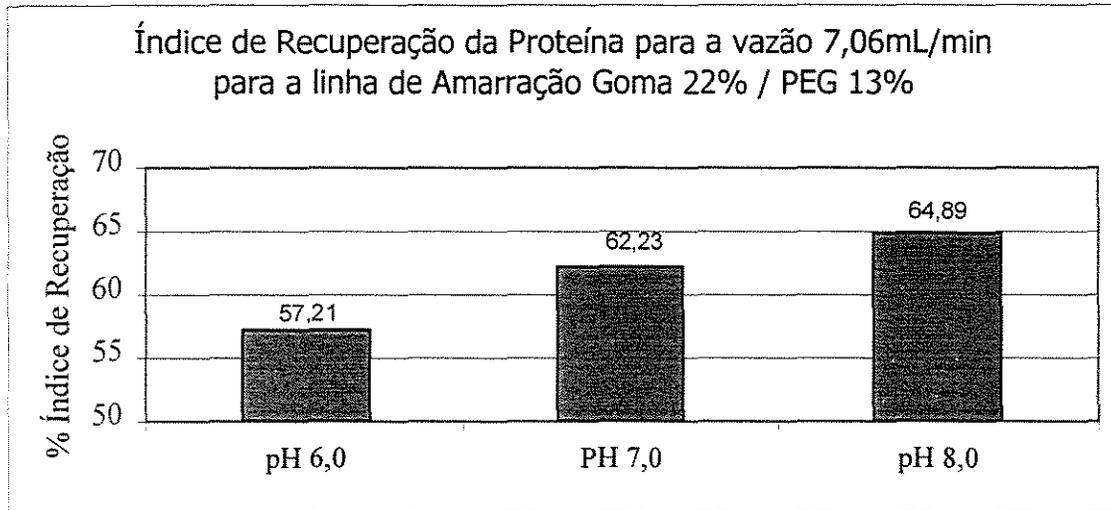


FIGURA 31 - Influência do pH no índice de recuperação da proteína para o sistema PEG4000-Policaju com concentração 22%Goma / 13%PEG a vazão total 7,06mL/min.

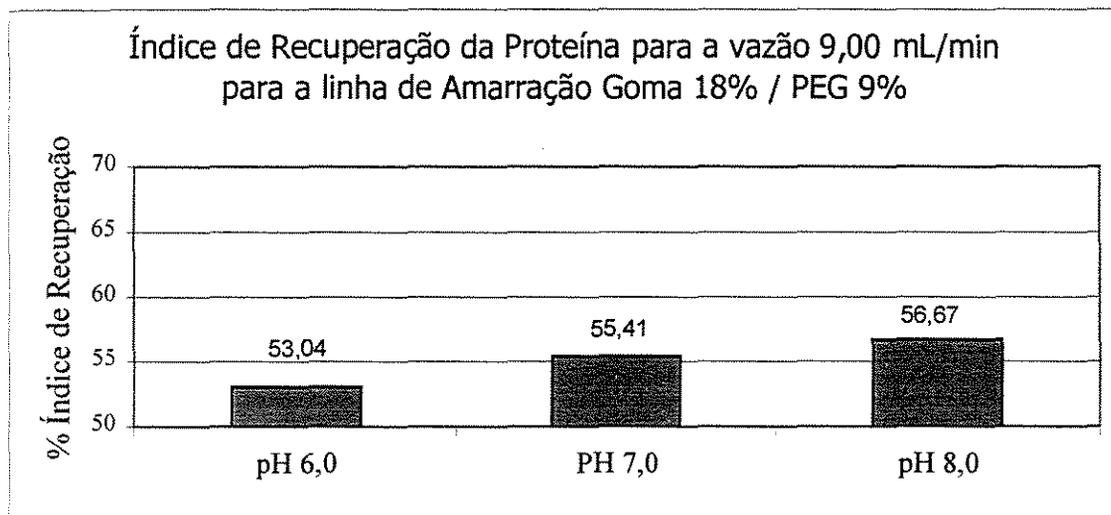


FIGURA 32 - Influência do pH no índice de recuperação da proteína para o sistema PEG4000-Policaju com concentração 18%Goma / 9%PEG a vazão total 9,00mL/min.

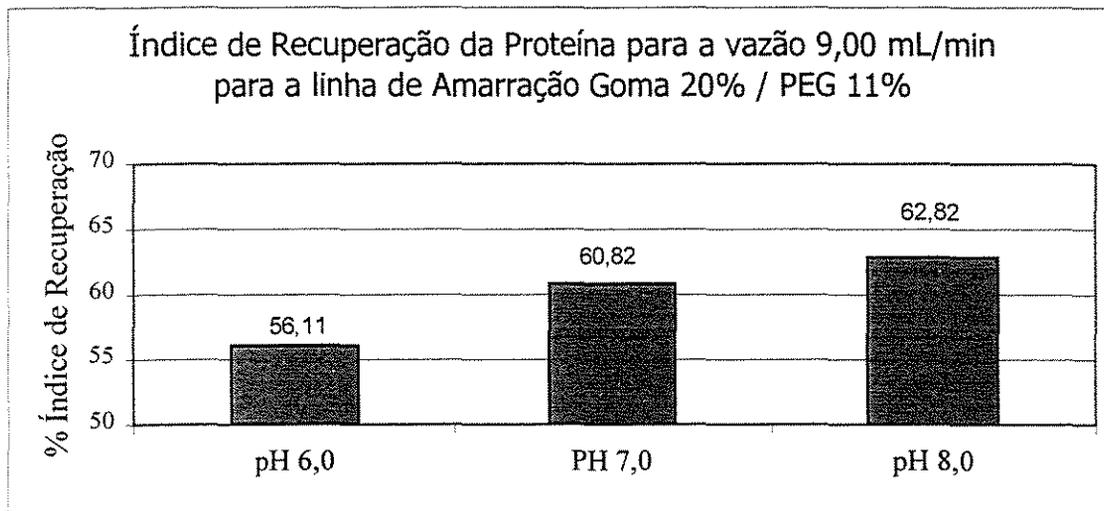


FIGURA 33 - Influência do pH no índice de recuperação da proteína para o sistema PEG4000-Policaju com concentração 20%Goma / 11%PEG a vazão total 9,00mL/min.

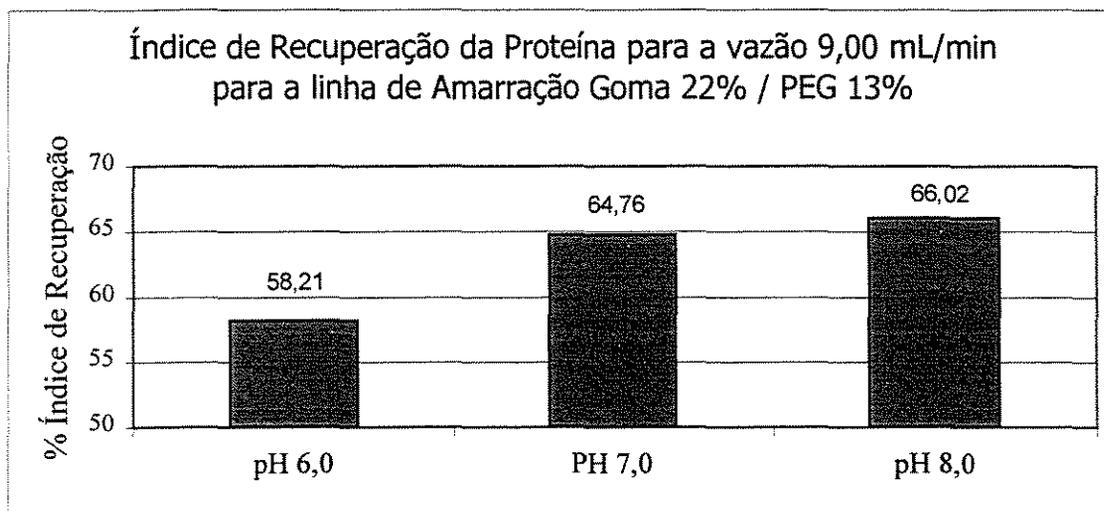


FIGURA 34 - Influência do pH no índice de recuperação da proteína para o sistema PEG4000-Policaju com concentração 22%Goma / 13%PEG a vazão total 9,00mL/min.

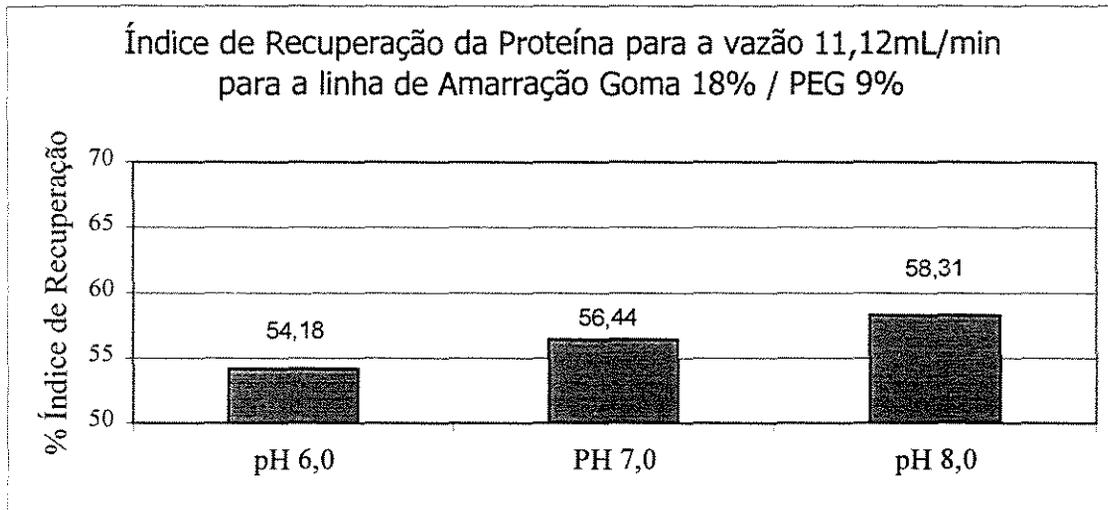


FIGURA 35 - Influência do pH no índice de recuperação da proteína para o sistema PEG4000-Policaju com concentração 18%Goma / 9%PEG a vazão total 11,12mL/min.

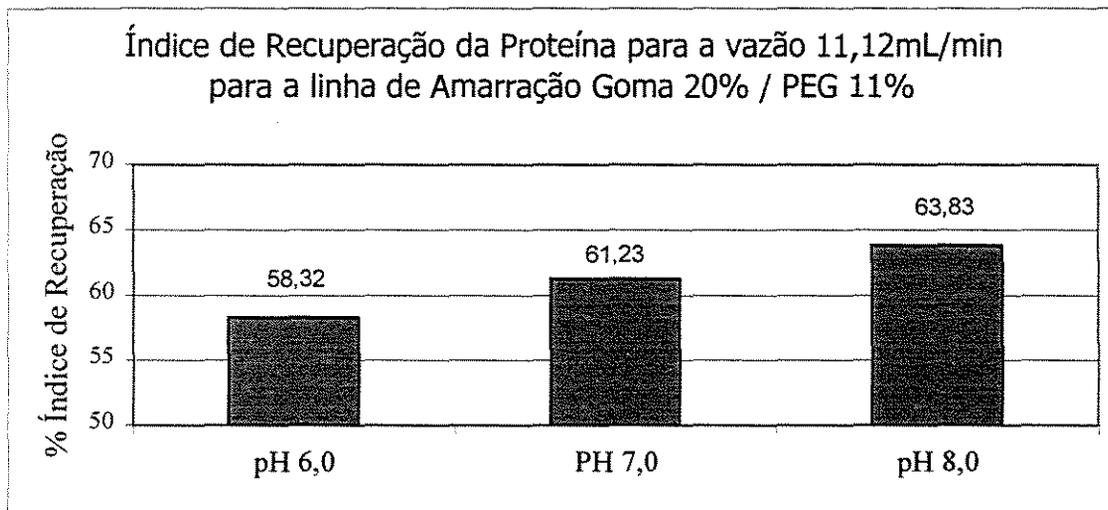


FIGURA 36 - Influência do pH no índice de recuperação da proteína para o sistema PEG4000-Policaju com concentração 20%Goma / 11%PEG a vazão total 11,12mL/min.

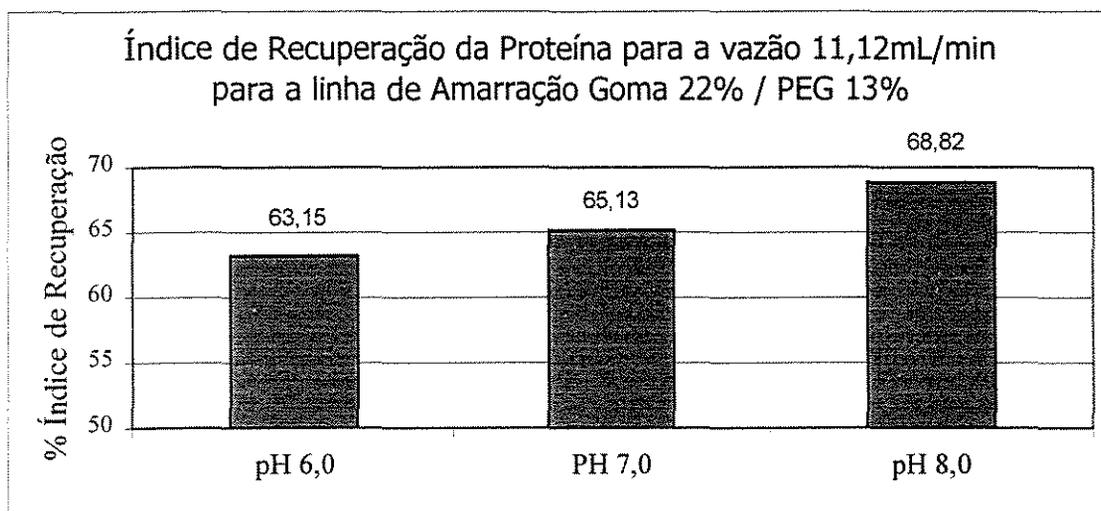


FIGURA 37 - Influência do pH no índice de recuperação da proteína para o sistema PEG4000-Policaju com concentração 22%Goma / 13%PEG a vazão total 11,12mL/min.

Analisando as figuras 29 a 37, verifica-se um melhor desempenho no índice de recuperação de proteína do caldo do abacaxi à medida que aumenta a concentração de policaju nas linhas de amarração e o valor do pH para todas as vazões estudadas, demonstrando um melhor rendimento na extração para a vazão maior no pH 8,0.

Um resultado semelhante foi obtido por HIROSE (2001), que obteve um rendimento maior na recuperação da tripsina usando um sistema PEG4000 / Sal para a linha de amarração maior, ou seja, uma maior concentração de soluto para um pH maior.

SARUBBO (2000), trabalhando com pH 6,0, 7,0 e 8,0 na determinação do coeficiente de partição da albumina do soro bovino para o sistema PEG4000/POLICAJU, verificou uma leve tendência de aumento na partição com o aumento do pH. Também VENANCIO *et al.* (1995) realizaram estudo na partição da albumina do soro bovino em sistema PEG/Goma Guar nos pHs 6,0, 7,0 e 8,0. Seus resultados demonstraram um leve aumento no coeficiente de partição com o aumento do pH em todos os sistemas utilizados. CHRISTIAN *et al.* (1998) observaram um aumento do coeficiente de partição da BSA com o pH (5,0, 6,0, 7,0 e 8,0) em sistemas PEG/Arabinogalactana. No sistema PEG/Hidroxipeopilamido bruto estudado por ALMEIDA *et al.* (1998), em diferentes pHs (4,0, 6,0, 8,0 e 9,0), verificaram que o coeficiente de partição da cutinase ($pI=7,8$) demonstrou pouca alteração com a variação do pH, embora um leve aumento desse parâmetro foi detectado com o aumento do pH de 4,0 para 8,0, porém, em pH 9,0, 0

coeficiente de partição foi menor do que em pH 8,0. Isto foi explicado com base nas propriedades hidrofóbicas do PEG, que pode se ligar aos resíduos hidrofóbicos da proteína.

6 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

A presença de atividade proteolítica no suco do abacaxi é conhecida desde do final do século XIX CHITTENDEN (1892), e algumas propriedades desta da atividade foram descritas por CHITTENDEN (1892); CALDWELL (1905); BALLS *et al.* (1941), HEINICKE and GORTNER (1957) descreveram que há atividade enzimática no talo do abacaxi, onde analisaram a sua ação em diferentes valores de pH, encontrando 4 diferentes proteases.

A atividade proteolítica da bromelina foi determinada pela hidrólise enzimática da caseína a 2%, pH 7,5 a 37°C durante 10 minutos, seguindo-se de precipitação do substrato não hidrolisado com solução de ácido tricloroacético (TCA) conforme modificações das metodologias propostas por KUNITZ (1947) e WALTER (1984). A quantidade de produtos hidrolíticos não precipitados, ou seja, de peptídeos solúveis em TCA, foi determinada em espectrofotômetro a 280nm, ou seja, na região do visível contra um branco preparado nas mesmas condições, e está descrito na seção 4.4.2.4

As análises da atividade enzimáticas foram realizadas em relação à influência do comprimento da linha de amarração com o tempo de extração na coluna em função do pH e vazão total de alimentação, dado (U/40 g amostra), onde U ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$)

Tabela 12 – Comparação da Atividade Proteolítica no início e após 40 minutos de extração.

Experimento	Atividade Enzimática no início (U/40 g amostra)	Atividade Enzimática após 40 min. extração (U/40 g amostra)
1	0,0112	0,0089
2	0,0194	0,0155
3	0,0175	0,0145
4	0,0106	0,0090
5	0,0187	0,0125
6	0,0175	0,0136
7	0,0156	0,0112
8	0,01147	0,0101

Cont. Tabela 12.

Experimento	Atividade Enzimática no início (U/40 g amostra)	Atividade Enzimática após 40 min. extração (U/40 g amostra)
9	0,0336	0,0253
10	0,0159	0,0130
11	0,0162	0,0137
12	0,0160	0,0120
13	0,0151	0,0128
14	0,0159	0,0132
15	0,0154	0,0127
16	0,0332	0,0251
17	0,0271	0,0207
18	0,0168	0,0132
19	0,0235	0,0182
20	0,0256	0,0204
21	0,0226	0,0174
22	0,0178	0,0151
23	0,0190	0,0153
24	0,0183	0,0140
25	0,0329	0,0279
26	0,0335	0,0271
27	0,0467	0,0365

Como foi verificado através da análise do índice de recuperação que a proteína se concentra em grande parte na fase pesada, ou seja rica em POLICAJU. Fazendo a análise da atividade enzimática nesta fase, verificou-se para todos experimentos uma diminuição em média de 20% em atividade, o que não pode ser considerado uma desnaturação da enzima, ou seja a fase pesada não desnatura a enzima a temperatura dos testes realizados.

7 – COMPARAÇÃO DE CUSTOS PARA VÁRIOS SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS

Diversos estudos têm sido realizados com o propósito de avaliar o impacto econômico do recurso às técnicas de partição bifásica aquosa em processo de grande escala para a purificação de moléculas biológicas DATAR (1986); TJERNELD *et al.* (1987).

O consumo de reagentes químicos pode tornar-se o fator determinante no impacto econômico de processos em grande escala, pois enquanto os custos com equipamentos aumentam em uma potência de 0,6 com o aumento da escala, o consumo de reagentes aumenta linearmente (PAPAMICHAEL & HUSTEDT, 1984). Segundo DATAR (1986), o custo dos reagentes pode chegar a representar até 74% do custo total da produção. Por esses aspectos, torna-se fundamental reduzir substancialmente os custos dos reagentes químicos, quer pelo recurso a novos reagentes, quer pela implementação de técnicas de recirculação dos mesmos.

A maioria das aplicações em escala industrial das separações bifásicas aquosas usa os sistemas PEG/Sais devido ao baixo custo dos reagentes químicos utilizados nesses sistemas. A elevada concentração de sal em ambas as fases, contudo, pode prejudicar estruturas sensíveis, além de apresentar um problema ecológico por sua presença nos efluentes. Por outro lado, os sistemas bifásicos aquosos constituídos por dois polímeros podem superar esses problemas, destacando-se os estudos com sistema PEG-Dextrana, o qual apresenta propriedades físicas bastante favoráveis, embora o alto custo da Dextrana fracionada tenha dificultado sua utilização em larga escala KRONE *et al.* (1984). Várias alternativas têm sido investigadas, incluindo a dextrana bruta KRONE *et al.* (1982), maltodextrinas SZLAG & GIULIANO (1988) e derivados de amidos JOHANSSON & JOELSSON (1985); TJERNELD *et al.* (1986). A dextrana bruta permite uma redução significativa nos custos relativos à dextrana fracionada KRONE *et al.* (1982), mas apresenta uma alta viscosidade e, conseqüentemente, uma lenta separação de fases. As maltodextrinas podem ser obtidas a um baixo custo, embora suas baixas massas molares possam causar problemas de viscosidade a altas concentrações SZLAG & GIULIANO (1988). Já os derivados do amido apresentam excelentes capacidades de separação, embora uma redução mais significativa dos custos seria interessante para torná-los mais competitivos para aplicações industriais.

Tabela 13 – Preço por quilograma de polímeros empregados em sistemas bifásicos aquosos

Polímero	Preço (Real/kg)	Referência
Dextrana T500	500,00	Sigma Chemical Co., EUA
Dextrana bruta	58,00	Sigma Chemical Co., EUA
Policaju	9,00	EMBRAPA, Brasil
Hidroxipropilcelulose (Klucel L)	13,00	Aqualon, EUA
Arabinogalactana	65,00	Larex Inc. EUA
Hidroxipropilamido (Reppal PES)	20,00	Reppal PES, Reppe Glyckos, Suécia.
Hidroxipropilamido (aquaphase PPT)	21,00	Perstorp AB, Suécia
Maltodexterina	0,98 – 2,40	SZLAG & GIULIANO, 1988

Fonte SARUBBO, 2000.

A análise do custo do novo sistema foi efetuada juntamente com outros sistemas já descritos na literatura a fim de se avaliar a aplicabilidade do Policaju como alternativa viável para separações biotecnológicas.

A tabela 13 apresenta o custo de 1kg de alguns polímeros utilizados em sistemas bifásicos aquosos e a tabela 14 apresenta a comparação dos custos de 1kg de alguns sistemas bifásicos aquosos usados ao longo dos anos. Esses custos foram determinados para uma composição média obtida a partir das composições empregadas por diferentes autores para cada caso. Para o cálculo dos custos dos reagentes, os mesmos foram obtidos a partir de empresas que comercializam tais produtos ou a partir das referências bibliográficas para cada sistema. Para se obter uma comparação mais precisa, os cálculos foram realizados para preços fixos de polietileno glicol (PEG).

Pode-se observar que o custo do policaju é bastante competitivo, apresentando um preço compatível com os demais polímeros avaliados, especialmente com os derivados do amido (Tabela 12). O novo sistema caracterizado também apresenta um custo viável frente aos demais sistemas estudados na literatura.

Tabela 14 – Custo associado a um quilograma de diferentes sistemas bifásicos aquosos

Sistema	Custo (Real/Kg)	Referência
5%PEG8000-7%Dextrana T500	36,63	ALBERTSSON, 1986
5%PEG8000-7%Dextrana bruta	5,70	KRONE et al., 1982
18%Policaju-9%PEG4000	4,20	SARUBBO, 2000
16%Policaju-9%PEG8000	4,30	SARUBBO, 2000
4% Hidroxipropilcelulose (Klucel L)-10%PEG-PPG(popileno glicol) Pluronic P105	4,00	SKUSE et al., 1992
5%PEG8000-16%Arabinogalactana	12,00	CHRISTIAN et al., 1998
4%PEG8000-14%Hidroxipropilamido (Reppal)	4,10	JOHANSSON & JOELSSON, 1985
4%PEG8000-14%Hidroxipropilamido (Aquaphase PPT)	4,24	Tjerneld ET AL., 1986
4%PEG8000-22%Maldodextrina	1,52-1,84	SZLAG & GIULIANO, 1988

Fonte SARUBBO, 2000.

Assim, demonstrou-se que o polissacarídeo do cajueiro (Policaju) tem potencial como uma alternativa à Dextrana fracionada e a outros polímeros empregados em sistema bifásico aquoso. Além de ser de fácil obtenção e baixo custo, o sistema PEG-Policaju proposto apresenta boa aplicabilidade em processo de separação, possibilitando o desenvolvimento de estudos futuros para aplicações em larga escala, tomando muito cuidado com o policaju estudado, pois se deve fazer as linhas de amarração para cada lote obtido.

8 – PERSPECTIVAS PARA OS SISTEMAS BIFÁSICOS AQUOSOS

Os sistemas bifásicos aquosos constituem um ambiente singular altamente suave para estruturas protéicas e oferecem uma poderosa tecnologia de separação. Os rápidos desenvolvimentos dos estudos demonstram que, em um futuro breve, partições com sistemas bifásicos aquosos poderão ser calculadas para um grande número de condições. O desenvolvimento de um modelo termodinâmico para a partição de proteínas, no entanto, torna-se mais difícil devido aos inúmeros parâmetros de equilíbrios existentes. Os processos poderão ser otimizados, podendo-se prever o comportamento da partição de diferentes estruturas biológicas.

Este objetivo não parece estar distante, havendo necessidade, porém, do empenho científico dentro da área. Até que se alcance este objetivo, teremos que nos basear em regras semi-empíricas e modelos experimentais para estes processos de purificação (ANDREWS *et al.*, 1999).

O desenvolvimento técnico também está bastante avançado, sendo realizado pela utilização de equipamentos comercialmente disponíveis e adequados para a extração. O maior obstáculo parece ser o conhecimento científico no que se refere ao comportamento dos polímeros hidrofílicos em solução. Embora existam centenas de trabalhos publicados nos últimos 40 anos, o domínio do conhecimento em sistemas aquosos parece ser restrito a pequenos grupos científicos que se expandem em ritmo lento (ANDREWS *et al.*, 1999; KULA, 1990). Estudos realizados nos últimos anos em todo mundo, todavia, indicam que essa situação está mudando, o que significa dizer que cada vez mais novos departamentos de bioengenharia e bioquímica irão incluir esse assunto em seus cursos. Desta forma, surgirá espontaneamente um maior interesse em se considerar e explorar esse processo de separação. A extração com sistemas bifásicos aquosos parece ser, na maioria dos casos, a melhor alternativa como tecnologia de separação nos estágios iniciais, especialmente no que se refere à escala de operação, economia de tempo, níveis de purificação dos produtos e operação em contínuo.

Assim, analisando o assunto sob este ponto de vista, pode-se dizer que a biologia e a termodinâmica podem se relacionar e concordar em questões fundamentais, ou seja, há muito que se aprender e aumentar os conhecimentos já existentes com os sistemas bifásicos aquosos.

9 – CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi estudado o índice de recuperação da proteína bromelina do caldo do abacaxi da espécie Hawaii para as seguintes condições: frequência de pulsação de 33 pulsos/min à temperatura ambiente, em pH 6,0, 7,0 e 8,0, com vazão total de alimentação de 7,06, 9,00 e 11,12 mL/min para três composições de sistemas bifásicos PEG4000/Policaju.

O estudo do índice de recuperação da bromelina do caldo do abacaxi para o sistema PEG4000/Policaju demonstrou um aumento da recuperação da proteína com o aumento da vazão total de alimentação. O mesmo efeito foi observado para o aumento da composição do policaju no sistema bifásico.

O efeito do pH no índice de recuperação da bromelina não foi significativo, apresentando-se bastante próximo nos três valores de pH estudados.

A vazão total de alimentação já foi mais significativa, pois à medida que se aumentou a mesma, verificou-se um aumento no índice de recuperação da proteína.

Os resultados obtidos nos estudos de extração contínua com coluna agitada por campânulas pulsadas utilizando o sistema PEG4000/Policaju mostraram-se adequados para a extração da bromelina do caldo do abacaxi, cujos valores obtidos foram os seguintes: índice de recuperação de 68,82% para a linha de amarração 22%Policaju / 13%PEG4000, 63,13% para a linha de amarração 20%Policaju / 11%PEG4000 e 58,31% para a linha de amarração 18%Policaju / 9%PEG4000 para a vazão total de alimentação de 11,12 mL/min em pH 8,0.

A análise do perfil de extração contínua da bromelina do caldo do abacaxi demonstrou que a maior transferência da proteína foi obtida para o sistema 22%Policaju / 13%PEG4000 à vazão total de alimentação de 11,12 mL/min em pH 8,0.

O polissacarídeo do cajueiro (Policaju) apresenta-se vantajoso perante outros polímeros por ser um polímero natural, regional, de baixo custo e encontrado em grande parte do nordeste brasileiro. O mesmo pode ser ingerido, pois não é tóxico para o ser humano. A proteína se concentra na fase rica em goma, com isso, a mesma não necessita de um alto grau de pureza, podendo, assim, diminuir o custo de purificação da proteína. Entretanto, a desvantagem de se trabalhar em extração contínua é que, um lote de goma dificilmente será igual ao outro,

dificultado o uso de linhas de amarração predeterminadas. Para solucionar esse problema, é necessário obter gomas com as mesmas características, cujas composições de Galactose, Manose, Arabinose, Xilose, Glicose, Ramnose e Ácido Glucurônico

A análise de custo para sistemas de duas fases aquosas demonstrou que o Policaju tem grande potencial como um polímero alternativo à Dextrana fracionada e que o novo sistema é competitivo com outros sistemas polímero-polímero descritos na literatura.



10 – SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS

Uma vez que é impossível a obtenção de um trabalho totalmente completo, torna-se importante a apresentação de algumas sugestões que possam contribuir para aprofundar a caracterização do novo sistema, e em especial, com o sistema PEG-Policaju. Assim, como continuação do trabalho efetuado, propõe-se:

Fazer um estudo com a bromelina pura;

Fazer teste com o precipitado do suco do abacaxi;

Estudar a recuperação de outros bioprodutos no sistema caracterizado;

Desenvolver estudos sobre a reciclagem dos reagentes neste tipo de extrator a fim de se obter uma aplicação mais econômica;

Estudar formas de recuperação dos produtos de interesse separados pelo sistema.

11 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTSSON, P-A. Partition of cell particles and macromolecules. New York, Wiley, 3 ed, 1986.
- ALBERTSSON, P-A . JOHANSSON, G., TJERNELD, F. Aqueous two-phase separation. In: ANSENJO, J. A. (ed), Separation Process in Biotechnology, New York; Marcel dekker, p. 287-326, 1990.
- ALMEIDA, M.C., VENÂNCIO, A., TEIXEIRA, J.A., AIRES-BARROS, M. R. Cutinase purification on poly(ethylene glycol)-hydroxypropil starch aqueous two-phase systems, Journal of Chromatography B, v. 711, p. 151-159, 1998.
- ALRED, P. Biomolecule purification using temperature-induced phase separation and affinity partitioning. Lund, 1993. Tese de Doutorado Universidade de Lund, Suécia, 1993.
- ALSOP, R. M. Industrial production 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 exudatos from *Anacardium occidentale*. Phytochemistry, v.13, p. 2189-2193, 1974.
- ANDERSON, D. M. W.; BELL, P. C. Structural analysis of the gum polysaccharide from *Anacardium occidentale*, Analytica Chimica Acta, Amsterdam, v. 79, p. 185-197, 1975.
- ANDREWS, B. A., HUENUPI, E., ASENJO, J. A. Industrial prospects of aqueous two-phase processes. **11th International Conference on Partitioning in Aqueous Two-phase Systems**, Gulf Shores, Alabama, USA, June 27-july 2, 1999.
- ASENJO, J. A . The rational design of large scale protein separation processes. Separations for Biotechnology, v. 2, p. 519-528, 1990.
- ASPINNAL, G. O. Gums and mucilages. In: WOLFROM, M. L., TIPSON, R. S. (eds), Advances in Carbohydrate Chemistry, New York; Academic Press, v. 24, p. 333-379, 1969.
- BELTER, P. A.; CUSSLER, E. L. ;HU, W. S., Bioseparation: Downtream Processing for biotcnology. Minnapolis, John Wiley & Sons, 1988.

-
- BOLAND, J. M. Extraction of proteins from animal tissue using multiphase aqueous systems. *Bioseparation*, v. 1, p. 293-304, 1990.
- BOLAND M. J.; HESSELINK P. G. M.; PAPAMICHAEL, N.; HUSTEDT, H. Extractive purification of enzymes from animal using aqueous two-phase systems: Pilot scale studies. *Journal of Biotechnology*, v. 19, p. 19-34, 1991.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, vol. 72, p. 248-254, 1976.
- CABRAL, J. M. S., AIRES-BARROS, M.R. Liquid-liquid extraction of biomolecules using aqueous two-phase systems. In: JOHN WILEY & SONS Ltd (eds), *Recovery process for biological materials*, New York; p. 273-301, 1993.
- CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G., AIRES-BARROS, M. R., E.B. TAMBOURGI, J. M. S. CABRAL. Recovery of a recombinant cutinase with reversed micelles in a continuous perforated rotating disc contactor. *Biotechnology Techniques*, v. 8, p. 413-418, 1994.
- CHRISTIAN, T. J. MANLEY-HARRIS, M., RICHARDS, G. N. A preliminary study of the use of larch arabinogalactan in aqueous two-phase systems, *Carbohydrate Polymers*, v. 35, p. 7-12, 1998.
- COIMBRA, J. R. Análise da eficiência de extração em colunas de discos perfurados rotativos na purificação de ácido láctico. Campinas, 1991. Tese de Mestrado em Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas-SP, 1991.
- COIMBRA, J. R., THOMMES, J., KULA, M-R. Continuous separation of whey proteins with aqueous two-phase systems in a Graesser contactor. *Journal of Chromatography A*, v. 668, p. 85-94, 1994.
- COIMBRA, J. R. Desempenho de um extrator tipo Graesser na separação de proteínas do soro de queijo usando sistemas aquosos bifásicos. Campinas, 1995, 129p. Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas-SP, 1995.

- COIMBRA, J. R., THOMMES, J., MEIRELLES, A.J., KULA, M-R. Performance of a Graesser contactor in the continuous extraction of whey proteins: mixing, mass transfer and efficiency. *Bioseparation*, v. 5, p. 259-268, 1995.
- DATAR, R. Economics of primary separation steps in relation to fermentation and genetic engineering. *Process Biochemistry*, v. 21, p. 19-26, 1986.
- DIAMOND, A. D., HSU, J. T. Fundamental studies of biomolecules partitioning in aqueous two-phase systems, *Biotechnology and Bioengineering*, v. 34, p. 1000-1014, 1989.
- DIAMOND, A. D., HSU, J. T. Aqueous two phase systems for biomolecule separation. *Advances in Biochemistry Engineering*, v. 47, p. 89-135, 1992.
- DUARTE, M. M. L.; MALMARY, G.; MOLINIER, J. *Estudo Hidrodinâmico em uma Coluna Pulsada de Discos e Coroas*. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Revista Brasileira de Engenharia, 9 (1), 109-118, 1992.
- EITMAN, M. A. Prediction partition coefficients of multi-charged solutes in aqueous two-phase systems, *Journal of Chromatography*, v. 668, p. 21-30, 1994.
- EITMAN, M. A., GAINER, J. L. Peptide hydrophobicity and partitioning in polyethylene glycol-magnesium sulfate aqueous two-phase systems. *Biotechnology Progress*, v. 06, p. 279-296, 1990.
- EITMAN, M. A., GAINER, J. L. A correlation for predicting partition coefficients in aqueous two-phase systems, *Separation Science and Technology*, v. 27, p. 325-339, 1992.
- FLORY, P. J. *J. Chem. Phys.*, v. 9, p. 660, 1941.
- FORCINITI, D., HALL, C. K., KULA, M-R. Interfacial tension of polyethylene glycol-dextran-water systems: influence of temperature and polymer molecular weight, *Journal of Biotechnology*, v.16, p. 279-296, 1990.
- FORCINITI, D., HALL, C. K., KULA, M-R. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 26, p. 986-994, 1992.

-
- GÓIS, L. M. N. Estudo e Desenvolvimento de um Extrator de Pratos Perfurados *Pulsantes*. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas-São Paulo, 1995. Tese (Doutorado).
- GORTNER, W. A. & SINGLETON, V. L. Chemical and physical development of the pineapple fruit. III. Nitrogenous and enzyme constituents. *Journal of food Science*, Chicago, 30(1): 24-9, 1995.
- GROßMAN, P. D., GAINER, J. L. Correlation of aqueous two-phase partitioning of proteins with changes in free volume, *Biotechnology Progress*, v. 4, p. 6-11, 1988.
- GROßMANN, C., TINTINGER, R., ZHU, J. MAURER, G. Partitioning of low molecular combination peptides in aqueous two-phase systems of poly(ethylene glycol) and dextran in the presence of small amounts of K_2HPO_4/KH_2PO_4 buffer at 293 K; experimental results and predictions, *Biotechnology and Bioengineering*, v. 60, p. 699-711, 1998.
- HANSON, C. Recent research in solvent extraction. *Chemical Engineering*, v. 9, p. 135-142, 1968.
- HANSON, C. Recent advances in liquid-liquid extraction. New York, Pergamon Press, 1971.
- HARRIS, J. M. Poly(ethylene glycol) chemistry - Biotechnical and Biomedical applications, New York, Plenum Press, 1992.
- HARRIS, J. M., YALPANI, M. Polymer-ligands used in affinity partitioning and their synthesis. In: WALTER, H., BROOKS, D. E., FISHER, D. (eds.), *Partition in aqueous two-phase systems*. Academic press, Orlando, Fla, p. 589-625, 1985.
- HEINICKE, R. M. & GORTNER, W. A. Stem bromelain. A new protease preparation from pineapple plants. *Economic Botanic*, New York, 11 : 225-34, 1957.
- HUDDLESTON, J. G., OTTOMAR, K. W., NGONYANI, D. M., LIDDIATT, A. Influence of system and molecular parameters upon fractionation of intracellular proteins from *Saccharomyces* by aqueous two-phase partition. *Enzyme Microbiology and Biotechnology*, v. 13, p. 24-32, 1991.
- HUGGINS, M. L. *J. Chem. Phys.*, v. 9, p. 440, 1941.

- HUMPRHEY, J. L., ROCHA, J. A., FAIR, J. R. The essentials for extraction. Chemical Engineering, v.17, p. 76-95, 1984.
- HUSTEDT, H., KRONER, K. H., PAPAMICHAEL, N. Continuous cross-current aqueous two-phase extraction from biomass automated recovery in production scale, Process Biochemistry, v.23, p. 129-137, 1988.
- JOHANSSON, G., ANDERSON, M., AKERLUND, H-E., Counter current distribution of yeast enzymes with polymer-bound triazine dye affinity ligands, Journal of Chromatography, v. 289, p. 483-493, 1984.
- JOHANSSON, G., HARTMAN, A., ALBERTSSON, P-A. Partition of proteins in two-phase systems containing charged poly(ethylene glycol), Europeum Journal of Biochemistry, v. 33, p. 379-386, 1973.
- JOHANSSON, G., JOELSSON, M. Preparation of Cibacron blue F3GA (polyethylene glycol) in large scale for use in affinity partitioning, Biotechnology and Bioengineering, v. 27, p. 621-625, 1985.
- JOHANSSON, G., KOPPERSCHLÄGER, G., ALBERTSSON, P-A. Affinity partitioning of phosphofructokinase from baker's yeast using polymer-bound Cibacron Blue F3GA, Europeum Journal of Biochemistry, v. 131, p. 589-594, 1983.
- JOHANSSON, H-O., LUNDH, G., KARLSTRÖM, G., TJERNELD, F. Effects of ions on partitioning of serum albumin and lisozyme in aqueous two-phase systems containing ethylene oxide/propylene oxide co-polymers, Biochimica et Biophysica Acta, v. 1290, p. 289-298, 1996.
- JONES, J.K.N., SMITH, F. Plant gums and mucilages. In: WOLFROM, M. L., TIPSON, R. S. (eds), Advances in Carbohydrate Chemistry , New York; Academic Press, v. 4, p. 243-251, 1949.
- KAWASE, Y. Dispersed-phase holdup and mass transfer in a rotating disc contactor with perforated skirts. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v. 48, p. 247-260, 1990.

-
- KHEMANGKORN, V.; MOLINIER, J.; ANGELINO, H. *Influence of Mass Transfer Direction on Efficiency of a Pulsed Perforated Plate Column*, Chemical Engineering Science, 33, 501-508, 1978.
- KRONER, K. H., STACH, W., SCHUTTE, H. KULA, M-R. Scale-up of formate dehydrogenase isolation by partition. *Journal of Chemistry Technology and Biotechnology*, v. 32, p. 130-137, 1982.
- KRONER, K. H., HUSTEDT, H., KULA, M-R. Extractive enzyme recovery: economic considerations, *Process Biochemistry*, v. 19, p. 179-189, 1984.
- KULA, M-R., KRONER, K. H.; HUSTED, T. H. Purification of enzymes by liquid-liquid extraction. *Advances in Biochemical Engineering*, v. 24, p. 73-118, 1982.
- KULA, M-R. In: C. L. COONEY, A. E. HUMPREY (eds), *Comprehensive Biotechnology*, New York; Pergamon Press, v. 02, p. 451-471, 1985.
- KULA, M-R. Application of aqueous two-phase systems for the extraction of biologically active proteins from biomass. *ISEC86, International Solvent Conference*, v. III, P. 567-576, 1986.
- KULA, M-R., KRONER, K. H., HUSTEDT, H. Large scale protein recovery using aqueous phase systems. In: FISHER, D. E.; SUTHERLAND, I. A. (eds.) *Separations using aqueous phase systems*. London; Phenum press, p. 295-298, 1989.
- KULA, M-R. Trends and future prospects of aqueous two-phase extraction. *Bioseparation*, v. 1, p. 181-189, 1990.
- KUNITZ, M., *J. Gen. Physiol.* 30, 291, 1947.
- LI, M., ZHU, Z-Q., MEI, L-H. Partitioning of amino acids by aqueous two-phase systems combined with temperature-induced phase formation, *Biotechnology Progress*, v. 13, p. 105-108, 1997.
- LIN, D-Q., ZHU, Z-Q., MEI, L-H. Affinity extraction of lactate dehydrogenase by aqueous two-phase systems using free triazine dyes. *Biotechnology techniques*, v.10, p. 41-46, 1996.

- LIN, D-Q.; ZHU, Z-Q., YAO, S-J., MEI, L-H. Modelling of protein partitioning in aqueous polymer two-phase systems. 11th International Conference on Partitioning in Aqueous Two-phase Systems, Gulf Shores, Alabama, USA, June 27-july 2, 1999.
- LEHNINGER, A. L, Princípios de Bioquímica, Savier ed., 1986.
- LEHNINGER, A. L, Princípios de Bioquímica, Savier ed, 1995.
- MARQUES, M. R., XAVIER,-FILHO, J. Enzymatic and inhibitory activities of Cashew tree gum exsudate. *Phytochemistry*, Oxford, v. 30, p.1431-1433, 1991.
- MATIASSON, B., LING, T. G. I. Extraction in aqueous two-phase systems for biotechnology. In: VENAL, N. S., HUDSON, M.J. (eds), *Biochemistry and Biotechnology*, p. 270-292, 1987.
- MEDINA, J. C.; BLEINTROTH, W. E.; HASHIZUME, T., Abacaxi – da cultura ao processamento e comercialização, ITAL, 1978.
- MENESTRINA, J. M., IACOMINI, M., JONES, C., GORIN, P. A. J. Similarity of monosaccharide, oligosaccharide and polysaccharide structures in gum exudate of *Anacardium occidentale*, *Phytochemistry*, v. 47, p. 715-721, 1998.
- MOORE, D. J. & CAYGILL, J. C. Proteolytic activity of Malaysian pineapple. *Tropical Science*, London, 21(2): 97-102, 1979.
- NETO, B. B., ISCARMINIO, I., BRUNS, R. E., Planejamento e Otimização de Experimentos. Editora UNICAMP, Campinas – Brasil, 299p., 1995.
- PAPAMICHAEL, N., BORNER, B., HUSTEDT, A. Continuous aqueous-phase extraction of proteins - automated processing and recycling of process chemicals. *Journal of Chemistry Technology and Biotechnology*, v. 54, p. 47-55, 1992.
- PAPAMICHAEL, N., HUSTEDT, A. In: WALTER, H., JOHANSSON, G. (eds), *Enzyme recovery by continuous crosscurrent extraction*, New York; Academic Press, p. 590-599, 1994.

- PAULA, R. C. M., RODRIGUES, J. F. Composition and rheological properties of cashew tree gum, the exudate polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. Carbohydrate polymers, v. 26, p. 177-181, 1995.
- PERSSON, J., JOHANSSON, H-O., TJERNELD, F. Thermoseparating water/polymer system: a novel one-polymer aqueous two-phase system for protein purification. 11th International Conference on Partitioning in Aqueous Two-phase Systems, Gulf Shores, Alabama, USA, June 27-july 2, 1999.
- PORTO, A. L. F. Extração líquido-líquido de proteínas utilizando sistemas de duas fases aquosas em coluna de discos perfurados rotativos. Campinas, 1998, 98p. Tese de Doutorado em Engenharia Química, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas-SP, 1998.
- RABELO, A. P. B. Estudo da eficiência de separação numa coluna de extração líquido-líquido mecanicamente agitada por palhetas rotativas. Campinas, 1995, 166p. Tese de Mestrado em Engenharia Química, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas-SP, 1995.
- RABELO, A. P. B. Estudo e Desenvolvimento de uma Micro-Coluna de Campânulas Pulsantes para a purificação de proteínas. Tese de Doutorado em Engenharia Química, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas-SP, 1999.
- RINAUDO, M., MILAS, M. "Polieletrólitos", ed R.A.M.C. Groote e A.A.S. Curvelo, USP, São Carlos, 1991.
- RITO-PALOMARES, M., HUDDLESTON, J. G. LYDDIAT, A. PEG-phosphate aqueous two phase partition- polymer recycling in practical implementation, Trans I. ChemE., v. 72C, p. 11-13, 1994.
- RODRIGUES, J. F.; PAULA, R. C. M.; COSTA, S. M. O. Métodos de isolamento de gomas naturais: comparação através da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), Polímeros: ciência e tecnologia, ano III, nº1, p. 31-36, 1993.
- ROWAM, A. D.; BUTTLE, D. J. AND BARRETT, A. J., The cysteine proteinase of the pineapple plant. Biochemical Journal, v. 266, n.3, p. 869-75, 1990.

- SARMENTO, M. J., PIRES, M. J., CABRAL, J. M. S. Liquid-liquid extraction of a recombinant protein, cytochrome b5, with aqueous two-phase systems of polyethylene glycol and potassium phosphate salts. *Journal of Chromatography A*, v. 668, p. 117-120, 1994.
- SARUBBO, L. a, Caracterização de um novo sistema bifásico aquoso e aplicação em extração de proteínas com colunas de discos perfurados rotativos. Tese de Doutorado em Engenharia Química, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas-SP, 2000
- SEBASTIÃO, M. J., CABRAL, M. S., AIRES-BARROS, R. Partitioning of recombinant *Fusarium solani pisi* cutinase in polyethylene glycol-aqueous salt solution two-phase systems. *Journal of Chromatography A*, v. 668, p. 139-144, 1994.
- SKUSE, D. R., NORRIS-JONES, R., YALPANI, M., BROOKS, D. E. Hydroxypropil cellulose / poly(ethylene glycol)-co-poly(propylene glycol) aqueous two-phase systems: system characterization and partition of cells and proteins, *Enzyme Microbiology and Technology*, v. 14, p. 785-790, 1992.
- SILVA, C. E. M. & AROLA, F. M. Bromelina. *Boletim SBCTA*, Campinas, 51:29-42, 1980.
- SMITH, F., MONTGOMERY, R. The chemistry of plant gums and mucilages. New York, Reinhold Publishing Corporation, p. 1-13, 1959.
- SMOOT, L. D.; BADD, A. L., Mass Transfer Studies in a Pulsed Extraction Column, *I & EC Fundamentals*, 1 (2), 93-103, 1962
- SPECIAL REPORT - A FOCUS ON GUMS. *Food Technology*, Washington, v., 45, p. 116-131, 1991.
- STEPHEN, A. M. Other plants polysaccharides. In: ASPINALL, G. O. (ed), *The polysaccharides*, New York; Academic Press, v. 2, p. 97-180, 1983.
- STURESSON, S.; TJERNELD, F.; JOHANSSON, G. Partition of macromolecules and cell particles in aqueous two-phase systems based on hydroxypropyl starch and poly(ethylene glycol), *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.3, p. 281-295, 1990.
- SVENSSON, M., BERGGREN, K., VEIDE, A., TJERNELD, F. Aqueous two-phase systems containing self-association block copolymers- partitioning of hydrophilic and hydrophobic biomolecules, *Journal of Chromatography A*, v. 839, p. 71-83, 1999.

- SZLAG, D. C., GIULIANO, K. A. A low cost aqueous two-phase system for enzyme extraction. *Biotechnology Techniques*, v.2, p. 277-282, 1988.
- SUBRAMANIAN, N.; CARTAXO, M. E. Q.; SUBRAMANIAN, S.; FARIAS, J. L. Study of bromelain present in the pineapple plant of paraiba. *Ciência e Cultura*, São Paulo, 30(11): 1326-32, 1978.
- SUH, H. J.; LEE, H. CHO, H. Y. AND YANG, H. C., Purification and characterization of bromelain isolated from pineapple. *Journal of Korean Agricultural Chemical Society*, v. 35, n.4, p.300-7, 1992.
- TINTINGER, R., ZHU, J., GROßMANN, C., MAURER, G. Partitioning of some amino acids and low molecular mass peptides in aqueous two-phase systems of poly(ethylene glycol) and dextran in the presence of small amounts of K_2HPO_4/KH_2PO_4 buffer at 293 K; experimental results and predictions, *Journal of Chemical Engineering Data*, v. 42, p. 975-984, 1997.
- TISSEAU, R. activité proteolitique de l'ananas utilisé em conserverie et ses déchets. *Fruits*, Paris, 32(2): 87-92, 1977.
- TJERNELD, F., BERNER, S., CAJARVILLE, A. E., JOHANSSON, G. New aqueous two-phase system based on hydroxypropil starch useful in enzyme purification. *Enzyme Microbiology Technology*, v. 8, p. 417- 423, 1986.
- TJERNELD, F., JOHANSSON, G., JOELSSON, M. Affinity liquid-liquid extraction of lactate dehydrogenase in large scale, ***Biotechnology and Bioengineering***, v.30, p. 809-816, 1987.
- TJERNELD, F., JOHANSSON, G. Aqueous two-phase systems for biotechnical use. *Bioseparation*, v. 1, p. 255-263, 1990.
- TREYBAL, R. E. *Liquid extraction*, New York; McGraw-Hill, 2 ed., 1963.
- van DIJCK, W.J.O., U.S. Patent 2,001, 1986 (1935).
- van BERLO, M.; LUYBEN, K.; van DER WIELEN L.A.M.; Poly(ethylene glycol)- Salt Aqueous Two-phase systems with easily reciclable volatile salts, *Journal of Chromatography B*, 711 (1-2), 61-68, 1998.

- VENÂNCIO, A. A. D. Caracterização de novos sistemas para partição bifásica aquosa de biomoléculas. Minho, 1996, 145p. Tese de Doutorado em Engenharia Biológica. Escola de Engenharia, Universidade do Minho-Portugal, 1996.
- VENÂNCIO, A. A. D.; TEIXEIRA, J. A.; MOTA, M. Evaluation of crude hydroxypropil starch as a bioseparation aqueous two-phase-forming polymer. *Biotechnology Progress*, v. 09, p. 635-639, 1993.
- WALTER, H., JOHANSSON, G. Partitioning in aqueous two-phase systems; an overview. *Analytical Biochemistry*, v. 155, p. 215-242, 1986.
- WALTER, H., JOHANSSON, G. Aqueous two-phase systems. Academic Press, New York, 1994.
- ZASLASVSKY, B. Y. Aqueous two-phase partitioning - Physical Chemistry and Bioanalytical Applications, New York, Mercel Dekker, 695p. 1995.
- ZASLASVSKY, B. Y., BAGIROV, T. O., BOROVS KAYA, A. A., GASANOVA, G. Z., GULAEVA, N. D., LEVIN, V. Y., MASIMOV, E. A., MAHMUDOV, A. U., MESTECHKINA, N. M., MIHEEVA, L. M., OSIPOV, N. N. ROGOZHIN, S. V. Aqueous biphasic systems formed by nonionic polymers II: Concentrations effects of inorganic salts on phase separation, *Colloid & Polymer Science*, v. 265, p. 548, 1987.
- ZASLASVSKY, B. Y. BAGIROV, T. O., BOROVS KAYA, A. A., GULAEVA, N. D., MIHEEVA, L. M., MAHMUDOV, A. U., RODNIKOVA, M. N. *Polymer*, v. 30, p. 2104, 1989.
- ZASLASVSKY, B. Y., MAHMUDOV, A. U., BAGIROV, T. O., BOROVS KAYA, A. A., GASANOVA, G. Z., GULAEVA, N. D., LEVIN, V. Y., MESTECHKINA, N. M., MIHEEVA, L. M., RODNIKOVA, M. N. Aqueous biphasic systems formed by nonionic polymers I: effects of inorganic salts on phase separation, *Colloid & Polymer Science*, v. 264, p. 1066, 1986.