

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

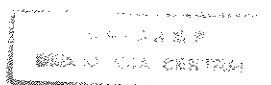
**EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DE PROTEÍNAS UTILIZANDO
SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS EM COLUNA DE
DISCOS PERFURADOS ROTATIVOS**

Ana Lúcia Figueiredo Porto
Orientador: Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi

Tese que apresenta à comissão de
Pós-Graduação da Faculdade de
Engenharia Química da Universidade
Estadual de Campinas como parte
dos requisitos exigidos para obtenção
o Título de Doutor em Engenharia
Química

**Área de Concentração: Sistemas
de Processos Químicos e
Informática**

Campinas-São Paulo-Brasil
Junho-1998



1998/6/8

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DE PROTEÍNAS UTILIZANDO SISTEMAS DE DUAS FASES
AQUOSAS EM COLUNA DE DISCOS PERFURADOS ROTATIVOS

Ana Lúcia Figueiredo Porto

Tese de Doutorado defendida e aprovada, em 30 de junho de 1998, pela Banca Examinadora constituída pelos professores:

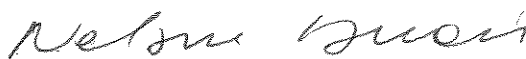


Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi
FEQ-DESQ-UNICAMP

Orientador



Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho
LIKA-UFPE



Prof. Dr. Nelson Eduardo Duran Caballero
IQ-UNICAMP



Profa. Dra. Telma Teixeira Franco



Profa. Dra. Lúcia Helena Innocentini Mei
FEQ-DTP- UNICAMP

Esta versão corresponde a redação final da Tese de Doutorado, defendida por Ana Lúcia Figueiredo Porto, e aprovada pela Comissão Julgadora em 30 de junho de 1998.

A handwritten signature in black ink, consisting of stylized initials and a long horizontal flourish.

Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi

Orientador

À EVERALDO SANTOS PORTO (in memorian)
e NADYR FIGUEIREDO PORTO, meus pais e
ETELVINA DE SOUSA FIGUEIREDO (in
memorian), minha avó, pelo amor, dedicação,
compreensão e perseverança.

À meu marido **ADILSON DE CASTRO CHAVES** e
RENATA PORTO CHAVES, minha filha, pelo incentivo,
paciência e dedicação durante esta etapa de vida.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Elias Basile Tambourgi, pela orientação científica da tese, acompanhamento contínuo, pela disponibilidade em esclarecer dúvidas, profissionalismo, e amigo sempre presente em todas as etapas deste trabalho.

Aos professores Drs. Joaquim Manuel Sampaio Cabral e Maria Raquel Aires-Barros, pela oportunidade proporcionada na supervisão da bolsa sanduíche desenvolvida no Laboratório de Engenharia Biológica do Instituto Superior Técnico, exemplo de profissionais comprometidos com o desenvolvimento da Biotecnologia .

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (CAPES), programa PICDT, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico-CNPq - programa de bolsas no exterior, pelo apoio financeiro.

Ao professor Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Jr., Diretor do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), pela amizade e acesso aos laboratórios desta instituição, na realização deste trabalho.

Ao professor Dr. José Luiz de Lima Filho , pelo total acesso ao Setor de Biotecnologia do LIKA, apoio científico e amizade.

À professora Galba Maria de Campos Takaki, amiga e grande incentivadora de minha carreira científica.

Às professoras Ana Maria dos Anjos Carneiro Leão, Kaoru Okada, Laura Vevínea , Lúcia Roberta Barbosa, Leonie Asfora Sarubbo, Maria das Graças Carneiro da Cunha, Maria do Carmo B. Pimentel, Norma Buarque de Gusmão, pela amizade, e companheirismo que sempre se fez presente.

À professora Dra. Elizabeth Malagueno de Santana e a bióloga Adriana Telles, pelo acesso ao Laboratório de Imunologia do LIKA, parceria científica e amizade.

À Pedro Fernandes e Carlos Alberto da Silva Alves, pela amizade e pelo tranquilo convívio durante um ano de bolsa sanduíche em Lisboa, no laboratório 8 do Instituto Superior Técnico.

À Conceição Venâncio e D. Cecília Silva pela amizade e ajuda no acesso dos serviços burocráticos e bibliográficos da Secção de Biotecnologia do Instituto Superior Técnico.

À Severino Humberto Almeida, técnico do setor de Biotecnologia-LIKA , por sua amizade e pela sempre dedicada colaboração na parte experimental desta pesquisa.

À Severino Humberto Almeida, técnico do setor de Biotecnologia-LIKA , por sua amizade e pela sempre dedicada colaboração na parte experimental desta pesquisa.

Ao pessoal da secretaria do LIKA pelo apoio e dedicação na resolução de toda parte burocrática do trabalho experimental.

À todos integrantes do laboratório de Biotecnologia do LIKA, pelo companheirismo e ótimo convívio durante a execução deste trabalho.

Aos meus queridos alunos de iniciação científica e mestrado: Patrícia Barroca, Katarina Mirna, Homero Melo, Felipe Fernandes, Taciana, Keila Aparecida, Ana Idalina, pelo auxílio incansável dado durante a execução deste trabalho.

À professora Dra. Maria Helena Andrade Santana, Coordenadora da Pós-Graduação do Departamento de Engenharia Química da UNICAMP, pela oportunidade proporcionada.

À nossa querida secretária de Pós-Graduação Rosa Moretti, pela disposição em sempre atender bem e com eficiência.

Aos professores do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE, pelo incentivo e auxílio nos encargos docentes durante a realização deste trabalho.

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

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABELAS	IV
LISTA DE ABREVIATURAS	V
RESUMO	VI
1.0-INTRODUÇÃO	01
2.0-REVISÃO DA LITERATURA	05
2.1-Sistemas bifásicos aquosos	06
2.2-Características dos sistemas bifásicos aquosos	07
2.3-Diagramas de fase	11
2.4-Fatores que influenciam a partição de biomoléculas num sistema bifásico aquoso	13
2.5-Extração com sistemas bifásicos aquosos à escala laboratorial	15
2.6-Aplicações dos sistemas bifásicos aquosos em grande escala	16
2.7-Principais equipamentos utilizados na extração líquido-líquido	18
2.8-Extração contínua com sistemas de duas fases	22
2.9- Extração contínua em coluna de discos perfurados rotativos	23
2.10-Citocromo b5, protease e ascorbato oxidase	25
3.0-MATERIAIS	28
3.1-Proteínas	28
3.1.1-Citocromo b5	28
3.1.2-Protease	28
3.1.3-Ascorbato oxidase	28

3.1.2-Ascorbato oxidase	28
3.1.3-Albumina de soro bovina	28
3.2- Reagentes	28
3.2.1-Polímeros e sais constituintes dos sistemas bifásicos	28
3.2.2-Outros reagentes	29
3.3-Meios de Cultura	29
3.3.1-Meio de manutenção/ Produção de citocromo b5	29
3.3.2-Meio de esporulação e manutenção	29
3.3.2-Meio de produção da protease	30
3.4- Coluna de extração líquido-líquido	31
4.0-MÉTODOS	34
4.1-Produção de citocromo b5 e ruptura celular	34
4.2-Produção da protease	34
4.3-Extração da ascorbato oxidase	35
4.4-Determinação da atividade proteásica	35
4.5-Determinação da atividade ascorbato oxidase	36
4.6-Preparação dos sistemas de duas fases aquosas	37
4.7- Extração descontínua: estudos de partição do citocromo b5, albumina do soro bovino, protease e ascorbato oxidase em sistemas bifásicos aquosos	38
4.8-Extração contínua utilizando a coluna de discos perfurados rotativos	39
4.9- Determinação do coeficiente de partição (K) das proteínas	40
4.10-Cálculo da fração retida da fase dispersa (" hold up")	40
4.11-Determinação do coeficiente de transferência de massa (K_{Da})	41

4.12-Determinação do fator de purificação (F.P.)	42
4.13-Cálculo da eficiência de extração : Eficiência de Murphree	43
4.14-Determinação da massa específica e viscosidade dos diversos sistemas PEG-Sais	43
4.15-Determinações analíticas	44
4.15.1-Determinação da quantidade de proteína total	44
4.15.2-Determinação da concentração de citocromo b5	45
5.0-RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1-Efeito da velocidade de rotação sob a fração retida da fase dispersa	48
5.2—Efeito da velocidade de rotação no coeficiente de transferência massa (Kda)	51
5.3-Efeito da velocidade de rotação na eficiência de separação (Eficiência de Murphree)	52
5.4-Influência da velocidade da fase dispersa na fração retida da fase dispersa em diferentes composições dos sistemas aquosos	53
5.5-Influência da vazão de alimentação na Eficiência de separação (Eficiência de Murphree) em diferentes composições dos sistemas bifásicos aquosos	57
5.6-Influência da vazão de alimentação no coeficiente de transferência de massa (Kda) em diferentes composições dos sistemas bifásicos aquosos	60
5.7-Extração descontínua do citocromo b5, protease e ascorbato oxidase	65
5.71-- Efeito da massa molecular do PEG na partição da protease e ascorbato oxidase	66
5.8-Extração contínua utilizando coluna de discos perfurados rotativos utilizando sistemas de duas fases aquosas para extração de citocromo b5, protease e ascorbato oxidase	75

5.9-Comparação entre os dados de extração líquido-líquido de modo descontínuo e contínuo do citocromo b5, protease e ascorbato oxidase	83
6.0- CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTURO	85
6.1-Sugestões Para Trabalho Futuro	87
7.0- ADENDO	89
8.0- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1- Diagrama de fases do sistema PEG 4000-fosfatos de potássio, à temperatura de 20°C e pH 7,0 (adaptado de Albertsson,1986). Onde: H- composição da solução homogênea; M- composição global do sistema bifásico; C- composição da fase de cima; B- composição da fase de baixo; P- ponto crítico.	12
Figura 2.2- Esquema de um extrator em estágios discretos	19
Figura 2.3- Extratores diferenciais que atuam sob a força da gravidade. Em (A) Coluna de pratos fixos perfurados, (B) coluna recheada e (C) Coluna spray.	19
Figura 2.4- Extratores diferenciais mecanicamente agitados. Em (A) coluna de fluxo pulsado, (B) coluna de pratos pulsados e em (C) coluna de discos rotativos	21
Figura 3.1- Coluna de discos perfurados rotativos em operação (A) , em (B) a coluna com mais detalhes, onde pode-se observar o eixo com os discos e as bombas de alimentação, a alimentação da fase leve e drenagem da fase pesada foi realizada pela parte inferior da coluna, e pelo topo da coluna ocorreu a alimentação da fase pesada e drenagem da fase leve (indicado pela fita amarela).	32
Figura 5.1- Efeito da velocidade de rotação na fração retida da fase dispersa	49
Figura 5.2- Efeito da velocidade de rotação no coeficiente de transferência de massa (Kda)	52
Figura 5.3- Efeito da velocidade de rotação na eficiência de separação (Eficiência de Murphree)	53
Figura 5.4- Efeito da velocidade da fase dispersa na fração retida da fase dispersa em sistemas PEG 550-Sais de fosfatos	55
Figura 5.5- Efeito da velocidade da fase dispersa na fração retida da fase dispersa em sistemas PEG 1000- Sais de fosfatos	55
Figura 5.6- Efeito da velocidade da fase dispersa na fração retida da fase dispersa em sistemas PEG 3350-Sais de fosfatos.	56

Figura 5.8- Efeito da vazão total de alimentação na Eficiência de separação em diferentes composições do sistema PEG 550.	58
Figura 5.9- Efeito da vazão total de alimentação na Eficiência de separação em diferentes composições do sistema PEG 1000.	59
Figura 5.10- Efeito da vazão total de alimentação na Eficiência de separação em diferentes composições do sistema PEG 3350.	59
Figura 5.11- Efeito da vazão total de alimentação na Eficiência de separação em diferentes composições do sistema PEG 8000	60
Figura 5.12- Influência da vazão total de alimentação sobre o coeficiente de transferência de massa em diferentes composições dos sistemas PEG 550- Fosfatos de potássio	61
Figura 5.13- Influência da vazão total de alimentação sobre o coeficiente de transferência de massa em diferentes composições dos sistemas PEG 1000-Fosfatos de potássio.	61
Figura 5.14- Influência da vazão total de alimentação sobre o coeficiente de transferência de massa em diferentes composições dos sistemas PEG 3350- Fosfatos de potássio	62
Figura 5.15- Influência da vazão total de alimentação sobre o coeficiente de transferência de massa em diferentes composições dos sistemas PEG 8000- Fosfatos de potássio	62
Figura 5.16- Efeito da massa molecular do polímero PEG sobre o coeficiente de partição da protease.	69
Figura 5.17- Efeito da massa molecular do polímero PEG sobre o coeficiente de partição da ascorbato oxidase.	69
Figura 5.18- Efeito da massa molecular do PEG na recuperação da atividade enzimática da protease.	71
Figura 5.19- Efeito da massa molecular do PEG na recuperação da atividade enzimática da ascorbato oxidase.	71
Figura 5.20 a - Proteína total e quantidade de citocromo b5 extraída na fase salina (extrato), após extração com sistemas PEG 1000-Fosfatos de potássio (18% e 16% p/p) e pH 7,3, a partir do seu extrato bruto na presença de fragmentos celulares.	78

- Figura 5.20b** - Proteína total e quantidade de citocromo b5 residual na fase salina (refinado), após extração com sistemas PEG 1000-Fosfatos de potássio (18% e 16% p/p) e pH 7,3, a partir do seu extrato bruto na presença de fragmentos celulares. 78
- Figura 5.21 a** - Proteína total e atividade proteásica extraída na fase PEG (extrato), após extração com sistemas PEG 1000-Fosfatos de potássio (19,7% e 17,7% p/p) e pH 7,0, a partir do seu extrato bruto. 80
- Figura 5.21 b** - Proteína total e atividade proteásica residual na fase salina (refinado), após extração com sistemas PEG 1000-Fosfatos de potássio (19,7% e 17,7% p/p) e pH 7,0, a partir do seu extrato bruto. 80
- Figura 5.22 a** - Proteína total e atividade ascorbato oxidase extraída na fase salina (extrato), após extração com sistemas PEG 1000-Fosfatos de potássio (19,7% e 17,7% p/p) e pH 6,0, a partir do seu extrato bruto com fragmentos celulares. 81
- Figura 5.22 b** - Proteína total e atividade ascorbato oxidase residual na fase PEG (refinado), após extração com sistemas PEG 1000-Fosfatos de potássio (19,7% e 17,7% p/p) e pH 6,0, a partir do seu extrato bruto com fragmentos celulares. 81

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1- Exemplos de sistemas de duas fases aquosas, adaptado de Sebastião <i>et al.</i> , 1996.	08
Tabela 2.2- Exemplos de purificação de proteínas em larga escala por passos subsequentes de extração obtidos do Departamento de Tecnologia Enzimática do GBF- Braunschweig-Alemanha, adaptado de Albertsson <i>et al.</i> , 1990.	16
Tabela 3.1- Reagentes utilizados nas várias etapas do trabalho experimental.	33
Tabela 4.1- Composição dos diversos sistemas de duas fases aquosas utilizados na extração líquido-líquido de proteínas.	38
Tabela 4.2- Variáveis estudadas na extração contínua da proteína modelo BSA com sistemas de duas fases, em coluna de discos perfurados rotativos.	40
Tabela 5.1- Propriedades reológicas, densidade e viscosidade, das duas fases dos sistemas de duas fases estudados (PEG-Fosfato de potássio).	57
Tabela 5.2- Extração líquido-líquido de protease a partir de seu extrato impuro usando sistemas PEG-fosfatos .	74
Tabela 5.3- Extração líquido-líquido de ascorbato oxidase a partir de seu extrato impuro usando sistemas PEG-fosfatos .	74
Tabela 5.4- Comparação dos resultados obtidos pela extração líquido-líquido em sistema bifásico aquoso com proteínas em modo descontínuo e contínuo.	84

LISTA DE ABREVIATURAS

MS2-	Meio de soja 2
NRRL-	Northern Regional Research Laboratory Collection
Tris-	tris- (hidroximetil)aminometano
PEG-	Polietileno Glicol
EDTA-	Etilenodiaminotetracético
PRDC-	Coluna de Discos Perfurados Rotativos
RDC-	Coluna de Discos Rotativos
BSA-	Albumina do soro bovino
Vd-	Velocidade da fase dispersa
Vc-	Velocidade da fase contínua
K-	Coeficiente de partição
Kda-	Coeficiente de transferência de massa

RESUMO

Sistemas de duas fases aquosas constituídos por Polietileno Glicol e Sais de fosfatos, com diferentes massas moleculares do polímero, em diferentes comprimentos de "tie lines" a pH 7,0, foram empregados para caracterização hidrodinâmica destes sistemas em coluna de discos perfurados rotativos (PRDC), utilizando a albumina de soro bovino como proteína modelo.

O desempenho deste tipo de equipamento foi caracterizado a partir de análise dos estudos da Fração Retida da Fase Dispersa ("hold up"), do Coeficiente de Transferência de Massa (K_d) e da Eficiência de Separação (Eficiência de Murphree). Os estudos de transferência de massa e eficiência de separação foram baseados na partição da albumina sérica bovina por meio de extração em coluna PRDC operada de modo contracorrente e contínuo, durante 70 minutos de operação, onde a fase dispersa foi constituída pela fase rica em PEG (leve) e a fase contínua a fase rica em sal (pesada). Foram realizadas variações da velocidade de rotação, velocidade da fase dispersa e composição dos sistemas e avaliado o comportamento do fração retida da fase dispersa, coeficiente de transferência de massa e da eficiência de separação.

Os resultados obtidos demonstraram que o melhor valor de coeficiente de transferência de massa foi obtido com a velocidade de rotação de 140rpm , e que a eficiência de separação é praticamente independente da velocidade de rotação. Os maiores valores da fração retida da fase dispersa , coeficiente de transferência de massa e eficiência de separação foram obtidos com a velocidade da fase dispersa de 3,0 ml/min, e que os mesmos diminuem a medida que aumenta a composição dos sistemas.

Foram também realizados estudos de extração contínua a partir dos extratos impuros da proteína citocromo b5, e das enzimas protease e ascorbato oxidase, utilizando as condições ótimas obtidas a partir de suas extrações em descontínuo. Os resultados demonstraram uma extração em proteína total de 38,5%, 44% e 48% para a protease, citocromo b5 e ascorbato oxidase, respectivamente. A aplicação deste tipo de equipamento permitiu fator de purificação para citocromo b5 de 2, protease de 4 e 22 para ascorbato oxidase . A recuperação em atividade para protease, ascorbato oxidase e citocromo b5 foi 100%, 112% e 78%, respectivamente.

Os valores obtidos a partir da utilização de sistemas de duas fases aquosas em coluna de discos perfurados rotativos, comprovam a possível utilização deste tipo de equipamento em escala industrial.

ABSTRACT

Aqueous two-phase systems constituted by polyethylene glycol and phosphate salts with different polymers molecular mass and tieline lenghts (pH 7.0) were used for hydrodynamic characterization of these systems in a continuous perforated rotating disc contactor (PRDC) usind bovine serum albumin as the standard protein.

The performance of this kind of equipment was investigated from the analyses of the fractional dispersed phase hold up studies, partition coefficient, mass transfer (Kda) and separation efficiency (Murphree efficiency). The studies of mass transfer and separation efficiency were based in the bovine serum albumin partition throughout the extraction in a contactor (PRDC) operated in countercurrent and in a continuous mode during 70 minutes of operation, where the dispersed phase was constituted by the PEG rich phase (light phase) and the continuous phase by the salts (heavy phase). Variations in the rotation velocity, dispersed phase velocity and systems compositions were investigated and the hod up of the dispersed phase behaviour, mass transfer coefficient and separation efficiency were evaluated.

The results obtained showed that the best mass transfer coefficient value was achieved with a rotation velocity of 140 rpm and the separation efficiency was practically independent on the rotation velocity. The highest values of the fractional dispersed phase hold up, mass transfer and coefficient separation coefficient were obtained with the velocity of 3.0 ml/min, and they decreased when the composition systems increased.

Continuous extraction studies were also performed from the impure extracts of the protein cytochrome b₅ and the enzymes protease and ascorbic oxidoreductase, utilizing the optimal conditions obtained from the discontinuous extraction of these. The results demonstrated a total protein extraction of 38.5%, 44% and 48% for protease, cytochrome b₅ and ascorbic oxidoreductase, respectively. The application of this kind of equipment permitted a purification factor of 2 for cytochrome b₅, 4 for protease and 22 for ascorbic oxidoreductase. The activity recovery for protease, ascorbic oxidoreductase and cytochrome b₅ was 100%, 112% and 78%, respectively.

The values obtained from the utilization of aqueous two-phase systems in a continuous perforated rotating disc contactor confirm a possible utilization of this kind of equipment in industrial scale.

1.0- INTRODUÇÃO

A extração líquido-líquido é um processo bem estabelecido na indústria química, incluindo várias aplicações na indústria bioquímica tradicional, como por exemplo, a de antibióticos, sendo largamente utilizada para substâncias lábeis, uma vez que muitas técnicas de separação sólido-líquido usadas nos processos industriais bioquímicos, tais como filtração e centrifugação, são fortemente dependentes do tamanho da partícula e são limitadas quando se trata de processamento de células bacterianas ou de resíduos celulares. A extração líquido-líquido com solventes orgânicos tem apresentado aplicação limitada no processamento de bioprodutos sensíveis como proteínas e ácidos nucleicos devido às suas baixas solubilidades no solvente orgânico e pelo efeito desnaturante deste último (Cabral *et al.*,1993).

O impulso das pesquisas e no desenvolvimento na área de bioseparação têm sido limitado pela dificuldade e complexidade do processo de "downstream" de produtos farmacêuticos e biológicos. Cerca de 50 a 90% do custo de produção para um produto biológico reside na estratégia de purificação, havendo necessidade de uma técnica de bioseparação em larga escala que seja eficiente e econômica e que atinja altos graus de recuperação e pureza, mantendo a atividade biológica da molécula. Uma promissora técnica de extração e purificação, que enquadra-se nestes critérios envolve a partição de biomoléculas entre duas ou mais fases imiscíveis nos sistemas aquosos (Diamond *et al.*,1992).

A extração líquido-líquido utilizando sistemas de duas fases aquosas tem sido um tópico de grande interesse nestes últimos anos, os sistemas PEG-Dextran/Água e

PEG/Sal/Água têm sido os mais frequentemente investigados e utilizados para purificação de biomoléculas (Diamond *et al.*, 1992).

Sistemas aquosos de duas fases são extremamente potentes para separação e análise de partículas biológicas. Nas últimas três décadas, muitos pesquisadores têm aplicado estes sistemas para separação em escala laboratorial de proteínas, células, organelas celulares, vírus, fragmentos de membrana celular e outros materiais biológicos.

Uma preocupação maior vem sendo dada a ampliação deste tipo de extração em escala laboratorial para larga escala (Husted *et al.*, 1985a; Papamichael *et al.*, 1992).

O interessante do emprego dos sistemas de duas fases aquosas 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 químicos 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 às bioseparações (Coimbra, 1995).

Estudos preliminares com sistemas de duas fases aquosas com colunas tipo spray, York-Scheibel (Sawant *et al.*, 1990; Raghav Rao *et al.*, 1991; Jafarabad *et al.*, 1992 a e b; Pawar *et al.*, 1997) de maneira semi-contínua, e contactor Graesser (Dos Reis Coimbra *et al.*, 1994) de modo contínuo, já foram realizados.

Nestes estudos observou-se uma tensão interfacial em torno de 1 a 3 ordens de grandeza abaixo daquela encontrada em sistemas orgânicos convencionais em quanto a viscosidade entre as fases é elevada, principalmente para sistemas contendo biomassa (Kula, 1990). Apesar destes parâmetros encontrados, vários são os estudos realizados sobre aplicabilidade dos sistemas de duas fases aquosos para purificação contínua de proteínas, como demonstrado por Hustdet et al., 1987 usando diferentes sistemas extração.

O uso de processos de purificação de proteínas conduzido de modo contínuo e em contra corrente, usando equipamentos da clássica extração líquido-líquido, conduz a redução dos custos fixos e variáveis, bem como possibilita a automação do processo, e a reciclagem contínua dos produtos químicos, diminuindo o tempo de processamento e minimizando o espaço físico ocupado, já que as unidades não são volumosas (Kula, 1990; Greve *et al.*, 1991b).

Entre os equipamentos que operam em contracorrente e de modo contínuo, colunas de discos perfurados rotativos (PRDC), tornam-se um alternativa muito atrativa quando comparada com outros equipamentos convencionais de extração líquido-líquido, uma vez que não existe nada na literatura referente a extração com sistemas de duas fases aquosas com este tipo de equipamento.

No presente trabalho, utilizaremos uma coluna de discos perfurados rotativos para a extração e purificação de proteínas a partir de seus extratos brutos, estudos estes ainda sem referência na literatura.

A avaliação do desempenho operacional deste equipamento foi realizada com base na sua caracterização hidrodinâmica através do estudo da influência da

velocidade de rotação , velocidade da fase dispersa e vazão total de alimentação sob a fração retida da fase dispersa, o coeficiente de transferência de massa e a eficiência de separação, utilizando como proteína “modelo” a albumina sérica bovina em sistemas bifásicos aquosos PEG-Sais de fosfatos.

Ainda foram realizados estudos de extração descontínua da protease e ascorbato oxidase obtidas a partir de *Streptomyces clavuligerus* e *Curcubita maxima* ,respectivamente, de modo a selecionar os melhores sistemas de extração destas enzimas juntamente com o sistema já citado na literatura para o citocromo b5 e utilizá-los na extração contínua com colunas de discos perfurados rotativos.

Finalmente, procurou-se comparar os dados obtidos de rendimento em proteína total, em recuperação da atividade e do fator de purificação para os dois modos de extração (descontínua e contínua).

2.0- REVISÃO DA LITERATURA

A extração líquido-líquido é um processo de separação de componentes em solução pela sua distribuição entre duas fases líquidas imiscíveis: uma solução alimentadora (soluto mais solvente alimentador, normalmente a água) e solvente extrator. A operação de extração líquido-líquido consiste dos seguintes passos:

- a) contato entre o solvente extrator e a solução alimentadora contendo o componente (ou componentes) a ser extraído de modo que o soluto será transferido da solução alimentadora para o solvente extrator;
- b) separação de duas fases imiscíveis com recuperação do solvente .

A fase contendo o solvente extrator que abandona o extrator líquido-líquido é chamada de fase extrato e a fase líquida que após ter tido contato com o solvente extrator deixa o extrator é a fase refinado (Kennedy e Cabral, 1993).

A extração líquido-líquido é uma operação unitária que apresenta muitas vantagens, tornando-a bastante atrativa como processo de separação. O seu "scale up" é relativamente fácil e normalmente não envolve complicados e caros equipamentos, já apresentando uma grande experiência por parte das indústrias químicas na aplicação desta tecnologia de separação (Matiassonn *et al.*, 1987).

Quando se trata de moléculas biológicas, parâmetros tais como solubilidade e estabilidade estão muito combinados com o meio de extração normalmente aplicados nas indústrias. Vários são os critérios usados para seleção de um meio de extração para aplicações biotecnológicas, dentre eles podemos citar:

- não ser tóxico para o sistema biológico;

- ser fácil a separação do produto a partir do meio extrator;
- ser barato e disponível em grande quantidade;
- ser possível esterilizar;
- ser imiscível em solução de água;
- não possuir capacidade de formar emulsões estáveis com material biológico;
- não ser inflamável;
- não ser tóxico para o homem .

Quando se opera com macromoléculas biológicas ou células, um número limitado de solventes apropriados estão disponíveis, e com a introdução de sistemas bifásicos aquosos, esta lacuna foi preenchida substancialmente , uma vez que este tipo de sistema enquadra-se nos critérios requeridos para os processos biotecnológicos de separação (Matiasson *et al.*(1987).

2.1- Sistemas bifásicos aquosos

A extração líquido-líquido utilizando sistemas de duas fases aquosas tem sido um tópico de grande interesse nestes últimos anos, e foi primeiramente descrito na literatura por Beijerinck (1896), quando ele descobriu que gelatina , ágar e água quando eram misturados a certas concentrações formava um sistema de duas fases, sendo a fase superior rica em gelatina e a fase inferior rica em ágar. Posteriormente, nos anos 50, Per-Ake Albertsson descobriu que o polietileno glicol (PEG), fosfatos de potássio e água, e assim como PEG, dextran e água formavam sistema de duas fases. Os sistemas PEG-Dextran-Água e PEG-Sal-Água têm sido, desde então, os mais

frequentemente investigados e utilizados para purificação de um grande número de biomoléculas (Diamond *et al.*, 1992).

Foi Albertsson que reconheceu a possível utilização destes sistemas como método de separação aplicado a biomacromoléculas, partículas celulares e células intactas sob condições que preservassem a sua atividade biológica, estabelecendo um grande número de diagramas de fase de vários sistemas de duas fases aquosas, descrevendo também as suas propriedades físico-químicas básicas (Albertsson, 1986).

Os sistemas de duas fases aquosas são geralmente formados por uma solução aquosa de dois polímeros hidrófilos ou de um polímero e de determinados sais. Acima da concentração crítica destes componentes ocorre espontaneamente a separação de fases, predominando um ou outro componente em cada uma das fases resultantes. A Tabela 2.1 está apresentado exemplos de pares de componentes utilizados na preparação de sistemas de duas fases aquosas para aplicações biotecnológicas (Sebastião *et al.*, 1996).

2.2- Características dos sistemas bifásicos aquosos

Os sistemas bifásicos aquosos apresentam uma característica bem particular de apresentarem em sua composição cerca de 85-99% do seu conteúdo em água, o que permite a partição de biomoléculas e de partículas celulares em condições não desnaturantes.

Tabela 2.1- Exemplos de sistemas de duas fases aquosas, adaptado de Sebastião *et al.*,1996.

Componente 1	Componente 2	Referência
Polietileno glicol	Dextrano	Albertsson,1986
Polietileno glicol	Hidroxipropilamido (AquaphasePPT*,Reppal* PES, preparações utilizadas nas indústrias do papel, alimentar e têxtil)	Tjerneld <i>et al.</i> ,1986 Buitelaar <i>et al.</i> ,1992 Venâncio <i>et al.</i> ,1993
Polietileno glicol	Fosfato de potássio	Albertsson,1986
Polietileno glicol	Sulfato de potássio	Albertsson,1986
Polietileno glicol	Sulfato de magnésio	Eitman e Gainer,1990
Polietileno glicol	Sulfato de amônio	Yang <i>et al.</i> ,1995
Ficol	Dextrano	Albertsson,1986
Álcool polivinílico	Co-polímeros acrílicos	Hughes e Lowe, 1988
Co-polímeros não iônicos de óxido de etileno e óxido de propileno	Dextrano/hidroxipropilamido	Alred <i>et al.</i> ,1994 Modlin <i>et al.</i> ,1994
Detergentes não iônicos baseados no polioxietileno (Triton X, Triton N, tween	-	Sánchez-Ferrer <i>et al.</i> ,1994a,b

*São designações do hidroxipropilamido comerciais

A tensão interfacial entre as fases 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-Dextran (Kula, 1985).

Esta baixa tensão interfacial minimiza também a desnaturação de biomoléculas que condensam na interface, preservando a sua atividade biológica, permitindo que o equilíbrio seja atingido mais rapidamente, embora que penalizando os tempos de separação de fases (Diamond *et al.*,1992).

Com relação a densidade nos sistemas bifásicos aquosos, devido ao elevado conteúdo de água, a densidade das fases é aproximadamente igual a 1 (Albertsson, 1986). A diferença de densidade entre as fases nestes sistemas é também pequena, sendo maior para sistemas PEG-Fosfatos do que para sistemas PEG-Dextran (Kula, 1985).

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

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

De acordo com Albertsson (1986) as principais vantagens dos sistemas bifásicos aquosos são:

- facilidade no aumento de escala;
- rápida transferência de massa;
- equilíbrio alcançado com recurso a baixas energias na forma de mistura mecânica;
- enzimas estabilizadas pelos polímeros;
- possibilidade de operação em contínuo;
- possibilidade de separação rápida e seletiva;
- possibilidade de operação à temperatura ambiente;
- mais econômico que outros processos de separação.

2.3- Diagramas de fase

Para obter duas fases aquosas imiscíveis a partir de uma solução de dois polímeros ou de um polímero e de um sal é necessário que as concentrações daqueles componentes excedam determinados valores. Esses valores podem ser conhecidos através do diagrama de fases do sistema em questão.

A Figura 2.1 mostra o diagrama de fases correspondente ao sistema PEG 4000-Fosfatos de potássio, à temperatura de 20°C e pH 7,0 (adaptado de Albertsson, 1986). Uma solução homogênea é obtida quando as concentrações de PEG e fosfatos se encontram abaixo da linha curva denominada binodal. Este é o caso do sistema de composição total H. Para concentrações situadas acima da binodal (caso da mistura com composição global M) ocorre separação de fases (Sebastião *et al.*, 1996).

A composição da fase de cima do sistema M é representada pelo ponto C e as concentrações de PEG e sal no equilíbrio referentes à fase de baixo do mesmo sistema são dadas pelo ponto B do diagrama. A linha que une o ponto C ao ponto B passando pelo ponto M chama-se "tie line" (Figura 2.1). Cada par de concentrações de PEG e sal pertencente a uma mesma "tie line" originará um sistema bifásico idêntico, diferindo apenas na razão de volumes entre as fases de cima e de baixo (Kula *et al.*, 1982). A razão de volume de fases do sistema M pode ser obtida diretamente do diagrama de fases através da razão entre os segmentos de reta MB e MC (Cabral *et al.*, 1992).

No ponto crítico ,P, em que a adição de uma quantidade muito pequena de água transforma um sistema de duas fases aquosas numa solução homogênea, as duas fases possuem teoricamente composições e volumes idênticos (Kula *et al.*, 1982).

Num dado sistema, a composição que dá origem à formação de duas fases varia com a massa molecular dos polímeros, com a temperatura e com os sais presentes. Assim aumentando a massa molecular de um dos polímeros a separação de fases é obtida com concentrações de polímero mais baixas, isto é, a binodal sofre um deslocamento no sentido da origem no diagrama de fases e as fases apresentam um maior conteúdo em água (Venâncio, 1996).

Nos sistemas bifásicos aquosos formados por dois polímeros, o aumento da temperatura promove uma maior miscibilidade entre os polímeros constituintes do sistema e, conseqüentemente, a binodal sofre um deslocamento, afastando-se da origem do diagrama de fases. Estas regras, inicialmente estudadas para o sistema dextran-polietileno glicol, aplicam-se a outros sistemas bifásicos polímero-polímero (Albertsson,1986).

Em sistemas bifásicos aquosos constituídos por um polímero e um sal, o efeito da temperatura é oposto. Com o seu aumento ocorre uma diminuição nas concentrações de polímero e sal necessárias à formação de duas fases.

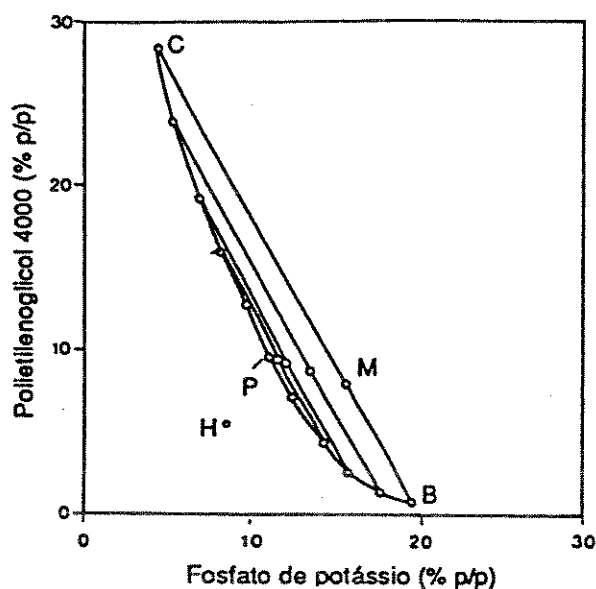


Figura 2.1-Diagrama de fases do sistema PEG 4000-fosfatos de potássio, à temperatura de 20°C e pH 7,0 (adaptado de Albertsson,1986). Onde:

H- composição da solução homogênea; M- composição global do sistema bifásico; C- composição da fase de cima; B- composição da fase de baixo; P- ponto crítico.

2.4- Fatores que influenciam a partição de biomoléculas num sistema bifásico aquoso

Há vários fatores os quais influenciam a partição de biomoléculas em sistemas de duas fases aquosas. Estes fatores são inerentes ao próprio sistema (por exemplo: escolha dos componentes do sistema, massa molecular do polímero, concentração do polímero e de sais, tipo de íon presente, força iônica e pH) e da proteína a sofrer partição (tais com: massa molecular, carga, hidrofobicidade e conformação, presença de ligandos bioespecíficos, quiralidade da molécula). A seleção de propriedades dos sistemas de fases apropriado para purificação de uma proteína específica é ainda muito empírica, embora existam regras gerais com relação ao efeito das características do polímero e composição iônica da proteína a sofrer partição (Cascone *et al.*, 1991).

Do ponto de vista das propriedades moleculares da proteína, o coeficiente de partição, K , definido como a razão entre a concentração de proteína na fase superior e inferior, pode ser dividido em vários fatores, que dão a seguinte expressão:

$$\ln K = \ln K_{\text{hidrof}} + \ln K_{\text{el}} + \ln K_{\text{bioesp}} + \ln K_{\text{conf}} + \ln K_{\text{tamanho}}$$

onde: $\ln K_{\text{hidrof}}$, $\ln K_{\text{el}}$, $\ln K_{\text{bioesp}}$, K_{bioesp} , $\ln K_{\text{conf}}$, $\ln K_{\text{tamanho}}$ denotam a contribuição para o coeficiente de partição total (K), da natureza hidrofóbica, força eletrostática, bioespecificidade, conformação e tamanho da molécula, respectivamente. Estes parâmetros podem ser manipulados a fim de atingir a partição ótima da proteína alvo.

A partição de uma proteína em um sistema de duas fases tendo o PEG como fase superior aumenta com a diminuição da massa molecular do PEG; este fato é tanto

mais pronunciado quanto maior for a massa molecular da molécula biológica a sofrer partição (Albertsson *et al.*,1987).

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

O fato da partição depender de um número grande de fatores distintos confere considerável versatilidade aos sistemas de duas fases aquosas na separação de misturas de componentes. Entretanto, a existência de tantas variáveis, na sua grande maioria interdependentes, torna extremamente difícil a previsão teórica do coeficiente de partição de um dado soluto, obrigando por vezes a um trabalho experimental exaustivo (Sebastião *et al.*,1996).

2.5- Extração com sistemas bifásicos aquosos à escala laboratorial

Vários trabalhos têm sido publicados com dados de extração com sistemas bifásicos aquosos à escala laboratorial, com a finalidade de selecionar as propriedades destes sistemas, tais como: tipo de componentes do sistema, massa molecular do(s) polímeros, comprimento da "tie line", composição de sais, força iônica e pH mais

adequadas à extração e purificação de uma proteína ou enzima determinada. Muitos destes trabalhos apresentaram resultados bastante satisfatórios.

Resultados obtidos com a taumatina (proteína com propriedades adoçantes), revelaram, em um único passo de extração com sistema bifásico PEG 6000-fosfato contendo NaCl, a partir de extrato bruto livre de fragmentos de células, valores de rendimento e fator de purificação de 90-95% e 20, respectivamente (Cascone *et al.*, 1991).

Um outro exemplo da potencialidade dos sistemas de duas fases aquosas no processo de purificação de proteínas foi a separação parcial da α -amilase a partir do sobrenadante de caldo fermentação de *Bacillus subtilis* (Schmidt *et al.*,1994). Duas extrações sucessivas em sistemas PEG-sulfato contendo NaCl conduziram à concentração da enzima 53 vezes , o que corresponde a um grau de pureza de 86%.

2.6- Aplicações dos sistemas bifásicos aquosos em grande escala

A extração bifásica aquosa apresenta várias vantagens sobre outros métodos de separação e recuperação de enzimas e outras proteínas. De acordo com Walter e Jonhansson (1986), as vantagens da aplicação destes sistemas à extração de proteínas são:

- rapidez na separação, o equilíbrio é bastante rápido (alguns segundos) e a separação pode ser efetuada em alguns minutos pelo recurso de centrífugas industriais;
- elevada capacidade dos sistemas bifásicos, quantidades até 150Kgm³ já foram processadas;

- facilidade de aumento de escala.

O uso intensivo de sistemas PEG-sal em aplicação em larga escala constitui uma alternativa, técnica e econômica, aos processos tradicionais de purificação de moléculas com atividade biológica. Exemplos de purificação de proteínas em grandes volumes (25 a 500l) de sistemas PEG-sal estão apresentados na Tabela

2.2

Tabela 2.2- Exemplos de purificação de proteínas em larga escala por passos subsequente de extração obtidos do Departamento de Tecnologia Enzimática do GBF- Braunschweig-Alemanha, adaptado de Albertsson *et al.*, 1990.

Enzimas	Organismos	Número de passos de extração	Fator de purificação	Rendimento final (%)	Observações	Fonte
Aspartase	<i>E. coli</i>	4	18	82	Remoção de fumarase interferente	Hustedt <i>et al.</i> , 1983
Formato desidrogenase	<i>Candida boidinii</i>	3	4,4	78	Remoção de polissacarídeos e ácidos nucleicos	Kroner <i>et al.</i> , 1982
Fumarase	<i>Brevibacterium ammoniagenes</i>	2	22	75	Remoção de polissacarídeos	Hustedt <i>et al.</i> , dados não publicados
Penicilina acilase	<i>E. coli</i>	2	10	78		Hustedt dados não publicados
L-2-Hidroxi-isocaproato desidrogenase	<i>Lactobacillus confusus</i>	2	21	90		Hummel <i>et al.</i> , 1984
Interferon	Fibroblastos humano	1	>350	75		Menge <i>et al.</i> , 1983

* O primeiro passo de extração é designado para remoção de todos os resíduos celulares, com exceção da purificação do interferon.

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

O melhoramento do protocolo para a extração de β -galactosidase a partir de uma suspensão de células de *E. coli* realizados por Veide *et al.*, (1983) e Szoke *et al.*, (1988), demonstraram que numa única extração realizada num sistema PEG-fosfato foi obtido um fator de purificação de 14 com um rendimento de 91% (Szoke *et al.*, 1988).

O desenvolvimento de extrações líquido-líquido em grande escala está muito limitado aos sistemas de PEG-Dextran e PEG-sal. Além de estes posuírem propriedades físicas favoráveis, especialmente no que se refere a viscosidade e a diferenças de densidades entre as fases, esta escolha é, no entanto, bastante influenciada por questões legais a que os processos de produção têm que obedecer; tanto o PEG como o dextran são substâncias não tóxicas para o meio ambiente (Sarmiento *et al.*, 1994).

2.7- Principais equipamentos utilizados na extração líquido-líquido

A utilização dos sistemas bifásicos aquosos aplicados à purificação de proteínas e enzimas em grande escala passa pela operação em contínuo, a qual possibilita a redução dos custos do processo, a sua automatização e o aumento da produtividade.

Os tipos de equipamentos usados no processo de extração líquido-líquido variam desde os clássicos tanques misturadores até as colunas centrífugas de alto desempenho.

Com a finalidade de tornar o processo de extração mais simples e eficiente, foram propostos diversos tipos de equipamentos nos últimos anos. O principal objetivo do desenvolvimento de novos equipamentos para efetuar extração líquido-líquido é tornar este método mais competitivo com relação aos outros processos de separação existentes (Souza, 1997).

De acordo com o processo em que podem ser utilizados, é possível classificar os equipamentos de extração líquido-líquido em: equipamentos com estágios discretos em "batch" ou descontínuos e equipamentos diferenciais ou contínuos.

Os equipamentos com estágios discretos, Figura 2.2, consistem num equipamento onde se coloca a carga em contato com um solvente, promovendo sucessivas misturas e decantações. Neste tipo de extrator é desejável que as duas fases permaneçam no equipamento por um tempo necessário para se atingir as proximidades do equilíbrio, para em seguida serem separadas. O número de estágios depende do grau de separação desejado; entretanto, nos casos em que a decantação do sistema é lenta, os compartimentos de decantação podem tornar-se volumosos, impossibilitando seu uso para altas vazões.

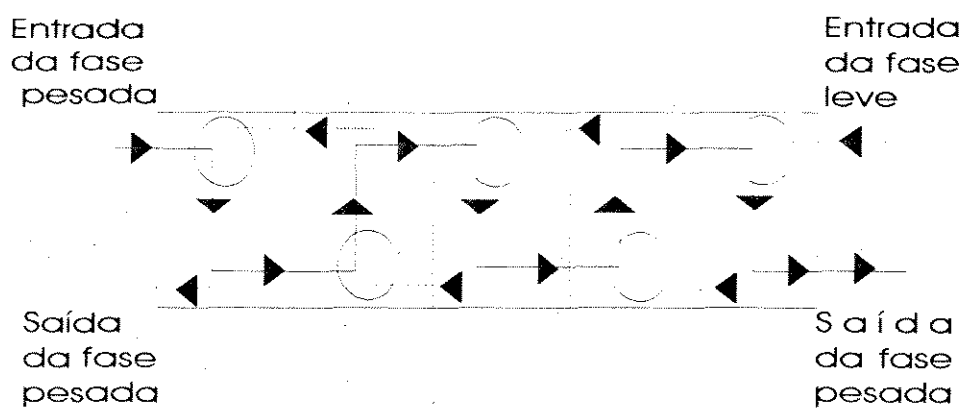


Figura 2.2- Esquema de um extrator em estágios discretos

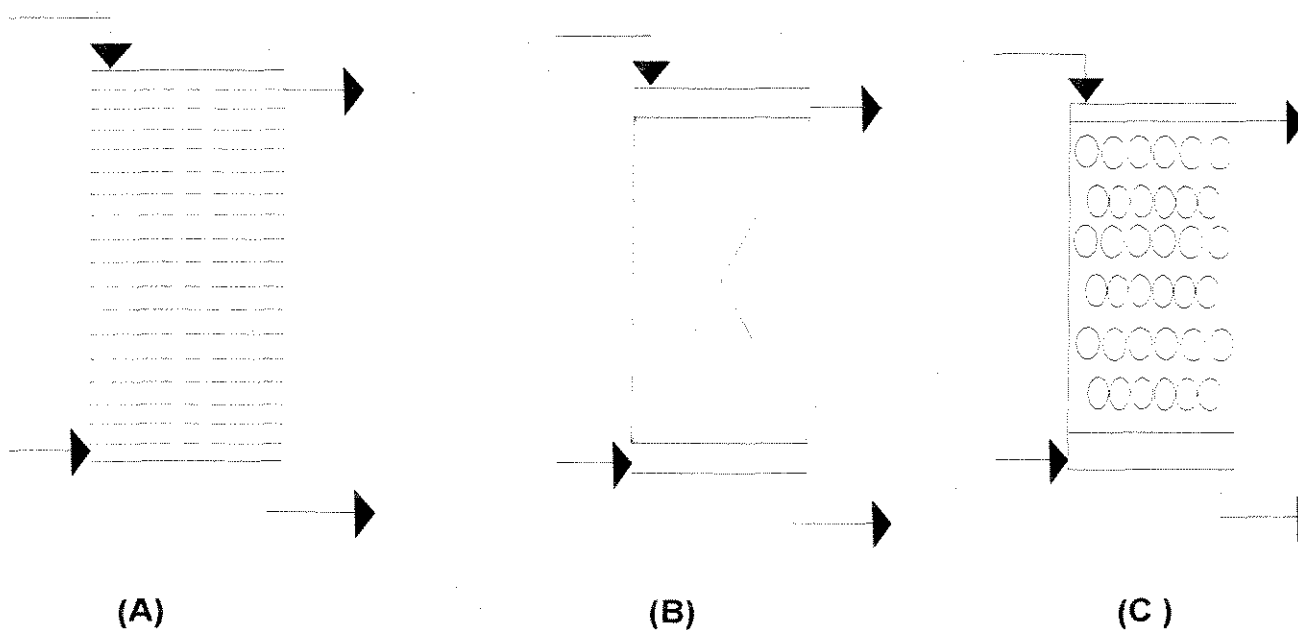


Figura 2.3- Extratores diferenciais que atuam sob a força da gravidade. Em (A) Coluna de pratos fixos perfurados, (B) coluna recheada e (C) Coluna spray.

Nos equipamentos diferenciais ou contínuos, normalmente construídos na forma de colunas, os líquidos escoam em contra-corrente, sendo mais compactos em relação aos misturadores decantadores. O fluxo em contra-corrente é processado em função da diferença de densidade de fases entre os componentes dos sistemas. A fase dispersa é alimentada no topo ou fundo da coluna, movendo-se em contra-corrente no seio da fase contínua. Estes equipamentos classificam-se em equipamentos que atuam sob a força da gravidade (Figura 2.3) e os mecanicamente agitados, de acordo com a existência ou não de agitação (Figura 2.4).

São exemplos de colunas baseadas na força da gravidade: colunas tipo spray, colunas de recheio e colunas com pratos perfurados fixos, que apresentam baixos custos de instalação e manutenção, ocupam espaço físico reduzido, embora apresentem uma baixa eficiência de separação. No caso de colunas mecanicamente agitadas, podemos citar colunas de discos rotativos, colunas de pratos pulsantes, extrator "Oldshue-Rushton", o extrator "Scheibel". Nestes equipamentos, a presença de agitação mecânica faz elevar a área interfacial através de um aumento no número de gotas com consequente aumento na transferência de massa (Carneiro-da-Cunha, 1994; Souza, 1997).

A principal vantagem entre o sistema de extração contínuo e o descontínuo reside no fato de que o primeiro sistema apresenta menor custo operacional e menor área de operação, uma vez que são mais compactos que os descontínuos.

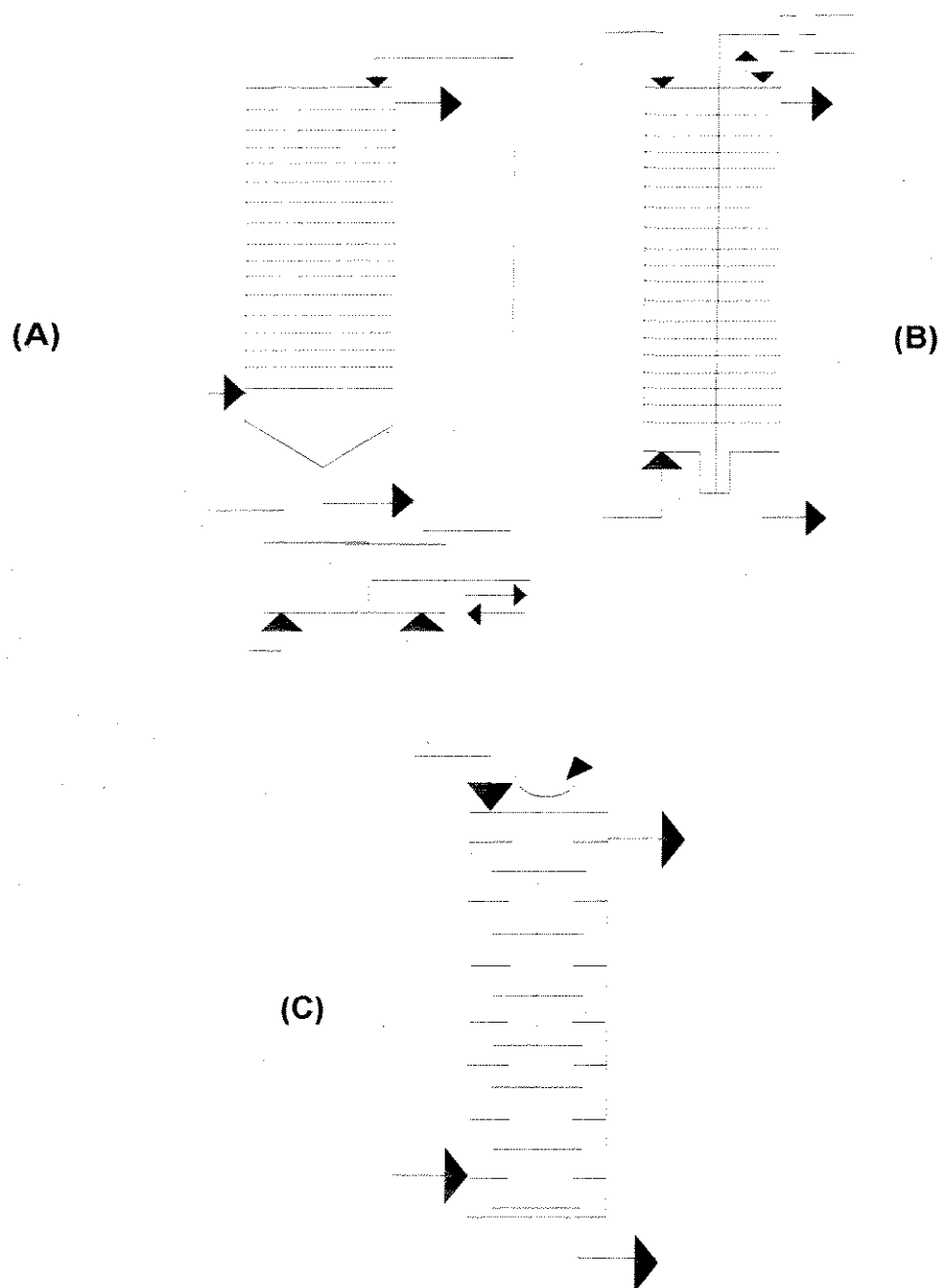


Figura 2.4-Extratores diferenciais mecanicamente agitados. Em (A) coluna de fluxo pulsado, (B) coluna de pratos pulsados e em (C) coluna de discos rotativos

2.8- Extração contínua com sistemas de duas fases

O processo de extração e purificação da β -galactosidase a partir de células de *E.coli*, com sistemas de duas fases aquosas PEG-fosfato foi realizada em contínuo por Veide *et al.*, (1984). O processo foi desenvolvido em um misturador estático, onde ocorria a mistura das células desintegradas com os componentes do sistema e subsequente separação de fases numa centrífuga tubular. Com esta extração a enzima foi recuperada na fase de cima com um rendimento de 83,5% e um fator de purificação de 13,6, valores ligeiramente inferiores aos obtidos na extração em "batch".

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

A utilização de um extrator Graesser para separação das proteínas do soro do queijo, com sistemas de duas fases aquosas PEG-fosfato de modo contínuo foi descrito por Coimbra *et al.* em 1994. Os autores obtiveram com um processamento de 660g de proteína total de soro por dia e um tempo de residência de 1 hora, a recuperação de 63% da α -lactoalbumina na fase de cima, livre de contaminação por β -lactoglobulina

(proteína responsável pelas reações alérgicas) a qual migrou totalmente para fase de baixo.

2.9- Extração contínua em coluna de discos perfurados rotativos

A coluna de discos rotativos (RDC) foi introduzida para aplicações industriais por Reman, em 1951, em indústrias petroquímicas . O autor realizou estudos sobre algumas variáveis que influenciam a eficiência de separação e a capacidade da coluna em função da velocidade de rotação e do tamanho médio das gotas da fase dispersa. A partir destes estudos foi verificado que as condições de inundação da coluna variam de sistema para sistema mas permanecem constantes com a variação das colunas RDC, sendo o mesmo comportamento verdadeiro para a transferência de massa.

Neste tipo de coluna as duas fases são introduzidas , em contracorrente, sendo que a fase dispersa (fase leve), na base da coluna e a fase contínua (fase pesada), no topo da coluna. A mistura de fases é governada principalmente pela velocidade de rotação dos discos, que influencia diretamente o tamanho das gotas e o número de gotas formadas na zona de contato. Para velocidades baixas, as gotas surgem rapidamente na zona de contato e apresentam dimensões maiores, proporcionando pequenas áreas interfaciais e baixas taxas de transferência de massa. No caso de altas velocidades de rotação, as gotas são menores e apresentam um aumento significativo na área interfacial, levando a elevadas taxas de transferências de massa (Strand *et al.*, 1962).

Estudos realizados por Westerterp e Landsman (1962) demonstraram que a dispersão axial (o grau de mistura que ocorre no interior de um equipamento na

direção longitudinal) é dependente da velocidade do líquido circulante na coluna e da agitação e recirculação.

Pope e Shar, em 1971, construíram uma coluna de discos perfurados rotativos de alta eficiência, de modo a minimizar a dispersão axial. Este extrator foi constituído por uma série de discos rotativos perfurados fixos e operados com várias maneiras de espaçamento entre os discos e várias velocidades de rotação. Os resultados demonstraram um excelente contato entre as fases, proporcionando um aumento das taxas de dispersão axial, apresentando um melhor desempenho em relação a outros extratores diferenciais.

Estudos realizados por Gois (1987) com um extrator PRDC, mediante o uso de traçadores e determinação da potência necessária à agitação, permitiram o desenvolvimento de uma análise dimensional de regressão linear que correlacionou a dispersão que caracteriza o grau de mistura no extrator.

Tambourgi (1989), com uma coluna semelhante à utilizada por Gois (1987), realizou estudos relacionados com o escoamento bifásico empregando o sistema n-butanol-água, através do estudo dos números de potência, das condições de inundação e da fração retida da fase dispersa numa coluna PRDC, tendo como variáveis geométricas: o número de discos rotativos, o espaçamento entre os discos, a altura da coluna e a área livre de escoamento, e como variáveis operacionais: a velocidade de rotação dos discos e a velocidade total. Através da análise dimensional e regressão linear obteve correlações para os números de potência e para a velocidade característica. O tipo de escoamento considerado pelo autor no interior do extrator foi o toroidal conforme descrito por Reman (1951).

Em 1993, Tambourgi e Pereira descreveram resultados obtidos com uma coluna PRDC construída em perspex (acrílico) com 600 mm de altura e 54 mm de diâmetro, e com discos de PVC com 50 mm de diâmetro, com 20 e 40% de área perfurada, variando os espaçamentos e o número de discos, bem como a velocidade de rotação. Os resultados obtidos demonstraram que o número de discos influencia a eficiência de separação, tendo sido observado maiores eficiência de separação para 7 discos do que para 5 discos testados. Segundo os autores, este fenômeno é devido ao fato de que um elevado grau de agitação causa uma maior área interfacial refletindo num maior valor de coeficiente de transferência de massa. O aumento da área perfurada dos discos de 20 para 40% provocou também um aumento na eficiência de separação.

Estudos realizados por Carneiro-da-Cunha (1994) com coluna PRDC utilizando sistemas micelares demonstraram que, mesmo com a mudança do tipo de sistema de extração, o rendimento da extração da cutinase foi maior quando utilizou-se 7 discos e agitação de 220rpm, conseguindo obter 75% de extração em proteína total, dados semelhantes aos obtidos pela extração em "batch". Estes resultados são corroborados por Tambourgi e Pereira (1993).

2.10- Citocromo b5, protease e ascorbato oxidase

Neste trabalho realizaram-se estudos de extração contínua de citocromo b5, protease e ascorbato oxidase, sendo estas duas últimas proteínas submetidas também ao estudo de partição em descontínuo, não foram realizados estudos de partição descontínua do citocromo b5 por já existirem dados descritos na literatura.

O citocromo b5 faz parte de um complexo enzimático que catalisa a insaturação de ácidos graxos. Trata-se de uma proteína de membrana constituída por uma única

cadeia polipeptídica e cuja estrutura terciária apresenta dois domínios distintos. Um deles, de natureza globular e hidrofílica, contém um grupo heme que está envolvido nas reações de oxi-redução nas reações de insaturação de ácidos graxos. Pelo contrário, o outro possui natureza hidrofóbica e é responsável pela ligação da proteína à membrana do retículo endoplasmático.

O domínio hidrofílico do citocromo b5 de rato foi clonado em *Escherichia coli* (TB1) através da síntese de novo do gene e da sua introdução no plasmídeo pUC 13 (von Bodman, 1986), o que permite a sua produção por fermentação, acumulando-se esta no espaço intracelular. A proteína assim obtida possui uma massa molecular de 13.600 Da e um ponto isoelétrico de 4,4. Ao longo deste trabalho, o domínio hidrofílico do citocromo b5 de rato será designado apenas por citocromo b5.

A protease estudada foi produzida por fermentação a partir da bactéria gram positiva *Streptomyces clavuligerus*. Consiste numa proteína extracelular que apresenta uma massa molecular aparente de 47.000 Da, sendo caracterizada como uma metalo-protease por Bascaran *et al.* em 1990. Dentre as enzimas de uso industrial, as proteases pertencem ao grupo mais importante destas enzimas (Gonzalez *et al.*, 1992).

Várias destas enzimas são utilizadas em processos das indústrias têxteis, alimentícias, de couro, de laticínios e farmacêutica (Hugenholtz *et al.*, 1987; Boven *et al.*, 1988; Smith *et al.*, 1988). O mais importante setor do mercado de enzimas é ainda o uso de proteases para detergentes de uso doméstico, sendo 89% do mercado global de proteases microbianas e 34% do mercado global de enzimas. As proteases microbianas são as enzimas mais importantes do ponto de vista comercial.

A ascorbato oxidase é uma cupro proteína contendo aproximadamente 0,46 % de cobre, o que corresponde a 10 átomos de cobre por molécula de enzima. Esta enzima pode ser extraída da *Cucurbita maxima* e possuem um peso molecular de 150.000 Da (Sthothkmp e Dalson, 1977).

Uma análise conformacional em tampão fosfato (10mM e pH 7,6), demonstrou que a enzima existe predominantemente em estado β - conformacional, não sendo encontradas formas helicoidais. A ascorbato oxidase é constituída de duas subunidades idênticas ligadas por duas pontes dissulfeto; cada subunidade tem um peso molecular de 70.000 Da e consiste de duas cadeias polipeptídicas com pesos moleculares de aproximadamente 30.000 e 40.000 Da (Sthothkmp e Dalson, 1977).

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

3.0- MATERIAIS

3.1- Proteínas

3.1.1- Citocromo b5

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

3.1.2- Protease

A protease foi obtida por fermentação de *Streptomyces clavuligerus* NRRL 3585.

3.1.3- Ascorbato oxidase

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

3.1.4- Albumina de soro bovina

A albumina de soro bovino (BSA) foi fornecida pela Sigma.

3.2- Reagentes

3.2.1- Polímeros e sais constituintes dos sistemas bifásicos

Os polímeros polietileno glicol (PEG) 400, 550, 1000, 3350 e 8000 foram fornecidos pela Sigma e utilizados sem qualquer purificação parcial. Os sais de hidrogenofosfato e di-hidrogenofosfato de potássio utilizados na preparação dos sistemas de duas fases aquosas foram de grau analítico, fornecidos pela Cica-Kanto.

3.2.2- Outros reagentes

Os principais reagentes utilizados nas diversas fases do trabalho experimental encontram-se descritos na Tabela 3.1.

3.3- Meios de Cultura

3.3.1- Meio de manutenção/ Produção de citocromo b5

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

3.3.2- Meio de esporulação e manutenção

As culturas de *S. clavuligerus* foram mantidas no meio descrito por Pridham, *et al.* (1956/1957), conhecido como ISP-2, modificado pela retirada da glicose, apresentando a seguinte composição:

Os polímeros polietileno glicol (PEG) 400, 550, 1000, 3350 e 8000 foram fornecidos pela Sigma e utilizados sem qualquer purificação parcial. Os sais de hidrogenofosfato e di-hidrogenofosfato de potássio utilizados na preparação dos sistemas de duas fases aquosas foram de grau analítico, fornecidos pela Cica-Kanto.

3.2.2- Outros reagentes

Os principais reagentes utilizados nas diversas fases do trabalho experimental encontram-se descritos na Tabela 3.1.

3.3- Meios de Cultura

3.3.1- Meio de manutenção da *E. coli* / Produção de citocromo b5

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

3.3.2- Meio de esporulação e manutenção do *S. clavuligerus*

As culturas de *S. clavuligerus* foram mantidas no meio descrito por Pridham, *et al.* (1956/1957), conhecido como ISP-2, modificado pela retirada da glicose, apresentando a seguinte composição:

Extrato de levedura	0,4%
Extrato de malte	1,0%
Ágar	2,0%

A esterilização foi realizada em autoclave a 121°C a 1 atm de pressão durante 20 minutos.

3.3.3- Meio de produção da protease

Para produção da protease pelas amostras de *S. clavuligerus* foi utilizado o meio **MS2** descrito por Porto *et al.* (1996). O referido meio **MS2** apresenta a seguinte constituição para um volume final de 100mL em água destilada:

Hidrolisado de soja	0,5%
NH ₄ Cl	0,1%
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0,06%
Glicerol	1,0%
K ₂ HPO ₄	0,435%
Solução mineral	0,1ml

* a solução mineral é constituída por:

FeSO ₄ . 7 H ₂ O	100mg
MnCl. 4 H ₂ O	100mg
ZnSO ₄ .H ₂ O	100mg
CaCl ₂ . H ₂ O	100mg

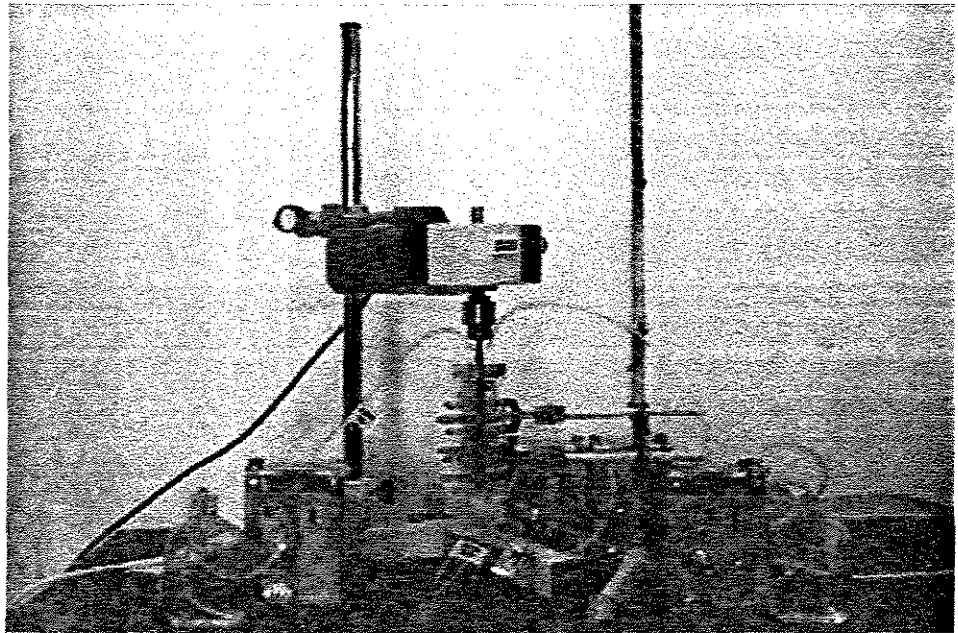
H₂O destilada q.s.p. 100mL

Utilizado-se as mesmas condições de esterilização descritas no item 3.3.2 .

3.4- Coluna de extração líquido-líquido

Nos ensaios de transferência de massa em extração contínua, utilizou-se uma coluna do tipo coluna de discos perfurados rotativos (PRDC). A coluna foi construída com tubo de acrílico (perspex) com 32mm de diâmetro interno e 160mm de altura. Na parte central encontra-se um eixo contendo 7 discos perfurados, separados equidistantes e movidos por um agitador a diferentes velocidades, conforme as condições experimentais. Os discos perfurados são de 30 mm de diâmetro, contendo cada disco 20 orifícios de 1,5mm de diâmetro, com uma área livre de fluxo de 20% (Figura 3.1). A coluna foi mantida a temperatura ambiente (25°C).

(A)



(B)

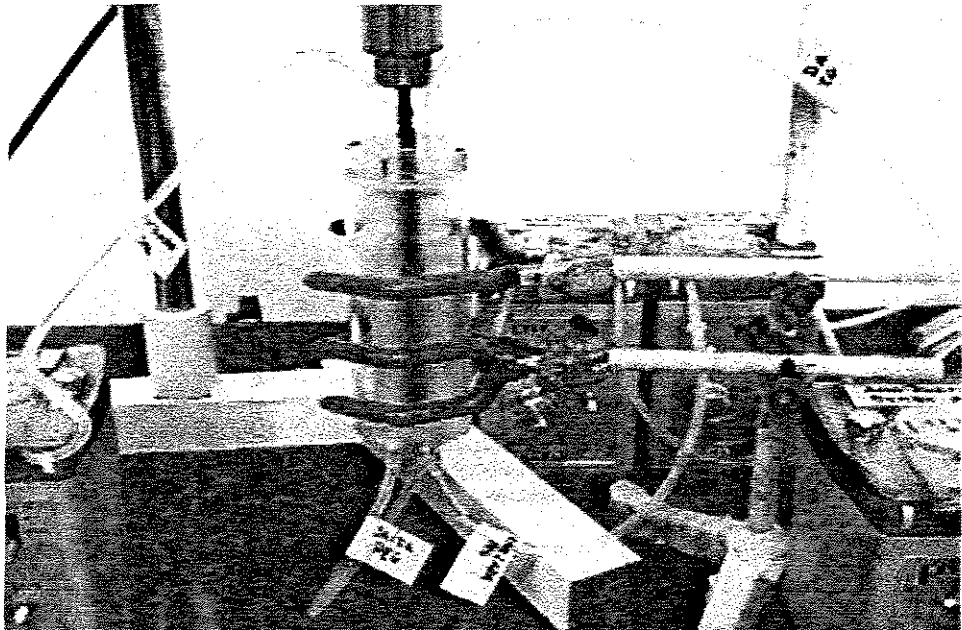


Figura 3.1- Coluna de discos perfurados rotativos em operação (A), e em (B) vista frontal da coluna com mais detalhes, onde pode-se observar o eixo com os discos e as bombas de alimentação, a alimentação da fase leve e drenagem da fase pesada foi realizada pela parte inferior da coluna, e pelo topo da coluna ocorreu a alimentação da fase pesada e drenagem da fase leve (indicado pela fita amarela).

Tabela 3.1- Reagentes utilizados nas várias etapas do trabalho experimental.

Utilização	Reagente	Fornecedor
Produção de citocromo b5	Meio de Lurian-Bertani Ágar Ampicilina	Sigma Difco Boehringer Mannheim
Produção de Protease	Hidrolisado de soja Glicerol Cloreto de amônio Sulfato de Magnésio hepta hidratado di-hidrogenofosfato de potássio	Difco Merck Reagen Reagen Cica -Kanto
Extração de ascorbato oxidase	Citrato de sódio Fosfato de sódio dibásico EDTA (ácido etilenodiaminoacético)	Reagen Cica-Kanto Vetec
Determinação de proteínas	Coomassie Brilhante Blue G25 Ácido ortofosfórico Álcool etílico Albumina de soro bovino (fração V)	Serva Merck Merck Sigma
Determinação da atividade proteásica	Azocaseína Cloreto de Cálcio anidro Hidróxido de sódio Ácido Tricloroacético Hidrocloreto de hidroximetilaminometano	Sigma Reagen Reagen Merck Sigma
Determinação da atividade ascorbato oxidase	Ácido ascórbico Di-hidrogenofosfato de potássio Citrato de sódio	Vetec Cica Reagen

4.0-MÉTODOS

4.1- Produção de citocromo b5 e ruptura celular

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

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

4.2- Produção da protease

As fermentações foram realizadas em Erlenmeyers com 500mL de capacidade contendo 125mL de meio de cultura **MS2** e inoculados com 12,5mL de cultura (10% de inóculo crescida durante 48 horas). Os frascos foram incubados em agitador orbital, a 200rpm, durante 96 horas a temperatura de 28° C, onde após este tempo a cultura foi centrifugada (3000 x g) e o sobrenadante assim obtido foi dividido em alíquotas e armazenado a -20°C para subsequente utilização.

4.3- Extração da ascorbato oxidase

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

- o jerimum descascado foi cortado em fatias e pesado, em seguida a amostra foi lavada com água deionizada contendo EDTA 2mM;
- após esta lavagem, a amostra foi triturada com tampão citrato-fosfato (0,1M, pH 6,0, EDTA 2mM), na proporção 1.5mL por grama de jerimum;
- posteriormente, o homogenato obtido foi filtrado em gaze, o filtrado foi centrifugado a 13.000 xg por 5 minutos, com a finalidade de remover os resíduos celulares. O filtrado foi estocado em vidro âmbar a -20°C para posterior utilização.

4.4- Determinação da atividade proteásica

O método utilizado para determinação da atividade proteásica foi o descrito por Ginther (1979) modificado. O meio de cultura obtido após 96 horas de fermentação do *Streptomyces clavuligerus* foi previamente clarificado por centrifugação (12.000 x g, 5 minutos) e azocaseína 1,0% (p/v) (Sigma, ST. Louis, Mo USA) em tampão 0,2M Tris-HCl, pH 7,2 contendo 1,0mM de CaCl₂ foi usada como substrato.

A mistura do ensaio continha 250µl do substrato e 150µl do meio contendo a enzima. Esta mistura foi incubada por 1 hora à temperatura ambiente (25° C), sendo a reação foi interrompida pela adição de 1,2ml de Ácido Tricloroacético 10% (p/v) durante 15 minutos para total precipitação. As amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 8000 x g , à temperatura de 4° C. Do sobrenadante foi pipetado

0,8ml e adicionado 1,4ml de NaOH 1M. O ensaio foi realizado em duplicata e o branco foi preparado retirando apenas a solução do meio contendo a enzima. Determinou-se a absorbância desta mistura a 440nm.

Uma unidade de atividade proteásica é definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um aumento na absorbância de 1,0 em uma hora, sendo expressa em U/ml. A atividade proteásica específica foi calculada pela razão entre a atividade proteásica total e a quantidade de proteínas contidas em 1ml de amostra (U/mg).

4.5- Determinação da atividade ascorbato oxidase

A atividade ascorbato oxidase foi realizada segundo metodologia descrita por Carvalho *et al.* (1981), a qual utiliza o ácido ascórbico 50 μ M em tampão citrato-fosfato 0,1M pH 6,0 como substrato.

O sistema de reação continha 675 μ l do tampão contendo o substrato e 25 μ l da solução contendo a enzima, e o consumo do substrato foi acompanhado em espectrofotômetro durante 15 minutos, sendo a absorbância determinada a 268nm, registrada de 1 em 1 minuto.

Uma unidade de atividade equivale a oxidação de 1,0 μ mol de L-ascorbato para dehidroascorbato por minuto a pH 6,0 a temperatura de 25°C, acompanhada pela leitura da absorbância a 268nm, sendo expressa em μ Mol de Ác. Ascórbico/min. A atividade específica foi calculada pela razão entre a atividade total e a quantidade de proteínas contidas em 1ml de amostra (μ M /min. mg).

4.6- Preparação dos sistemas de duas fases aquosas

A preparação dos sistemas de duas fases aquosas utilizados ao longo deste trabalho foi efetuada por dois processos. Para preparação de sistemas com massa total de 6g para extração descontínua em tubos de ensaios, foi utilizada uma mistura de soluções concentradas dos diferentes reagentes necessários à formação de um sistema bifásico. As soluções dos polímeros foram de 50% p/p e dos sais foram de 40% p/p. Os sistemas utilizados para extração contínua em coluna foram preparados a partir de seus reagentes na sua forma sólida, isto é, as quantidades necessárias de cada um dos reagentes foi pesada e a estes foi adicionada a massa correspondente de água deionizada.

O sistema assim preparado foi mantido em agitação por 5 horas e, após verificação da dissolução total, foi colocado em decantador para melhor separação das fases.

Foram utilizados os seguintes sistemas de duas fases aquosas, com as seguintes concentrações de polímeros e sais:

Tabela 4.1- Composição dos diversos sistemas de duas fases aquosas utilizados na extração líquido-líquido de proteínas.

TIPO DE POLÍMERO	Tie line 0 PEG (%p/p) e sais (%p/p)	Tie line 1	Tie line 2	Tie line 3
PEG 400 E PEG 550	-----	16,7/14,8	17,7/15,7	19,7/17,7
PEG 1000	-----	16,2/14,3	17,7/15,7	19,7/17,7
PEG 3350	-----	14,0/11,8	17,7/15,7	19,7/17,7
PEG 8000	11,8/9,8	14,0/11,8	-----	-----

4.7- Extração descontínua: estudos de partição do citocromo b5, albumina do soro bovino, protease e ascorbato oxidase em sistemas bifásicos aquosos

Foram preparados sistemas de duas fases aquosas de Polietileno Glicol-Sais de fosfatos (PEG-Sal) com uma massa total de 6 gramas, por pesagem das quantidades apropriadas de soluções concentradas de PEG (50% p/p) e sais de fosfatos (40%p/p) e água deionizada em tubos de centrifuga graduados (10ml). Os sais de fosfatos foram adicionados de forma a garantir não só a concentração de sal, mas também o pH desejado obedecendo a relação entre fosfato monobásico e dibásico. O conteúdo destes tubos foi agitado num vortex, tendo-se em seguida adicionado 500µL (0,5 g) de uma solução de extrato impuro das proteínas em estudo, com exceção a albumina de soro bovino que foi utilizada na sua forma comercial a partir de uma solução de

concentração 1mg/ml. Os dados de partição para o citocromo b5 foram obtidos diretamente da literatura.

Após nova agitação no vortex, as fases foram separadas por centrifugação durante 10 minutos a 1000 x g. Em seguida, as mesmas foram retiradas cuidadosamente com auxílio de seringa com capacidade de 5ml, onde a quantidade de proteína total foi determinada e no caso das enzimas também foi determinada a atividade enzimática.

Estes experimentos foram realizados utilizando vários comprimentos de "tie line", com diferentes massas moleculares de PEG que estão descritos na Tabela 3.2. O pH 7,0 foi utilizado para os experimentos de partição da albumina de soro bovina e protease e pH 6,0, para a ascorbato oxidase.

4.8- Extração contínua utilizando a coluna de discos perfurados rotativos

Na extração contínua realizada com uma coluna de discos perfurados rotativos, foram utilizadas as seguintes etapas de operação:

- alimentou-se a coluna inicialmente com a fase contínua (fase rica em sal), com a drenagem da fase contínua e alimentação da fase dispersa fechada até enchê-la;
- em seguida, acionou-se o mecanismo de agitação dos discos, e depois de ajustada a vazão de entrada com a de saída da fase contínua, procedeu-se então a alimentação da fase dispersa (fase rica em PEG). Para estes procedimentos foram utilizadas quatro bombas peristálticas (cada uma com um único canal), a fim de garantir a velocidade de fluxo requerida para cada fase;

-as amostras das fases contínua e dispersa foram recolhidas em intervalos de tempo de 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70 minutos de operação e em seguida submetidas às determinações de proteína e atividade enzimática, conforme o caso.

Neste trabalho foram analisados algumas variáveis operacionais sobre a transferência de massa, fração retida da fase dispersa ("hold up") e eficiência de separação na coluna de discos perfurados rotativos.

Na tabela 4.2 estão apresentadas as variáveis que foram avaliadas e seus respectivos valores:

Tabela 4.2- Variáveis estudadas na extração contínua da proteína modelo BSA com sistemas de duas fases, em coluna de discos perfurados rotativos.

Variáveis estudadas	Valores assumidos
Velocidade de rotação dos discos (rpm)	35; 140; 240
Vazão total de alimentação (ml/min)	2,0; 3,0; 4,0
Velocidade da fase dispersa (ml/min)	0,5; 1,0; 2,0; 3,0

4.9- Determinação do coeficiente de partição (K) das proteínas

A distribuição de proteínas entre as fases de um sistema bifásico aquoso é caracterizada pelo coeficiente de partição, que foi calculado pela seguinte expressão :

$$K = C_c / C_b$$

onde: C_c e C_b são as concentrações de proteína nas fases de cima e de baixo, respectivamente.

Para o caso das enzimas (protease e ascorbato oxidase) , o coeficiente de partição foi expresso em termos da atividade enzimática na parte de cima e de baixo, respectivamente.

4.10- Cálculo da fração retida da fase dispersa (" hold up")

Nos ensaios de extração em contínuo, após ter sido atingido o estado estacionário, em condições de agitação e velocidade de fase dispersa pré estabelecidas, foi determinado o " hold up" da fase rica em PEG pelo método do estancamento. Neste procedimento são interrompidas simultaneamente a agitação e as correntes de entrada e saída da coluna. A coluna foi então descarregada, as fases levadas à decantação e os volumes das fases foram lidos em proveta graduada. Esta técnica leva a medida do " hold up" médio e o mesmo foi calculado utilizando-se a seguinte expressão:

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

4.11- Determinação do coeficiente de transferência de massa (K_{da})

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

$$K_{da} = Q / V \cdot \ln (C_{ent} - K C_{fc} / C_{sai} - K C_{fc})$$

Onde: K_{da} , Q , V , C_{ent} , C_{sai} , C_{fc} e K representam respectivamente; o coeficiente de transferência de massa, a velocidade de fluxo da fase dispersa, o volume da fase contínua, a concentração de proteína na corrente de entrada da fase dispersa, a

concentração de proteína na corrente de saída fase dispersa, coeficiente de partição da proteína. O valor utilizado para C_{fc} , foi o valor médio entre a concentração final da fase contínua e o valor inicial na mesma fase, isto é, o valor de C_{fc} é a metade do valor da concentração de proteína determinado para fase contínua, pois o valor inicial na fase contínua é zero.

4.12- Determinação do fator de purificação (F.P.)

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

$$F.P. = \frac{(U/mL / \text{Concentração de proteína}) \text{ depois da purificação}}{(U/mL / \text{Concentração de proteína}) \text{ do extrato impuro}}$$

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

$$F.P. = \frac{\text{Concentração de cit. b5} / \text{Concentração de proteína após a purificação}}{\text{Concentração de cit.b5} / \text{Concentração de proteína do extrato impuro}}$$

4.13- Cálculo da eficiência de extração : Eficiência de Murphree

A eficiência de extração foi obtida para a coluna em estudo , pela seguinte definição:

$$E = \frac{C_d - C_r}{C_d - C_r^*}$$

Onde : C_d é a concentração do soluto na fase dispersa

C_r é a concentração do soluto na fase refinado

C_r^* é a concentração do soluto na fase refinado , se o sistema estivesse em equilíbrio.

4.14- Determinação da massa específica e viscosidade dos diversos sistemas PEG-Sais

A determinação da massa específica para as fases rica em PEG e rica em sal para os diversos sistemas PEG-Sais estudados foi realizada num densitômetro PAAR DMA 6000. A água e o ar foram utilizados como fluidos de calibração, de acordo com o procedimento indicado pelo fabricante. As determinações de massa específica foram efetuadas com controle de temperatura (25° C).

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

viscosímetro. Para obter a viscosidade em mPa.s, multiplica-se a viscosidade cinemática pela densidade em g/ml.

4.15- Determinações analíticas

4.15.1- Determinação da quantidade de proteína total

A proteína total foi quantificada pelo método de Bradford (1976). Um volume de 50 μ l de amostra foi adicionado a 2,5ml do reativo com agitação em vortex e absorbância determinada a 595nm, após um período de 2min a 1 hora de repouso a temperatura ambiente. O corante foi preparado solubilizando 100mg de azul brilhante de Coomassie G em 50mL de etanol (95% v/v), adicionando-lhe 100mL de ácido ortofosfórico (85%) e completando o volume para 1 litro com água destilada. A mistura foi filtrada duas vezes antes de sua utilização. A curva de calibração foi feita a partir de soluções estoques de albumina de soro bovina numa gama de concentração de 0-100mg/l.

Na quantificação de proteína efetuada nos sistemas de duas fases aquosas contendo os diferentes extratos protéicos foram preparados brancos em que uma amostra da fase correspondente de um sistema bifásico aquoso idêntico preparado sem o extrato protéico era adicionado ao reativo. As amostras da fase superior e inferior foram submetidas a uma diluição igual a 2 ou superior antes da reação do corante de modo a eliminar a interferência do PEG e dos fosfatos.

4.15.2- Determinação da concentração de citocromo b5

A concentração de citocromo b5 foi determinada diretamente a partir do seu coeficiente de absorção a 411nm ($\epsilon = 130 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), já que a proteína absorve luz fortemente a este comprimento de onda. Este método foi usado uma vez que é extremamente simples, rápido e não destrutivo, a amostra de citocromo analisada não foi inutilizada após a medição da absorbância.

5.0- RESULTADOS E DISCUSSÃO

A extração com sistemas de duas fases aquosas tem recebido atenção como uma técnica promissora para separar e purificar proteínas ou enzimas de interesse. Na prática, uma mistura de proteínas pode ser tratada com sistemas de duas fases aquosas, resultando numa dispersão que pode ser separada em duas fases por centrifugação, facilitando o isolamento e purificação da proteína de interesse (Sawant *et al.*, 1990).

O avanço de técnicas de extração em sistemas polímero-sal e polímero-polímero, tem aumentado a chance do uso em larga escala destas técnicas. Métodos de extração convencionais podem ser convenientemente aplicados a estes sistemas. O equilíbrio de fases nestes sistemas é atingido rapidamente quando se usam misturadores estáticos ou misturadores-decantadores, contudo a dispersão produzida é relativamente estável e a separação de fases é muito lenta sob a ação da gravidade, necessitando do uso de centrífugas (Jafarabad *et al.*, 1992a).

Apesar de algumas dificuldades apresentadas com os sistemas de duas fases aquosas, eles têm sido aplicados com sucesso a vários processos de extração líquido-líquido em grande escala como descrito por Hustedt *et al.*, (1985).

A utilização de colunas de extração tipo spray tem sido utilizadas com sistemas de duas fases aquosas para separação de proteínas e enzimas, as quais podem ser operadas de modo contracorrente. Este tipo de coluna de extração é economicamente mais atraente do que os misturadores estáticos ou misturadores-decantadores, que necessitam de mais de um estágio teórico para atingir o nível de pureza desejado (Jafarabad *et al.*, 1992a).

A utilização de extrator Graesser tem sido descrito por Coimbra *et al.* (1994) na separação de proteínas do soro de queijo, por extração contínua com sistemas de duas fases aquosas, apresentando resultados muito promissores.

O uso de colunas de discos perfurados rotativos (PRDC) tem sido mencionado em Carneiro-da-Cunha *et al.* (1994), para extração de cutinase em sistemas micelares, contudo a utilização de sistemas de duas fases aquosas com este tipo de equipamento não tem sido ainda descrito na literatura, o que motivou as investigações no sentido de caracterizar hidrodinamicamente estes sistemas neste tipo de coluna e avaliar o processo de extração em contínuo de proteínas e enzimas.

Neste capítulo serão apresentados os resultados dos experimentos de transferência de massa em coluna de extração líquido-líquido de discos perfurados rotativos. O sistema utilizado foi o sistema PEG-Sais de fosfatos, funcionando a fase pesada (fase rica em sal) como fase contínua, e a fase leve (rica em PEG) como fase dispersa.

A transferência da albumina sérica bovina da fase dispersa para a fase contínua foi estudada, analisando-se o efeito da velocidade de rotação, e da velocidade da fase dispersa na fração retida da fase dispersa, no coeficiente de transferência de massa e na eficiência de separação. Estes parâmetros constituem fatores determinantes para a transferência da proteína e desempenho do equipamento para possível utilização em larga escala.

Foi também avaliado o comportamento de extração descontínua e contínua em sistemas bifásicos aquosos da proteína citocromo b5 (recombinante) e de duas enzimas (protease e ascorbato oxidase) a partir de meio de fermentação.

5.1- Efeito da velocidade de rotação sob a fração retida da fase dispersa ("hold up")

Um dos parâmetros importantes para caracterização hidrodinâmica de um equipamento de extração é a fração retida da fase dispersa, que significa portanto o percentual da fase polimérica presente no equipamento. Tais medidas da fração retida da fase dispersa são informações valiosas para a estimativa da qualidade de transferência de massa de uma unidade de extração sob condições pré-definidas (Coimbra, 1995).

A fração retida da fase dispersa está diretamente relacionada com a quantidade de gotas existentes no interior da coluna, para um dada condição operacional. A formação de gotas não é um processo simples, e está diretamente ligada às condições de agitação, isto é, a velocidade de rotação imposta às fases no interior do equipamento (Souza, 1997).

A influência da velocidade de rotação na fração retida da fase dispersa foi avaliada em coluna PRDC através da operação em contínuo com sistemas de duas fases aquosas, utilizando os seguintes valores de velocidade de rotação: 35, 140 e 220 rpm. Os experimentos foram realizados com citocromo b5 utilizando-se sistemas de PEG1000-Sais de fosfatos pH 7,0, nas concentrações de 18% e 16 % (p/p) , respectivamente. A vazão total de alimentação ($V_d + V_c$) variou de 1,5 ml/min até 4,0 ml/min.

Os dados apresentados na Figura 5.1 demonstram que para valores de velocidade de rotação inferiores a 150 rpm, nota-se um aumento na fração retida da fase dispersa na maioria das vazões de alimentação estudadas. Contudo, para valores

acima desta velocidade de rotação, ocorre uma discreta diminuição nos valores da fração retida da fase dispersa, para valores de vazão total acima de 3ml/min.

Este comportamento pode ser explicado pela resistência imposta ao escoamento, pelos discos perfurados quando a velocidade de rotação é muito elevada, o que pode impedir ou retardar a ascensão das gotas da fase dispersa até o topo da coluna.

Para o extrator de palhetas rotativas utilizando sistema ternário água-ácido acético-butanol, um aumento da velocidade de rotação de 1rps a 4rps proporcionou um aumento na fração da fase dispersa, sendo este aumento mais acentuado para valores de vazão total da fase dispersa acima de 5,5 ml/s (Souza, 1997).

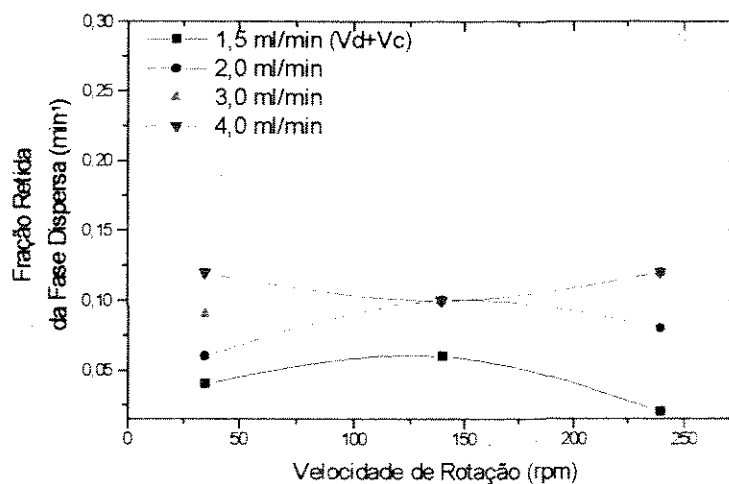


Figura 5.1- Efeito da velocidade de rotação na fração retida da fase dispersa.

Em processos de extração utilizando sistemas de duas fases aquosas (PEG-Sais de fosfatos) com extrator Graesser , para separação de proteínas do soro de queijo, foi analisado a influência das razões de velocidade de fases e da velocidade de rotação na fração retida da fase dispersa.

Demonstrou-se, neste tipo de extrator, uma independência da fração retida da fase dispersa tanto em relação à velocidade de rotação quanto em relação à vazão de velocidades de fases. Neste caso a capacidade e desempenho do extrator não foram reduzidos pela operação em baixas velocidades de agitação, o que leva a condições de mistura favoráveis para produtos lábeis como as proteínas (Coimbra, 1995).

Estudos realizados por Carneiro-da-Cunha *et al.* (1994) com extração de cutinase utilizando coluna PRDC com sistemas micelares, verificaram que elevados valores de velocidade de rotação (360rpm), provocaram a formação de uma emulsão estável, não sendo possível obter uma separação de fases.

Os valores encontrados com sistemas bifásicos aquosos em coluna PRDC para fração retida da fase dispersa, foram muito superiores aos já descritos na literatura para coluna spray, utilizando diferentes sistemas bifásicos aquosos com proteínas e enzimas (Sawant *et al.*, 1990; Jafarabad *et al.*, 1992a e b; Venâncio *et al.*, 1995). Estes resultados são corroborados com os obtidos por Pawar *et al.* (1997) , que descreveram o comportamento da extração de amiloglucosidase e β -Galactosidase em coluna spray modificada de modo a obter maiores valores da fração retida da fase dispersa.

5.2- Efeito da velocidade de rotação no coeficiente de transferência de massa (Kda)

O estudo de transferência de massa no interior das colunas de extração líquido-líquido é de fundamental importância para o conhecimento dos seus limites de operação. Em colunas de extração com discos perfurados rotativos este estudo foi realizado utilizando os mesmos valores de velocidade de rotação avaliados para a fração retida da fase dispersa, descrito no item 5.1, e vazão total de alimentação de 4,0ml/min, onde neste caso a proteína utilizada também foi o citocromo b5 dissolvida na fase rica em PEG (fase leve).

Na Figura 5.2 pode-se observar um aumento dos valores de Kda até a velocidade de rotação de 150 rpm: acima deste valor ocorre um decréscimo do valor do Kda, demonstrando que o coeficiente de transferência de massa é independente da velocidade de rotação para valores superiores a 150rpm (Porto *et al.*, 1997). Isto ocorre porque o aumento da velocidade de rotação, no início, melhora a mistura entre as fases e aumenta a área interfacial, por diminuir o tamanho médio das gotas, e promovendo com isso o aumento na taxa de transferência de massa, que é diretamente proporcional à área interfacial. Contudo, isso não ocorre indefinidamente, ocasionando uma diminuição do Kda (Rabelo, 1995).

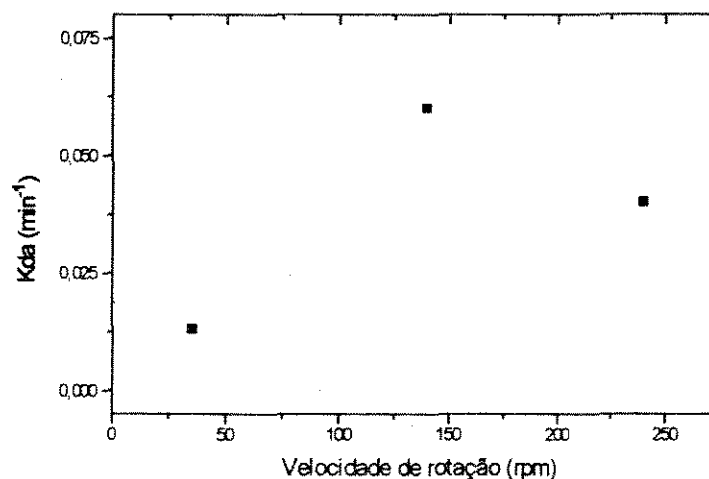


Figura 5.2- Efeito da velocidade de rotação no coeficiente de transferência de massa (K_{da}).

5.3- Efeito da velocidade de agitação na eficiência de separação (Eficiência de Murphree)

A eficiência de separação de Murphree é uma medida de quanto o sistema se aproxima do equilíbrio. Os dados obtidos na Figura 5.3 foram calculados segundo a equação descrita no item 4.13. Analisando a Figura 5.3, observa-se que o comportamento foi praticamente independente da velocidade de rotação (valores aproximadamente iguais a 1). Era de se esperar que um aumento nos valores da velocidade de rotação, produzisse altos valores de eficiência de separação segundo Tambourgi *et al.* (1993). Estes resultados obtidos com sistemas bifásicos aquosos podem ser devido a resistência do fluxo imposta pela velocidade de rotação, causando um fenômeno de arraste da fase contínua.

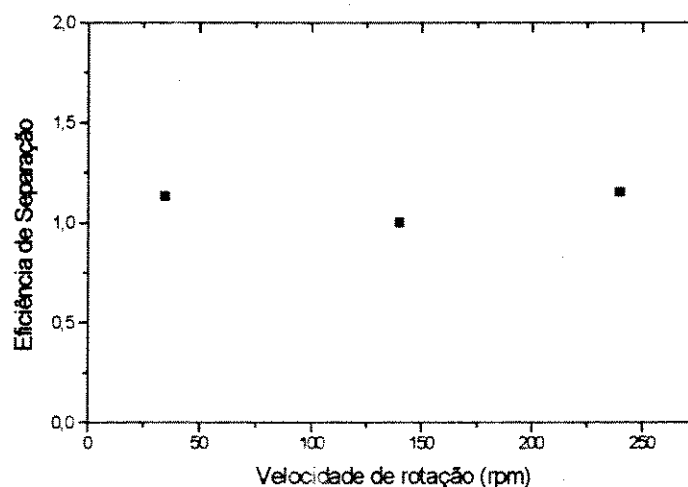


Figura 5.3- Efeito da velocidade de rotação na eficiência de separação (Eficiência de Murphree).

5.4- Influência da velocidade da fase dispersa na fração retida da fase dispersa em diferentes composições dos sistemas aquosos

Nas Figuras 5.4, 5.5, 5.6 e 5.7 estão apresentados os valores da fração retida da fase dispersa para os diferentes sistemas de PEG-Sais de fosfatos, em função da velocidade da fase dispersa. Pode-se verificar que para os diferentes sistemas com PEG de diferentes massas moleculares (550, 1000, 3350 e 8000), a fração retida da fase dispersa aumentou com aumento da velocidade da fase dispersa e diminuiu com o aumento da composição do sistema (Tabela 5.1).

Kumar e Hartland, em 1982, relataram que o aumento do tamanho da gota diminui com o aumento da V_d (velocidade da fase dispersa). Entretanto, com o

aumento da Vd aumenta o número de gotas , resultando num aumento dos valores da fração retida da fase dispersa. Efeitos similares foram observados em colunas de bolhas, reatores de leito fluidizado e coluna spray (Jafarabad *et al.*,1992a, Pawar *et al.*,1997 ; Venâncio *et al.*, 1995).

Com o aumento da composição do sistema , valores menores foram observados para a fração retida da fase dispersa para todos os sistemas estudados, embora tenha ocorrido um aumento na viscosidade da fase contínua. Dados similares foram observados por Venâncio *et al.* (1995) e Sawant *et al.* (1990).

Pode-se verificar que a medida que aumenta a concentração do polímero (aumento da " tie line"), ocorre um aumento da tensão interfacial , como resultado, o diâmetro da gota aumenta, a diferença de densidade e a viscosidade também aumentam. O efeito combinado destas propriedades é que o tamanho médio das gotas e a velocidade da gota aumentem, e a fração retida da fase dispersa diminua (Clift *et al.*,1978) .

Com o aumento da velocidade com que a gota sobe, causada pelo aumento na diferença de densidades das fases, uma diminuição no tempo de residência da gota do PEG, reduzindo a fração retida da fase dispersa (Raghav Rao *et al.*,1991).

Este comportamento pode ser explicado em termos das propriedades físicas dos sistemas, tais como a viscosidade e densidade, que aumentam com o aumento da composição do sistema, como demonstrado na Tabela 5.1. As "tie lines" próximas ao ponto crítico apresentam os maiores valores para fração retida da fase dispersa. Estes resultados são similares aos obtidos por Jafarabad *et al.*, (1992a), utilizando sistemas PEG-Sais de fosfatos em coluna spray.

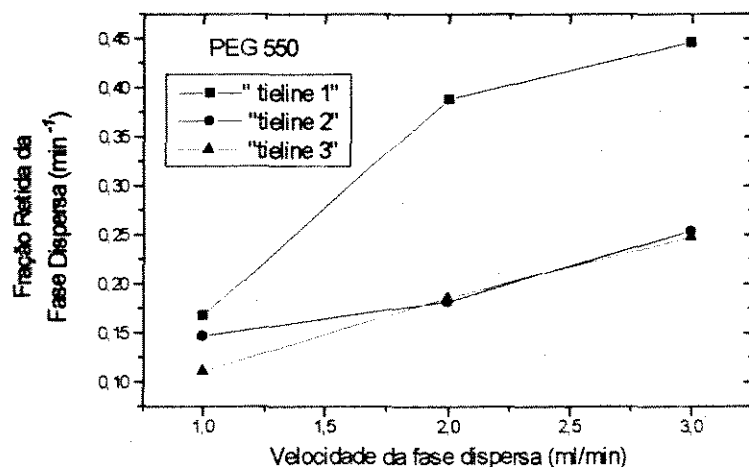


Figura 5.4- Efeito da velocidade da fase dispersa na fração retida da fase dispersa em sistemas PEG 550-Sais de fosfatos.

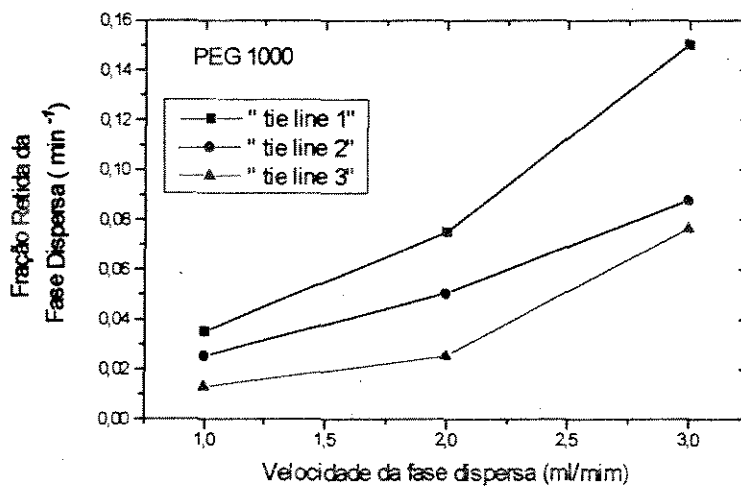


Figura 5.5- Efeito da velocidade da fase dispersa na fração retida da fase dispersa em sistemas PEG 1000-Sais de fosfatos.

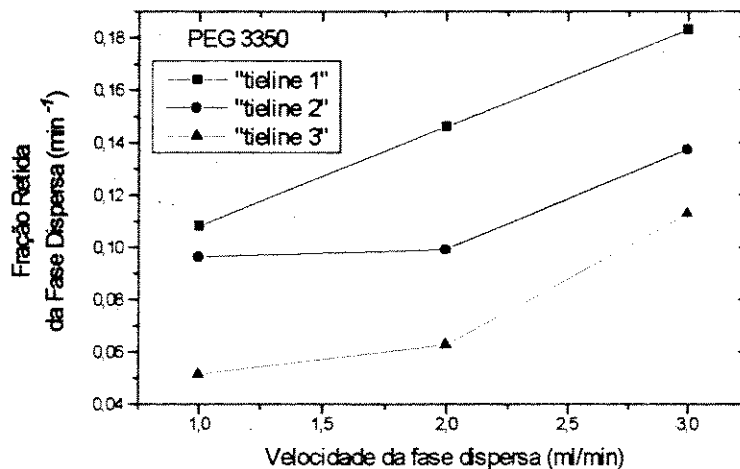


Figura 5.6-Efeito da velocidade da fase dispersa na fração retida da fase dispersa em sistemas PEG 3350-Sais de fosfatos.

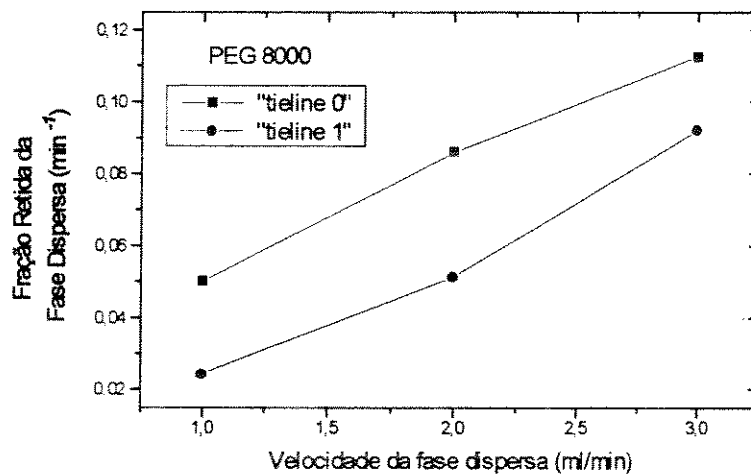


Figura 5.7-Efeito da velocidade da fase dispersa na fração da fase dispersa em sistemas PEG 8000-Sais de fosfatos.

Tabela 5.1- Propriedades reológicas, densidade e viscosidade, das duas fases dos sistemas de duas fases estudados (PEG-Fosfatos de potássio).

Tipo do polímero		Viscosidade (mPa.s)		Densidade (Kg/m ³)	
		PEG	Sal	PEG	Sal
PEG 550	" tie line 1"	5,9	2,4	1097,9	1224,2
	" tie line 2"	8,0	2,3	1098,6	1237,7
	" tie line 3"	12,5	2,5	1098,9	1270,0
PEG 1000	" tie line 1"	7,0	1,2	1093,0	1229,4
	"tie line 2"	10,0	2,2	1093,5	1282,1
	"tie line 3"	15,0	2,3	1094,8	1292,3
PEG 3350	" tie line 1"	18,0	1,0	1090,3	1198,6
	"tie line 2"	31,0	1,1	1090,7	1217,2
	"tie line 3"	48,0	2,2	1094,3	1267,8
PEG 8000	"tie line 0"	33,3	1,0	1078,6	1122,1
	"tie line 1"	46,0	0,9	1082,6	1159,4

5.5- Influência da vazão de alimentação na Eficiência de separação (Eficiência de Murphree) em diferentes composições dos sistemas bifásicos aquosos

As Figuras 5.8, 5.9, 5.10 e 5.11 mostram o efeito da vazão total de alimentação na eficiência de separação para os diferentes sistemas estudados. Pode-se observar que para a maioria dos sistemas analisados, a eficiência de separação foi praticamente independente da vazão de alimentação, apresentando valores muito próximos de 1.

Este comportamento foi mais visível a medida que aumentou-se a massa molecular do PEG (PEGs 3350 e 8000).

Para os sistemas de massa molecular do PEG 550 não houve uma nítida relação entre o aumento da eficiência de separação e o aumento da vazão total de alimentação, observando-se uma independência deste parâmetro com o aumento da composição do sistema.

Os resultados obtidos com extrator com palhetas rotativas mostraram um aumento da eficiência de separação com aumento da vazão total de alimentação, para velocidades de rotação acima de 2rps, utilizando sistemas ternário água-ácido acético-butanol e sendo estes valores menores do que 1 (Souza,1997).

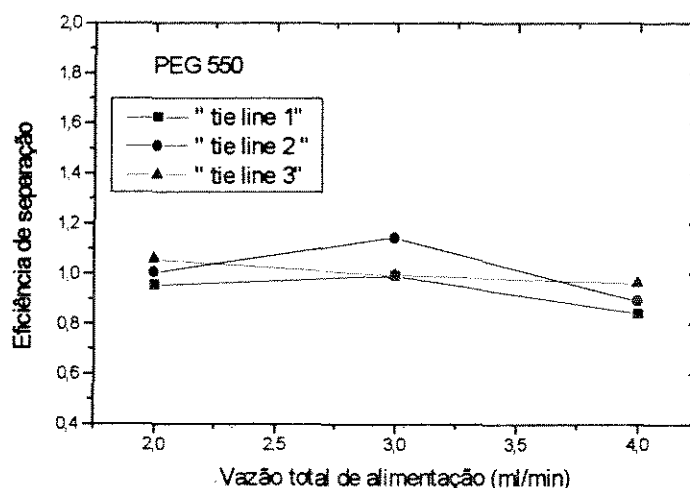


Figura 5.8- Efeito da vazão total de alimentação na Eficiência de separação em diferentes composições do sistema PEG 550.

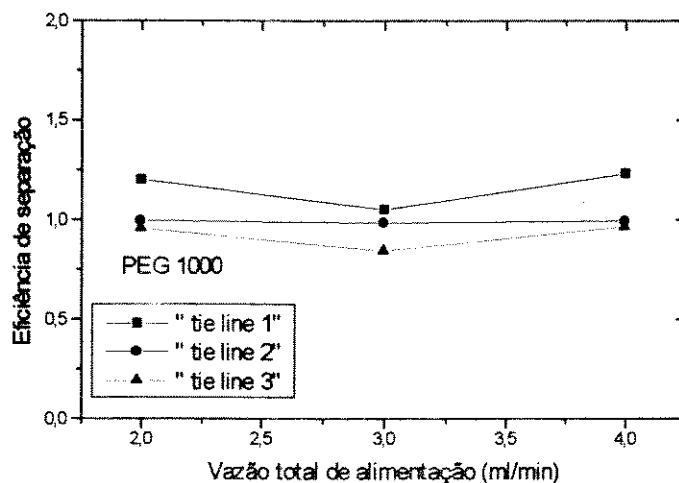


Figura 5.9- Efeito da vazão total de alimentação na Eficiência de separação em diferentes composições do sistema PEG 1000.

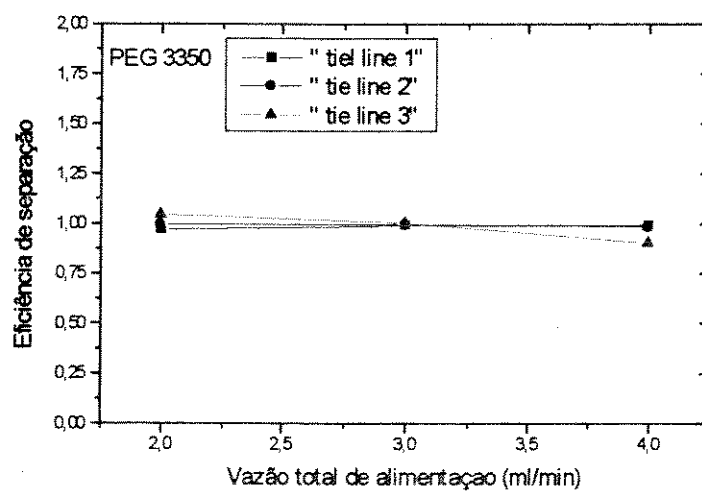


Figura 5.10- Efeito da vazão total de alimentação na Eficiência de separação em diferentes composições do sistema PEG 3350.

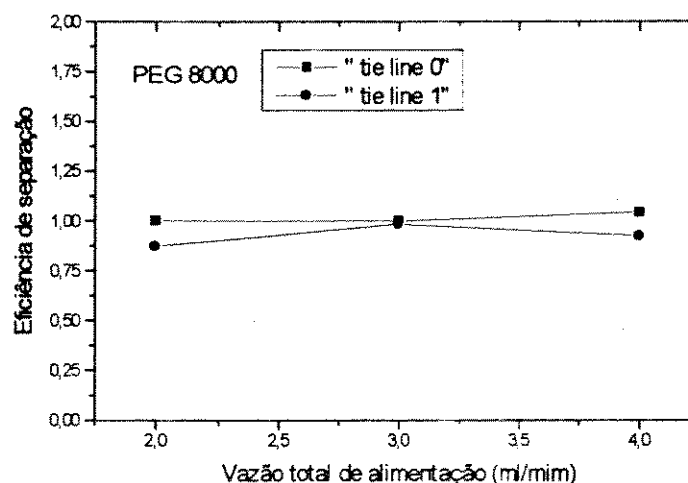


Figura 5.11- Efeito da vazão total de alimentação na Eficiência de separação em diferentes composições do sistema PEG 8000

5.6- Influência da vazão de alimentação no coeficiente de transferência de massa (Kda) em diferentes composições dos sistemas bifásicos aquosos

O efeito da vazão de alimentação no coeficiente de transferência de massa em diferentes composições dos sistemas PEG-Fosfatos de potássio estão ilustrados nas Figuras 5.12, 5.13, 5.14 e 5.15.

Os resultados obtidos com coluna PRDC, demonstraram uma independência do coeficiente de transferência de massa com relação a aumentos na velocidade da fase dispersa. Este comportamento foi mais evidenciado para os sistemas que apresentam PEGs de menores massas moleculares (PEG 550 e 1000).

Entretanto, resultados obtidos em coluna spray por vários autores (Sawant *et al.*, 1990; Raghav Rao *et al.*, 1991; Jafarabad *et al.*, 1992 a e b; Venâncio *et al.*, 1995;

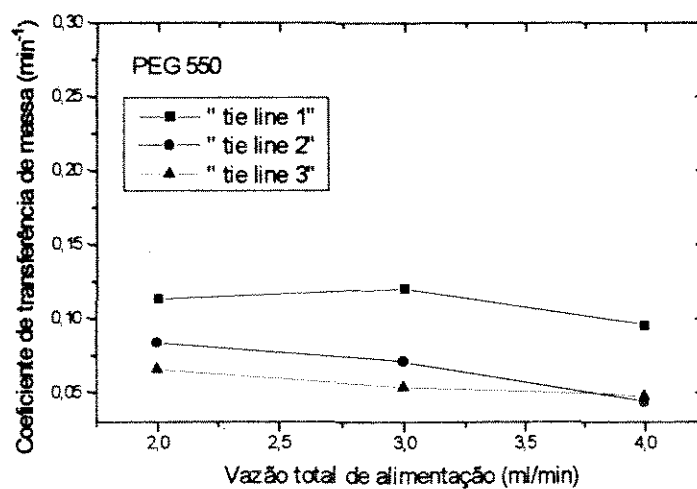


Figura 5.12- influência da vazão total de alimentação sobre o coeficiente de transferência de massa em diferentes composições dos sistemas PEG 550- Fosfatos de potássio.

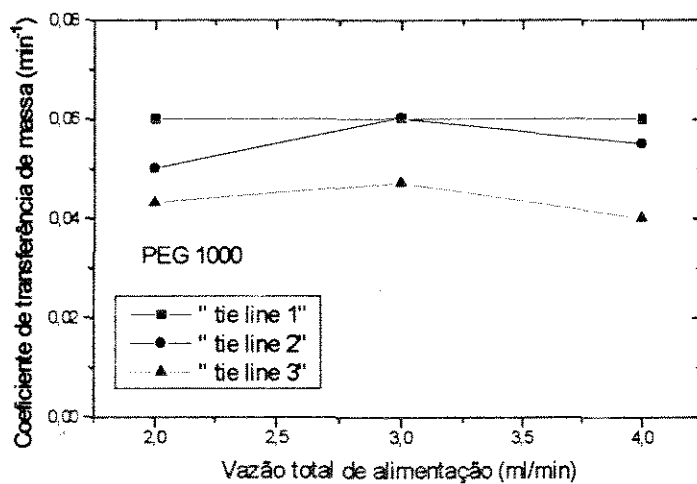


Figura 5.13- influência da vazão total de alimentação sobre o coeficiente de transferência de massa em diferentes composições dos sistemas PEG 1000-Fosfatos de potássio.

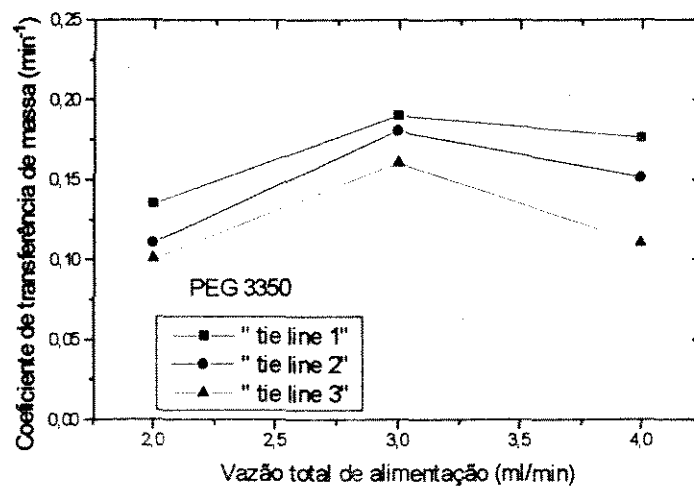


Figura 5.14- influência da vazão total de alimentação sobre o coeficiente de transferência de massa em diferentes composições dos sistemas PEG 3350- Fosfatos de potássio

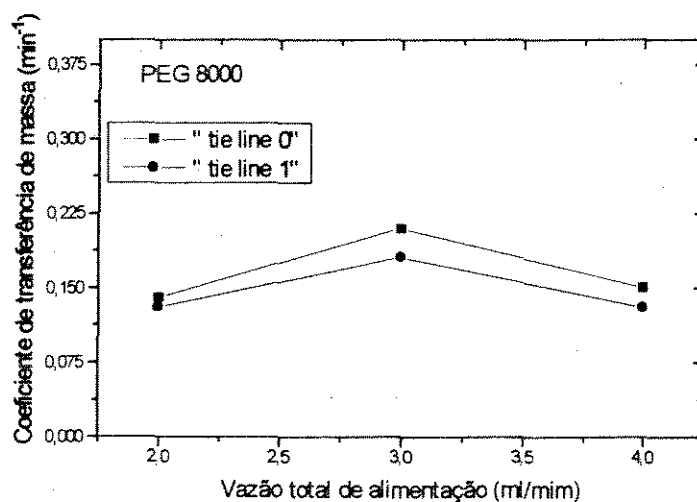


Figura 5.15- influência da vazão total de alimentação sobre o coeficiente de transferência de massa em diferentes composições dos sistemas PEG 8000- Fosfatos de potássio

e Pawar *et al.*, 1997) com sistemas de duas fases aquosas demonstraram um aumento do coeficiente de transferência de massa com o aumento da velocidade da fase dispersa, já que o tamanho das gotas a altas velocidades é menor e produz altas áreas de transferência de massa.

Estudos realizados por Sawant *et al.* (1990) sobre o comportamento da BSA em sistemas PEG-Dextran em colunas spray, demonstraram um aumento do coeficiente de transferência de massa com o aumento da velocidade dispersa, contudo quando foi construído o gráfico da taxa do coeficiente de transferência de massa por unidade de "hold up" versus a velocidade da fase dispersa (V_d), esta taxa apresentou-se independente da velocidade da fase dispersa. Esta observação indicou que o verdadeiro coeficiente de transferência de massa era independente deste parâmetro.

Pode-se verificar que o coeficiente de transferência de massa diminuiu com o aumento do comprimento da "tie line" para todos os sistemas utilizados. Estes resultados são corroborados com os obtidos pela literatura para sistemas de duas fases em coluna spray e York-Scheibel.

Sistemas PEG 4000- Fosfatos de potássio e PEG 4000- Sulfatos de sódio com BSA em colunas spray foram descritos por Jafarabad *et al.*, (1992 a), e os resultados experimentais apresentaram uma diminuição do coeficiente de transferência de massa com o aumento da composição do sistema.

Estudos com coluna spray com sistemas PEG-Reppal foram realizados por Venâncio *et al.* (1995), onde o coeficiente de transferência de massa para " tie lines" mais longas foram menores. E que este comportamento pode ser explicado pelo aumento na diferença de densidade de fases , viscosidade e tensão interfacial. Os

autores também concluíram que sistemas de composição próximas ao ponto crítico, apresentavam valores maiores de coeficiente de transferência de massa.

Segundo Forciniti *et al.* (1990) a tensão interfacial aumenta com o aumento da concentração do polímero e o efeito total do aumento na viscosidade de fases resulta na redução da difusibilidade da proteína e num aumento da espessura da camada limite entre fases comprometendo a transferência de massa. Como consequência, o coeficiente de transferência de massa volumétrico é menor para "tie lines" maiores.

Pode-se ainda observar nas Figuras 5.12, 5.13, 5.14 e 5.15, que ocorre um pequeno aumento dos valores do coeficiente de transferência de massa em relação ao aumento da massa molecular do PEG; resultados similares também foram encontrados nos estudos de Sawant *et al.* (1990) com sistemas PEG 8000-Dextran e Jafarabad *et al.* (1992 a) com sistemas PEG 4000-Fosfatos de potássio.

O comportamento da BSA em sistemas PEG 8000-Maltodextrinas em colunas spray, demonstraram que sistemas que apresentavam maiores valores de densidade e viscosidade, apresentavam menores valores de coeficiente de transferência de massa (Raghav Rao *et al.*, 1991).

Trabalhos realizados por Jafarabad *et al.* (1992 b) em colunas York-Scheibel com sistemas PEG 4000-Fosfatos de potássio e PEG 4000-Sulfatos de sódio, demonstraram valores de coeficiente de transferência de massa de 2 a 3 vezes maiores do que aqueles obtidos com estes mesmos sistemas em coluna spray.

Os valores obtidos para o coeficiente de transferência de massa para coluna de discos perfurados rotativos utilizando sistemas PEG-Fosfatos de potássio foram superiores aos encontrados na literatura para colunas spray e York-Scheibel (Sawant

et al., 1990; Raghav Rao *et al.*, 1991; Jafarabad *et al.*, 1992 a e b; Venâncio *et al.*, 1995 e Pawar *et al.*, 1997), em cerca de 26 vezes ; e esta informação é muito útil para o “scale up” do processo de extração com este tipo de coluna.

5.7- Extração descontínua do citocromo b5, protease e ascorbato oxidase

Os dados de extração descontínua do citocromo b5 foram obtidos diretamente da literatura, através dos trabalhos descritos por Sarmiento *et al.* (1994), onde foram realizados estudos sobre a partição do citocromo b5 utilizando sistemas PEG-Sais de fosfatos, com diferentes massas moleculares de PEG e diferentes comprimentos de “tie lines”.

As melhores condições de extração do citocromo b5 a partir de seu extrato impuro foram : sistemas PEG 1000-Sais de fosfatos pH 7,3, nas concentrações de 18% e 16% (p/p), respectivamente. Nestas condições, o citocromo b5 transfere-se da fase rica em PEG para fase rica em sal, com a recuperação de mais de 30% de proteína desejada na fase rica em sal, com um grau de purificação razoável (3,7).

Com este processo foi possível não só recuperar o citocromo b5, bem como remover os fragmentos celulares, uma vez que estes precipitaram-se na interface. Estes resultados foram utilizados para extração contínua do citocromo b5 em coluna de discos perfurados rotativos.

Os estudos relativos a extração descontínua da protease e ascorbato oxidase, foram realizados com os PEGs de mesma massa molecular e sistemas de mesmo comprimento de “tie line” utilizados para a extração do citocromo b5 para efeito de comparação de dados entre a extração das três proteínas, com massas moleculares

bem distintas, 13.600 Da, 47.000 Da e 150.000 Da, respectivamente para o citocromo b5, protease e ascorbato oxidase,

Nos estudos de extração descontínua da protease e ascorbato oxidase procurou-se investigar o efeito da massa molecular do PEG e do comprimento da "tie line", nos pHs ótimos da cada enzima. Os valores de pH utilizados foram 7,0 e 6,0 para protease e ascorbato oxidase, repectivamente.

Para cada tipo de sistema, as concentrações do polímero e sal foram escolhidas de forma a obter três "tie lienes": uma perto do ponto crítico, outra intermediária, e a última mais afastada do ponto crítico, tendo-se utilizado para este fim os diagramas descritos por Albertsson (1986).

5.7.1- Efeito da massa molecular do PEG na partição da protease e ascorbato oxidase

A partição da protease e ascorbato oxidase em sistemas PEG-Sais de fosfatos foi investigada pela adição de 500 μ l de extrato bruto da cada enzima nos diferentes sistemas, e avaliado o efeito do tamanho do polímero e concentração do sal.

Nestes sistemas, o coeficiente de partição foi determinado em termos da atividade enzimática. Na Figura 5.16, pode-se observar a afinidade da protease pela fase rica em PEG e a ascorbato oxidase pela fase rica em sal, demonstrado pelos valores do log de K para cada enzima. Em sistemas PEG 400-Fosfatos não houve formação de duas fases aquosas em equilíbrio, após a adição do extrato bruto contendo a protease, para as "tie lines" mais curtas, tendo sido observado este mesmo comportamento na partição do citocromo b5 em estudos realizados por Sarmento *et al.*, 1994.

Os dados experimentais obtidos demonstram que a protease tem partição preferencial para fase de baixa densidade (fase rica em PEG), provavelmente devido a fortes interações hidrofóbicas entre a proteína e os grupos etilenos do PEG (Porto et al., 1997). Resultados similares foram observados por Queiroz *et al.* (1995) com lipases de *Chromobacterium viscosum* em sistemas de duas fases aquosas, utilizando PEG e sais de fosfatos.

Os resultados obtidos com a ascorbato oxidase demonstraram um comportamento inverso, sendo neste caso, a partição preferencial pela fase mais densa (rica em sal) em todas as condições experimentais testadas, exceto para a "tie line" mais longa do PEG 3350, o que pode ser explicado pela natureza hidrofílica da enzima, sugerindo que a enzima possua relativamente mais grupos polares que interagem com o sal.

Embora, não haja literatura disponível com informações sobre a distribuição da protease de *S. clavuligerus* e ascorbato oxidase de *Curcubita maxima* com estes sistemas de extração, o comportamento encontrado pode ser explicado a partir destes fundamentos já descritos acima.

Quanto ao isolamento das proteínas a partir das fases salina e polimérica, pode ser realizadas por uma simples diálise, quanto se tratar da fase salina (para o citocromo b5 e ascorbato oxidase), o que permite que estas proteínas sejam mais facilmente purificadas e concentradas, com ganhos econômicos para o seu processo de extração. Enquanto que, no caso da protease, a sua preferência pelas fase PEG, necessita para seu isolamento nesta fase, um dos processos tais como: precipitação com sais, ultrafiltração e cromatografia.

Os estudos realizados por Schmidt *et al.* (1996), sobre a correlação entre o efeito da concentração de proteína total e o comportamento de partição das proteínas (amiloglucosidase, subtilisina e inibidor de tripsina) em sistemas de PEG 4000-sais de fosfatos demonstraram que a solubilidade das proteínas em solução de PEG é governada pelo efeito de exclusão estérico e pela interação hidrofóbica entre a proteína e o grupo etileno do PEG, o qual é provavelmente responsável pela alta solubilidade na fase superior (rica em PEG) de muitas proteínas hidrofóbicas. O PEG, sendo de natureza hidrofóbica, tende a interagir fortemente com as regiões não-polares das proteínas (boa afinidade por resíduos de aminoácidos não-polares).

Na fase rica em sal (fase inferior), o efeito “salting out” governa a solubilidade das proteínas, e a diminuição desta solubilidade na fase rica em sal, motivada pelo aumento na concentração de fosfatos, dá origem à transferência daquelas da fase rica em sal para fase rica em polímero, aumentando o coeficiente de partição. Apenas aquelas proteínas que possuem grupos mais polares é que interagem com alta concentração de sal (Sarmiento *et al.*, 1994).

Pode-se observar também nas Figuras 5.16, 5.17, 5.18 e 5.19 uma diminuição do coeficiente de partição e rendimento em termos de recuperação da atividade das enzimas, com o aumento da massa molecular do polímero, a partir do PEG 1000; este fato tem sido descrito por Atha *et al.* (1981), provavelmente como consequência do volume excluído.

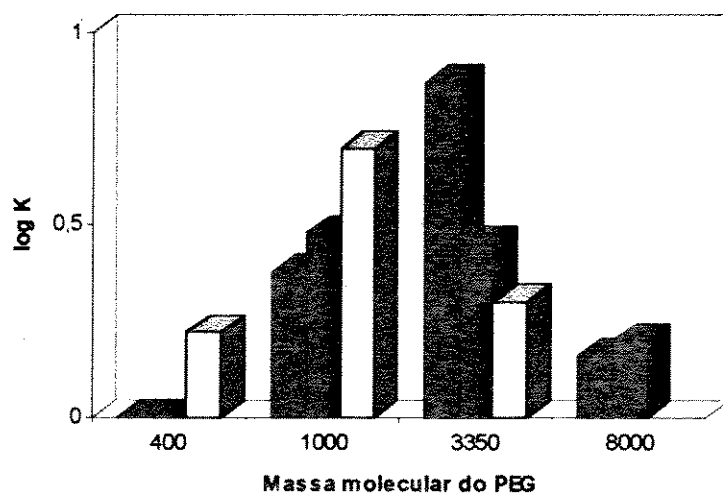


Figura 5.16- Efeito da massa molecular do polímero PEG sobre o coeficiente de partição da protease.

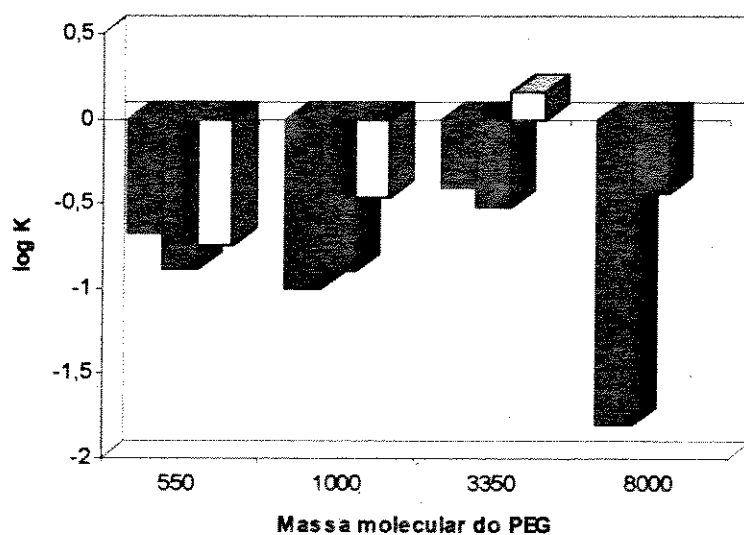


Figura 5.17- Efeito da massa molecular do polímero PEG sobre o coeficiente de partição da ascorbato oxidase.

Ainda pode-se verificar que os sistemas PEG 1000-fosfatos foram os que apresentaram melhores resultados em termos de recuperação da atividade das enzimas, e no caso específico da ascorbato oxidase, este valor atingiu mais de 100%, o que pode ser explicado pela possibilidade do polímero estabilizar as proteínas (Albertsson, 1971), ou ainda, a alta atividade recuperada pode ser devido a remoção de componentes no meio que inibem a atividade enzimática ou devido a mudanças na conformação da proteína (Queiroz *et al.*, 1995).

Valores superiores a 100% de recuperação da atividade lipolítica foram obtidos por Queiroz *et al.* (1995), para lipases de *Chromobacterium viscosum* utilizando sistemas PEG-fosfatos.

Sendo o polietileno glicol um polímero que possui um grupo hidroxila (- OH) ligado a cada um dos grupos - CH₂-CH₂ - terminais, é de se esperar que, para cada uma determinada concentração , a sua hidrofobicidade diminua com a diminuição da massa molecular uma vez que aumenta a representação daqueles grupos hidrofílicos terminais (Kula, 1985).

O polietileno glicol é um polímero composto por grupos - CH₂-CH₂ - ligados entre si por uma ligação éter. A solubilidade das proteínas em soluções deste polímero tem sido interpretada por vários autores em termos dos efeitos do volume excluído do polímero (Polson *et al.*, 1964; Juckes *et al.*, 1971; Atha *et al.*, 1981). Segundo a teoria desenvolvida por estes autores, as proteínas são excluídas estericamente de zonas do solvente ocupadas pelo polímero, sendo as solubilidades proporcionais ao volume de solvente disponível (solvente sem polietileno glicol). Assim, quanto maior for o volume excluído do polietileno glicol menor é o volume de solvente disponível, o que implica

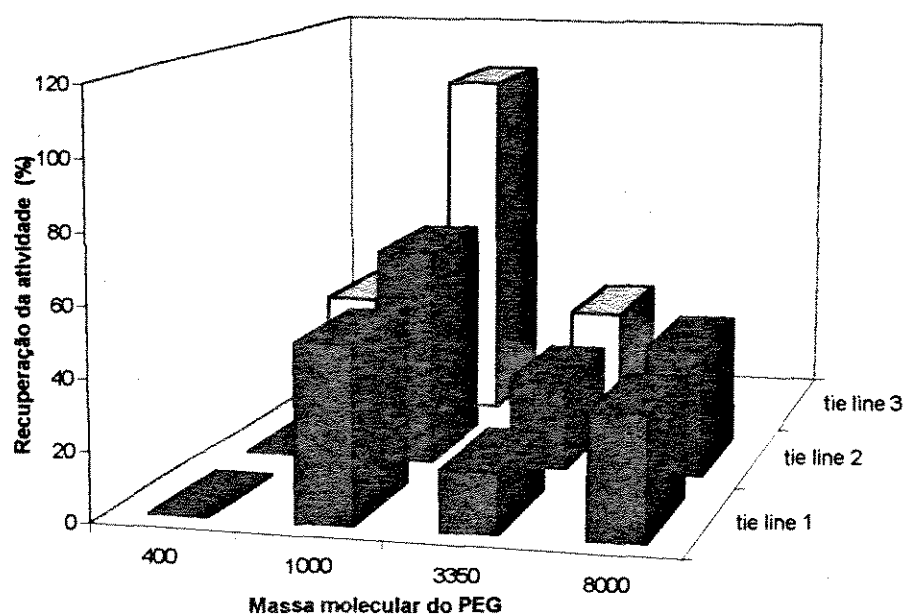


Figura 5.18- Efeito da massa molecular do PEG na recuperação da atividade enzimática da protease.

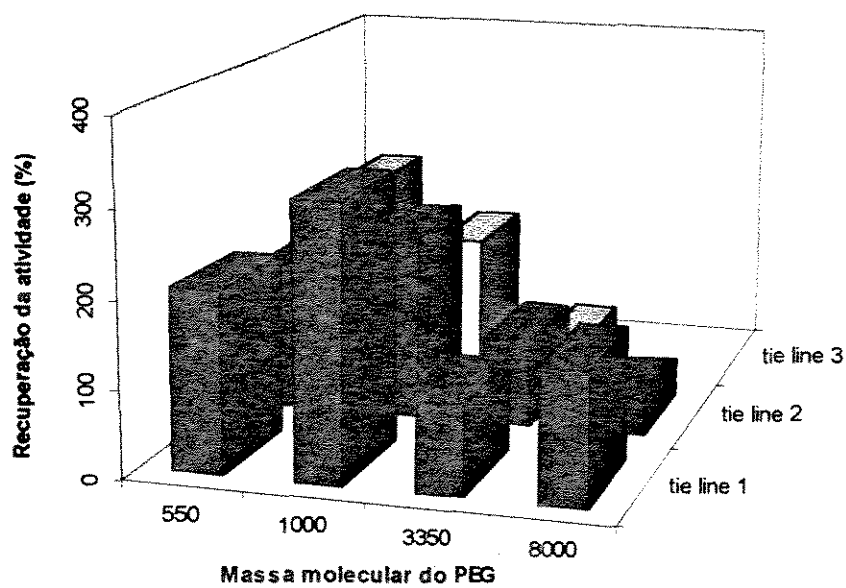


Figura 5.19- Efeito da massa molecular do PEG na recuperação da atividade enzimática da ascorbato oxidase.

uma diminuição de solubilidade das proteínas na fase rica em polímero e consequentemente uma diminuição do coeficiente de partição.

Em sistemas PEG-fosfatos, foi também observado uma diminuição no coeficiente de partição quando se aumenta a massa molecular do polietileno glicol (Kroner *et al.*, 1982). Além de que, a partição nestes sistemas mostrou-se também dependente da distribuição da massa molecular dos polímeros (Kula, 1982).

O efeito da massa molecular do polímero está muito relacionado também com a massa molecular do biomaterial. De fato, a partição de aminoácidos ou proteínas de baixa massa molecular não é muito influenciada por variações da massa molecular dos polímeros, não acontecendo o mesmo com proteínas de maior massa molecular (Albertsson, 1986).

Proteínas com alta massa molecular são mais influenciada por mudanças na massa molecular dos polímeros do que proteínas de pequena massa molecular; pode-se ter, como exemplo, o coeficiente de partição do citocromo c e β -galactosidase, no sistema com dextran 40 (0,18 e 0,24 ,respectivamente) com o correspondente valor no sistema dextran 500 (0,17 e 1,59, respectivamente) (Albertsson *et al.*, 1990).

Pode-se ainda ressaltar que a alteração da massa molecular do polietileno glicol pode induzir variações na composição das duas fases em equilíbrio, como alterações do diagrama de fases, afetando a partição de materiais biológicos (Sarmiento *et al.*, 1994).

Polímeros com diferentes massas moleculares podem entretanto ser usados para otimizar a separação de moléculas de diferentes tamanhos, e o melhor sistema selecionado poderá ser utilizado no " scale up" desta extração.

Nas Tabelas 5.2 e 5.3, pode-se observar os valores de recuperação de proteína total e o fator de purificação das enzimas em estudo em todos sistemas testados. Verifica-se que a percentagem de proteína total recuperada foi inferior à percentagem de atividade enzimática recuperada (Figuras 5.18 e 5.19) , o que contribui positivamente para o fator de purificação das enzimas; este comportamento foi mais evidente para ascorbato oxidase do que para protease.

Verifica-se também que a percentagem de proteína total para a ascorbato oxidase diminui com o aumento da concentração do polímero e que, com os sistemas de PEG 1000 ocorreu um aumento do fator de purificação com o aumento da concentração deste polímero para ambas as enzimas. Para os demais sistemas, a purificação não foi significativamente influenciada pela concentração do PEG. Estes resultados são corroborados com os obtidos por Sebastião *et al.* (1996) , trabalhando com extração da cutinase em sistemas PEG-Fosfatos, onde o decréscimo do rendimento em proteína total observado com o aumento do comprimento da " tie line" resultou na diminuição da atividade total recuperada com o aumento da concentração de PEG1000.

Valores máximos de fatores de purificação foram obtidos com sistemas de PEG1000 para a " tie line " mais longa, cerca de 4,0 e 22,0 para a protease e ascorbato oxidase, respectivamente.

Analisando o efeito dos parâmetros testados (massa molecular do PEG e comprimento da "tie line") no fator de purificação e rendimento do processo de extração da protease e ascorbato oxidase, foi possível escolher o sistema de duas fases aquosas formado por PEG 1000 e fosfatos mais adequado para purificação destas

Tabela 5.2- Extração líquido-líquido de protease a partir de seu extrato impuro usando sistemas PEG-fosfatos .

Polímero e concentração	Rendimento em proteína total (%)	Fator de purificação
PEG 400		
Tie line 1	não formou	
Tie line 2	fases	
Tie line 3	40,53	0,82
PEG 1000		
Tie line 1	39,00	1,27
Tie line 2	35,18	1,76
Tie line 3	26,34	3,94
PEG 3350		
Tie line 1	38,26	0,45
Tie line 2	13,00	2,19
Tie line 3	76,00	0,47
PEG 8000		
Tie line 0	27,00	1,40
Tie line 1	63,00	0,65

Tabela 5.3- Extração líquido-líquido de ascorbato oxidase a partir de seu extrato impuro usando sistemas PEG-fosfatos .

Polímero e concentração	Rendimento em proteína total (%)	Fator de purificação
PEG 550		
Tie line 1	30,40	6,80
Tie line 2	14,15	12,50
Tie line 3	18,55	11,80
PEG 1000		
Tie line 1	17,87	17,50
Tie line 2	12,63	17,00
Tie line 3	6,84	22,00
PEG 3350		
Tie line 1	39,00	2,60
Tie line 2	21,00	4,80
Tie line 3	3,40	2,40
PEG 8000		
Tie line 0	58,00	2,60
Tie line 1	35,00	1,20

enzimas a partir dos seus extratos brutos. Foi assim selecionado o sistema PEG 1000 (19,7% p/p)-Fosfatos de potássio (17,7% p/p).

O sistema bifásico aquoso escolhido possibilitou um fator de purificação de 4 vezes para a protease e 22 vezes para ascorbato oxidase, embora neste sistema o rendimento em proteína total foi de 26,4 % e 6,84%, apresentando uma recuperação em atividade de 105% e 149%, respectivamente para protease e ascorbato oxidase.

Como o passo de extração líquido-líquido em descontinuo se destinava à seleção do melhor sistema para recuperação da atividade enzimática e purificação para ser utilizado em extração contínua, foi atribuída maior importância à obtenção de uma recuperação em atividade e fator de purificação elevado, ainda que com prejuízo do rendimento total da proteína, uma vez que espera-se que, com a extração contínua este rendimento em proteína total seja aumentado neste processo.

5.8- Extração contínua utilizando coluna de discos perfurados rotativos utilizando sistemas de duas fases aquosas para extração de citocromo b5, protease e ascorbato oxidase

A recuperação e purificação de produtos biológicos é uma das áreas da biotecnologia que tem despertado maior atenção e interesse. A seleção de sistemas líquido-líquido apropriados implica a observação de regras convencionais bem definidas em processos de engenharia química: diferenças de densidade entre as duas fases superiores a 5% são requeridas, a viscosidade de ambas as fases deve ser inferior a 10mPas e a tensão superficial situar-se entre 1 a 50 mPam. Estas condições

são consideradas imprescindíveis para formação de uma dispersão de fases adequada (Cusak *et al.*, 1991).

Embora os sistemas bifásicos aquosos apresentem propriedades físicas bem diferentes dos sistemas convencionais orgânico-aquoso empregados em engenharia química, o único parâmetro que se encontra dentro dos limites referidos anteriormente é a diferença de densidade entre as fases. Contudo apesar destas diferenças, estes sistemas têm sido aplicados com sucesso a processos de extração líquido-líquido em grande escala (Hustedt *et al.*, 1985).

Dentre os diversos equipamentos de extração líquido-líquido, as colunas de extração do tipo PRDC, pela sua simplicidade de operação e construção, constituem uma das soluções mais atrativas quando se pretende misturar, equilibrar e separar duas fases líquidas imiscíveis.

A grande vantagem no uso deste tipo de coluna reside no fato da eliminação do emprego de dispendiosas centrífugas industriais, pois em coluna, a separação de fases é promovida pela gravidade, com consequente ganho econômico.

Poucas proteínas foram testadas em sistemas bifásicos aquosos para extração e purificação utilizando colunas de extração líquido-líquido. Os trabalhos encontrados na literatura referem-se ao uso de colunas spray e York-Scheibel na extração de BSA, amiloglucosidase e β -galactosidase com sistemas aquosos, e mesmo assim, a partir de sua forma comercial e de maneira semi-contínua.

Dada a escassez de resultados encontrados na literatura, especialmente no que se refere ao uso de colunas de extração que operem de modo contínuo, foram realizados estudos de extração contínua com três proteínas: citocromo b5, protease e

ascorbato oxidase a partir de seus extratos brutos com a presença de fragmentos celulares. Os resultados obtidos estão ilustrados nas Figuras 5.20a e b, 5.21a e b, 5.22a e b.

A extração contínua do citocromo b5, protease e ascorbato oxidase foi realizada em coluna de discos perfurados rotativos (PRDC) (Figura 3.1 a e b, do item 3.4) e em todos os experimentos, a proteína total, a atividade enzimática e a quantidade de citocromo b5, foram determinadas, em ambas as fases, após a extração.

Nesta etapa foram avaliadas a transferência de massa, a eficiência de separação, o rendimento em proteína total, a recuperação da atividade enzimática e o fator de purificação. Os sistemas PEG-Fosfatos utilizados nas extrações foram os selecionados previamente com extrações descontínuas ("batch") de cada proteína e as condições de operação da coluna foram : velocidade de rotação de 140 rpm, velocidade da fase dispersa de 3ml/min e da fase contínua de 1ml/min, com sete discos perfurados (dados obtidos dos estudos prévios com a BSA).

A extração do citocromo b5 foi realizada utilizando-se um sistema bifásico constituído de 18% p/p de PEG 1000 e 16% p/p de Fosfato de potássio a pH 7,3. No caso da protease e ascorbato oxidase, o sistema consistia de 19,7% p/p de PEG 1000 e 17,7 % p/p de Fosfato de potássio, com pH 7,0 e 6,0 respectivamente.

As Figuras 5.20a e 5.20b apresentam os resultados obtidos da extração contínua do citocromo b5. Pode-se verificar um aumento crescente da quantidade de proteína transferida a partir dos primeiros 10 minutos da fase rica em PEG para fase rica em sal até o final da extração, e consequente diminuição na fase rica em PEG.

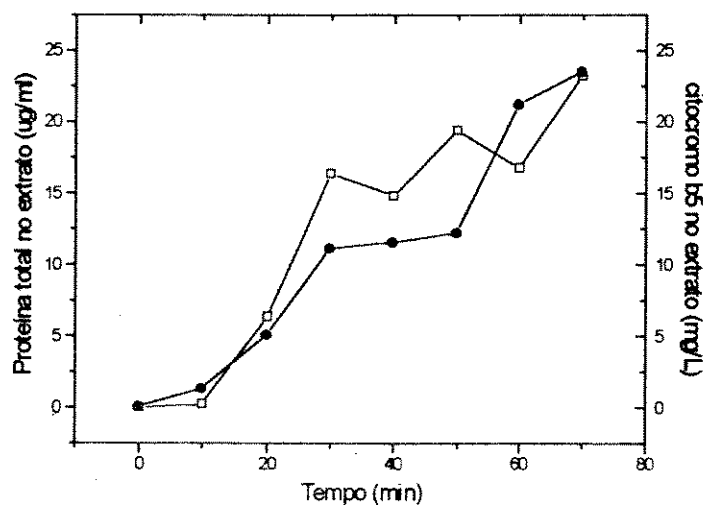


Figura 5.20 a - Proteína total (□-) e quantidade de citocromo b5 (●-) extraída na fase salina (extrato), após extração com sistemas PEG 1000-Fosfatos de potássio (18% e 16% p/p) e pH 7,3, a partir do seu extrato bruto na presença de fragmentos celulares.

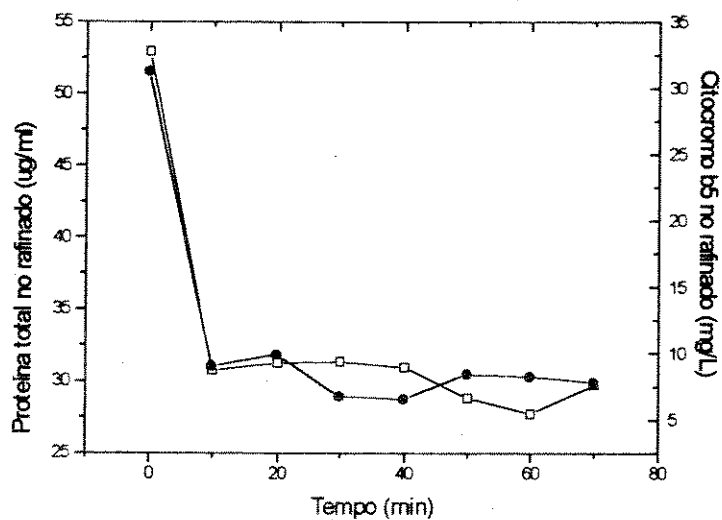


Figura 5.20 b - Proteína total (□-) quantidade de citocromo b5 (●-) residual na fase PEG (refinado), após extração com sistemas PEG 1000-Fosfatos de potássio (18% e 16% p/p) e pH 7,3, a partir do seu extrato bruto na presença de fragmentos celulares.

Após 60 minutos de operação cerca de 43% da proteína total foi transferida para fase salina (fase extrato). Durante todo o período do experimento foi observada a presença bem definida uma interfase entre as duas fases constituintes do sistema. A quantidade de citocromo b5 transferida para a fase extrato aumentou durante os 70 minutos de operação, atingindo o valor de 78%.

Na Figura 5.20b está ilustrado o comportamento da proteína total e citocromo b5 residual na fase PEG (fase refinado) após o processo de extração. Os resultados apresentados têm um comportamento oposto quando comparado com a Figura 5.20a, mostrando uma diminuição acentuada da quantidade de proteína total e citocromo b5 nos primeiros 10 minutos e uma pequena variação destes parâmetros até o final da extração.

A extração contínua da protease encontra-se apresentada nas Figuras 5.21a e 5.21b, onde observa-se um aumento constante no comportamento de transferência da proteína total e da atividade da fase sal (refinado) para fase extrato, que neste caso é a fase PEG, sendo este aumento observado até o término do ensaio, quando atingiu 38,54% da proteína total, e diminuição destes parâmetros na fase sal (fase refinado). Verifica-se que, após 10 minutos, não foi possível detectar atividade na fase sal durante todo o processo; este resultado sugere que a protease tenha sido transferida totalmente para fase extrato (fase PEG).

Os resultados obtidos da extração contínua da ascorbato oxidase estão apresentados nas Figuras 5.22a e 5.22b. Pode-se verificar um aumento crescente da transferência da proteína total e atividade da fase PEG (fase refinado) para fase

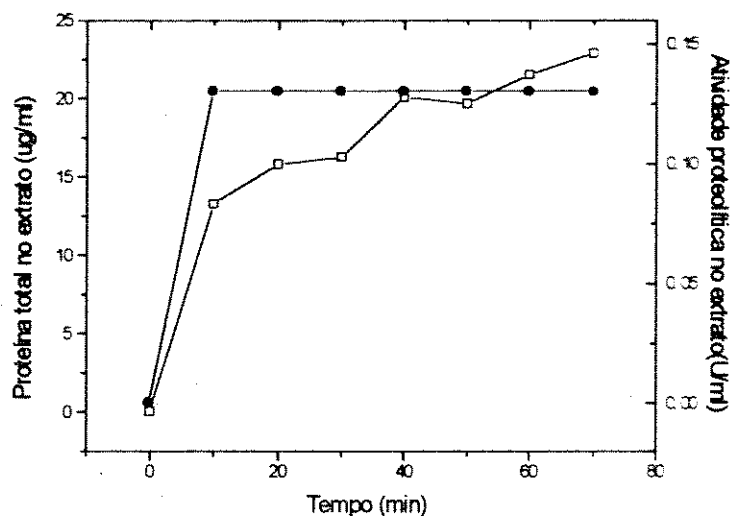


Figura 5.21 a - Proteína total (-□-) e atividade proteolítica extraída (-●-) na fase PEG (extrato), após extração com sistemas PEG 1000-Fosfatos de potássio (19,7% e 17,7% p/p) e pH 7,0, a partir do seu extrato bruto.

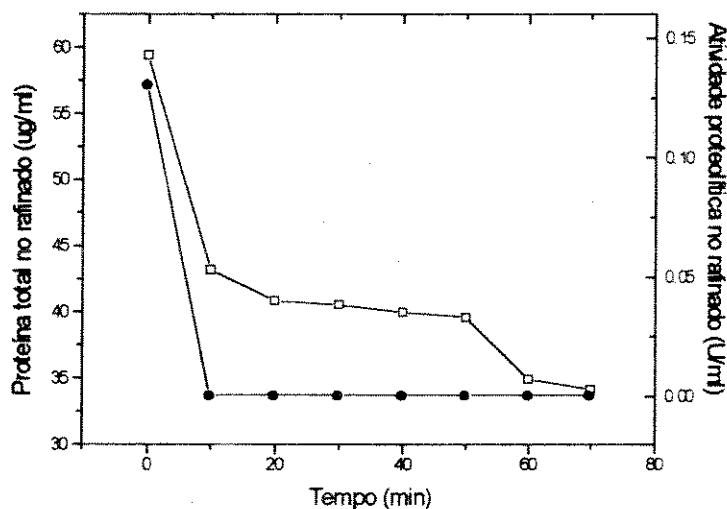


Figura 5.21 b - Proteína total (-□-) e atividade proteolítica residual (-●-) na fase salina (refinado), após extração com sistemas PEG 1000-Fosfatos de potássio (19,7% e 17,7% p/p) e pH 7,0, a partir do seu extrato bruto.

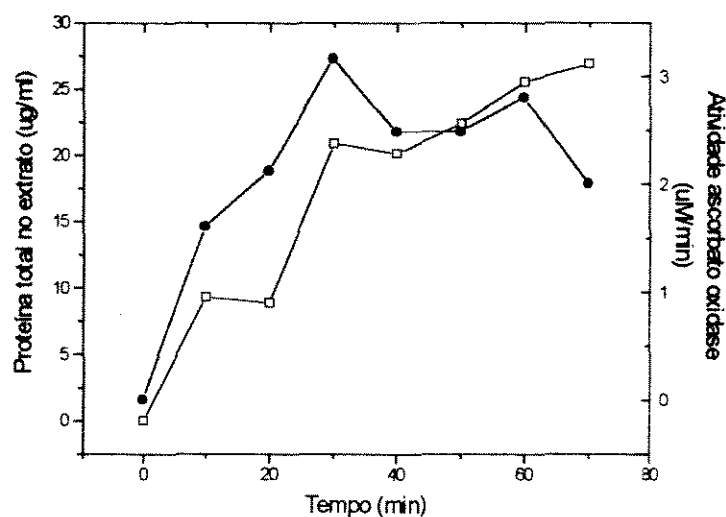


Figura 5.22a- Proteína total (□) e atividade ascorbato oxidase (●) extraída na fase salina (extrato), após extração com sistemas PEG 1000-Fosfatos de potássio (19,7% e 17,7% p/p) e pH 6,0, a partir do seu extrato bruto com fragmentos celulares.

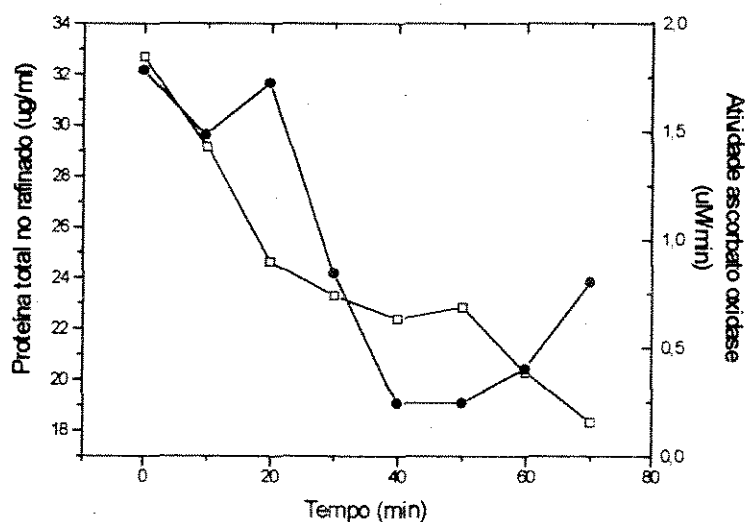


Figura 5.22 b - Proteína total (□) e atividade ascorbato oxidase residual (●) na fase PEG (refinado), após extração com sistemas PEG 1000-Fosfatos de potássio (19,7% e 17,7% p/p) e pH 6,0, a partir do seu extrato bruto com fragmentos celulares.

salina (fase extrato) durante todo o processo, sendo obtido cerca de 48% e 112%, respectivamente, de proteína total e recuperação da atividade. A partir dos 30 primeiros minutos ocorreu um aumento da atividade acompanhado de um decréscimo nos últimos 10 minutos finais.

Pela Figura 5.22b observa-se que a proteína total e a atividade decresceram com o tempo na fase PEG (fase refinado), demonstrando comportamento semelhante à extração do citocromo b5.

Estes resultados também foram observados por Carneiro-da Cunha *et al.* (1994), na extração de cutinase de meio de fermentação em sistemas micelares, utilizando coluna PRDC, onde ocorreu a transferência da proteína da fase aquosa (refinado) para fase micelar (fase extrato). Os autores obtiveram maiores quantidades de proteína extraída (54%) quando comparadas com extração em descontinuo (35%), o que concordando com os dados com os obtidos para as proteínas em sistemas bifásicos aquosos com o mesmo tipo de coluna.

Os dados obtidos do coeficiente de transferência de massa foram para citocromo b5, protease e ascorbato oxidase 0,06, 0,06 e 0,05 min⁻¹, respectivamente. Enquanto que os resultados de eficiência de separação foram: 0,97, 1,2 e 1,4 respectivamente, para o citocromo b5, protease e ascorbato oxidase. Estes resultados sugerem que o coeficiente de transferência de massa seja aparentemente independente da massa molecular da proteína a ser extraída; enquanto, os dados de eficiência de separação parecem demonstrar uma relação direta com o aumento da massa molecular da proteína a ser extraída.

Devido a falta de dados na literatura sobre extração contínua de proteínas em coluna PRDC com sistemas bifásicos aquosos, torna-se difícil a discussão dos resultados obtidos neste estudo, sendo estes relatados pela primeira vez na literatura.

Com estes estudos, tentou-se conhecer o comportamento de extração de proteínas com massas moleculares diferentes (13.600, 47.000 e 150.000 Da) a partir do extrato bruto obtido por fermentação ou por extração direta do material vegetal. A extração líquido-líquido com sistemas bifásicos aquosos, foi ainda utilizada como primeiro passo num processo alternativo de isolamento e purificação, em um simples passo.

5.9-Comparação entre os dados de extração líquido-líquido de modo descontínuo e contínuo do citocromo b5, protease e ascorbato oxidase

A tabela 5.4 permite comparar os resultados obtidos na extração descontínua e contínua das proteínas em estudo com sistemas bifásicos aquosos. Pode-se observar que o segundo tipo de extração permitiu um aumento no rendimento em proteína total, principalmente marcante para a enzima ascorbato oxidase.

Quanto ao fator de purificação, para o citocromo b5 o valor foi reduzido a metade e para as outras proteínas permaneceu praticamente constante. A recuperação em atividade e conteúdo de citocromo b5 aumentou para o citocromo b5 e protease, decaindo para a ascorbato oxidase.

Tabela 5.4- Comparação dos resultados obtidos pela extração líquido-líquido em sistema bifásico aquoso com proteínas em modo descontínuo e contínuo.

Proteína e modo de extração	Rendimento em proteína total (%)	Recuperação em atividade (%)	Fator de purificação
citocromo b5			
descontínuo	37,00	30,00	4,00
contínuo	44,00	78,00	2,00
protease			
descontínuo	26,00	105,00	4,00
contínuo	38,50	112,00	3,00
ascorbato oxidase			
descontínuo	6,80	149,00	22,00
contínuo	48,00	112,00	22,00

Estes resultados demonstram ser possível a utilização de colunas de discos perfurados rotativos para a extração e purificação de proteínas empregando sistemas bifásicos aquosos, tendo como vantagem ser um processo de extração em um único passo de purificação, enquanto os métodos clássicos de extração compreendem diversos passos de centrifugação e resuspensão.

6.0- CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTURO

No presente estudo foi proposto a utilização de uma coluna de discos perfurados rotativos para extração líquido-líquido de proteínas utilizando sistemas de duas fases aquosas.

Com base nos resultados experimentais obtidos dentro da faixa de operação trabalhada, podemos concluir que:

- 1) No estudo da influência da velocidade de rotação na fração retida da fase dispersa, no coeficiente de transferência de massa foi observado um aumento destes parâmetros para valores de velocidade de rotação inferiores a 150rpm, tendo-se obtido com a velocidade de 140rpm melhores resultados de Kda ($0,06 \text{ min}^{-1}$), a eficiência de separação apresentou-se independente da velocidade de rotação imposta aos discos;
- 2) O efeito da velocidade da fase dispersa na fração retida da fase dispersa estudados para sistemas bifásicos aquosos com diferentes composições, demonstraram um aumento crescente deste parâmetro com o aumento da velocidade da fase dispersa, sendo atingido maiores valores com a velocidade de fase dispersa de 3,0 ml/min e 1,0 ml para fase contínua. A fração retida da fase dispersa diminuiu com o aumento da composição do sistema (aumento da "tie line");
- 3) Nos experimentos realizados sobre a influência da vazão total de alimentação no coeficiente de transferência de massa (Kda) e eficiência de separação com diferentes composições de sistemas bifásicos aquosos, observou-se um comportamento independente do Kda com relação ao

aumento da vazão total de alimentação, entretanto maiores valores foram obtidos com a diminuição do comprimento da "tie line" para todos os sistemas estudados, contudo a eficiência de separação permaneceu praticamente independente nestas condições testadas;

- 4) Dados relativos a extração descontínua da protease e ascorbato oxidase, demonstraram que a primeira enzima apresentou partição preferencial pela fase PEG (fase superior) enquanto a segunda demonstrou um comportamento inverso, sendo sua partição preferencial pela fase sal (fase inferior). Com relação a recuperação da atividade da enzima e fator de purificação, os melhores resultados foram obtidos com sistemas PEG 1000-Fosfato, dados semelhantes são descritos na literatura para o citocromo b5;
- 5) Valores obtidos de rendimento total de proteína e fator de purificação para extração descontínua do citocromo b5, protease e ascorbato oxidase a partir de seus extratos brutos, foram 37,0%, 26,4%, 6,84% e 4, 4 e 22, respectivamente, que tornam viáveis a aplicação desta técnica à extração de proteínas, como primeiro passo num processo de isolamento e purificação;
- 6) Os valores obtidos com a coluna de discos perfurados rotativos para extração contínua de citocromo b5, protease e ascorbato oxidase a partir do seus extratos brutos, apresentaram maiores valores de proteína extraída de 44,0%, 38,5% e 48%, respectivamente quando comparados com o sistema descontínuo. Quanto ao fator de purificação permaneceu praticamente o mesmo com os dois sistemas de extração para protease e ascorbato oxidase, exceto

para o citocromo b5 o valor foi reduzido a metade, contudo apresentou com um ganho duas vezes maior no conteúdo em citocromo b5 total ;

Os dados aqui apresentados, permitiu demonstrar claramente a possibilidade da utilização de colunas de discos perfurados rotativos para extração de proteínas a partir de seu extrato bruto, sugerindo que este tipo de equipamento pode ser eficiente em sistemas de duas fases aquosas sem apresentar problemas de separação de fases. Além de ser uma técnica alternativa aos passos iniciais dos processos clássicos de purificação enzimática.

Estes são os primeiros relatos na literatura sobre a utilização deste tipo de equipamento utilizando sistemas de duas fases aquosas para extração de proteínas a partir de seus extratos impuros.

6.1- SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTURO

Como todo trabalho de pesquisa, este segue a regra , uma vez que é praticamente impossível a obtenção de um trabalho totalmente completo, e torna-se importante a apresentação de algumas sugestões para que possam contribuir para o melhor esclarecimento da hidrodinâmica deste equipamento na utilização com sistema bifásicos aquosos, serão propostos:

- Avaliar novas condições experimentais (tais como variação da razão de fases, efeito velocidade de rotação a valores menores, tempo de residência da fase polimérica e salina,), de modo a ampliar cada vez o

grau de conhecimento deste tipo de extrator em sistemas bifásicos aquosos;

- Desenvolver estudos de consumo e reciclagem dos reagentes, permitindo assim uma avaliação econômica para o processo neste tipo de extrator;
- Analisar o tamanho e velocidade de gotas obtida com sistemas bifásicos aquosos neste tipo de equipamento;
- Identificar as condições operacionais que provoquem uma inundação total no equipamento com sistemas bifásicos aquosos ;
- Testar a separação de outras biomoléculas, ou mesmo células com proteínas intracelulares e também estudar a influência da concentração de proteína e ou células na eficiência de extração.

7.0- ADENDO

Partes dos resultados obtidos deste trabalho foram publicados e apresentados em congressos nacionais e internacionais:

A.L.F., Porto, J.L., Lima-Filho, M.R., Aires-Barros, J.M.S., Cabral and E.B. Tambourgi. Extraction of recombinant cytochrome b5 from disrupted *Escherichia coli* cells with an aqueous two-phase system in a continuous perforated rotating disc contactor, **Biotechnology Techniques**, v. 11, n. 09, p.641-643. 1997.

A.L.F., Porto, J.L., Lima-Filho, M.R., Aires-Barros, J.M.S., Cabral and E.B. Tambourgi. Recovery of protease from fermentation broth with two-phase system in batch extraction and continuous perforated rotating disc contactor. **The First European Congress on Chemical Engineering-ECCE 1**, p. 2643-2645, Itália. 1997.

A.L.F., Porto, J.L., Lima-Filho, M.R., Aires-Barros, J.M.S., Cabral & E.B. Tambourgi. Continuous Extraction of Recombinant Cytochrome b5 from *Escherichia coli* Disrupted Cells With Aqueous Two-Phase System Using a Perforated Rotating Disc Contactor. **V Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas V SHEB**, 09-13 de dezembro de 1996, Maringá-PR.

A.L.F., Porto, J.L., Lima-Filho, M.R., Aires-Barros, J.M.S., Cabral and E.B. Tambourgi. Recovery of a Recombinant Cytochrome b5 and Extracellular Protease from fermentation Broth with Aqueous Two-Phase system in Continuous Perforated Rotating disc

Contactor. **19th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals**, 4-8 de maio de 1997, Colorado-USA.

A.L.F., Porto, J.L., Lima-Filho, M.R., Aires-Barros, J.M.S., Cabral and E.B. Tambourgi. Continuous extraction of recombinant protein with aqueous two-phase system using a perforated disc contactor, **13th International Congress of Chemical and Process Engineering -CHISA'98**, 23 a 28 de agosto, 1998, Praga-Czech Republic, aceito.

A.L.F., Porto, J.L., Lima-Filho, M.R., Aires-Barros, J.M.S., Cabral and E.B. Tambourgi. Extraction and purification of ascorbic oxidoreductase with aqueous two-phase system in batch and in a continuous perforated rotating disc contactor, **IV Iberian Congress on Biotechnology-I American Meeting on Biotechnology**, 12 a 15 de julho de 1998, Guimarães-Portugal, aceito.

A.L.F., Porto, J.L., Lima-Filho, M.R., Aires-Barros, J.M.S., Cabral and E.B. Tambourgi. Protease mass transfer and separation efficiency studies in aqueous two-phase system using perforated rotating disc contactor, **12^o Congresso Brasileiro de Engenharia Química- 12 COBEQ'98**, setembro de 1998, Porto Alegre-RS, aceito.

A.L.F., Porto, J.L., Lima-Filho, M.R., Aires-Barros, J.M.S., Cabral and E.B. Tambourgi. Recovery of protease from fermentation broth with aqueous two-phase system in batch extraction, **XXVI^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**, 3 a 6 de maio de 1997, Caxambu- MG.

A.L.F., Porto, J.L., Lima-Filho, M.R., Aires-Barros, J.M.S., Cabral and E.B. Tambourgi. Partitioning and purification of ascorbic oxidoreductase in aqueous two-phase systems, **XXVIIª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**, 23 a 26 de maio de 1998, Caxambu- MG.

8.0- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albertsson, P. A. Partition of cell particles and macromolecules. Wiley-Interscience, New York, 1986. 346p.
- Albertsson, P-A., Johansson, G. Tjerneld, F. Aqueous two-phase separations in **Separation Process in Biotechnology**, Juan A. Ansejo (ed), Marcel dekker, New York, cap. 10, p. 287-326, 1990.
- Albertsson, P-A., Carjarville, A. Brooks, D.E. Tjerneld, F. partition of proteins in aqueous two-phase systems and the effect of molecular weight of the polymer. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 926, p. 87-93, 1987.
- Atha, D.H., Ingham, K.C. Mechanism of precipitation of proteins by polyethylene glycols. Analyses in terms of excluded volume. **J. Biol. Chem.**, v 256, p.12108-12117, 1981.
- Beijerick, M.W, **Zbl. Bakt**, v.02, p.627-689, 1896.
- Boven, A. V., Jan, P.S.T., Konings, F. **Applied Environmental Microbiology**, v.54, p.43-49, 1988
- Bradford, M.M. **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 248-254, 1976.
- Buitelaar, R.M. Leenem, E.J.T.M., Tramper, J. Growth and secondary metabolite production by hairy roots of *Tagetes patula* in aqueous two-phase systems. **Biocatalysis**, v.06, p. 73-80, 1992.
- Cabral, J.M.S., Aires-Barros, M.R. Liquid-liquid extraction of biomolecules using aqueous two-phase systems : in **Recovery process for biological materials**, John Wiley & Sons Ltd (eds), New York, p. 273-301, 1993.
- Carneiro-da-Cunha, M.G. Aires-Barros, M.R., Tambourgi, E.B., Cabral, J.M.S. Recovery of recombinant cutinase with reversed micelles in a continuous perforated rotating disc contactor. **Biotechnol. Tech.**, v.08, p. 413-418, 1994.
- Carneiro-da-Cunha, M.G. **Separação e purificação de uma cutinase recombinante utilizando sistemas micelares**. Tese de Doutorado em Biotecnologia, Instituto Superior Técnico, Lisboa-Portugal, 1996.
- Carvalho Jr., L.B., Lima, C.J. Medeiros, P.H. **Phytochemistry**, v. 22, n. 10, p. 2423, 1981.
- Cascone, O., Andrews, B.A., Ansejo, J. A. Partitioning and purification of thaumatin in aqueous two-phase system. **Enzyme Microb. Technol.**, v.13, p. 629-635, 1991.

- Clift, R. Grace, J.R. Weber, M. E. Bubbles, drops and particles. New York: Academic Press, 1978.
- Cusack, R.W., Fremeaux, P., Glatz, D., Though basically simples, the technique has surprinsingly wide range of useful variations. **Chem. Eng.**, p. 66-76, 1991.
- Diamond, A. D., Hsu, J.T. Aqueous two-phase systems for biomolecule separation ;: in **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, Managing (ed), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, v.47, p.90-134, 1992.
- Dos Reis Coimbra, J. **Desempenho de um extrator tipo Graesser na separação de proteínas do soro de queijo usando sistemas aquosos bifásicos**. Campinas, 1995, 129p. Tese de Doutorado da faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1995.
- Dos Reis Coimbra, J. , Thommes, J., Kula, M-R. Continuous separation os whey proteins with aqueous two-phase systems in a Graesser contactor. **Journal of Chromatography A**, v. 668, p. 85-94, 1994.
- Eiteman, M. A. , Gainer, J.L. Peptide hydrophobicity and partitioning in polyethylene glicol- magnesium sulfate aqueous two-phase systems. **Biotechnology Progress**, v. 06, p. 479-484, 1990.
- Forciniti, D., Hall, C.R., Kula, M-R., Interfacial tension of polyethylene glycol-dextran-water systems: influence of temperature and polymer molecular weight. **J. Biotechnol.**, v.16, p. 279-296, 1990.
- Ginther, C.L. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 15, p.522-526, 1979.
- Góis, L.M.N. **Estudo e Desenvolvimento de um contactor de discos rotativo**. Tese de Mestrado. Faculdade de Engenharia Química -DEQ- Universidade Estadual de Campinas, Campinas-São Paulo, 1987.
- Gonzalez, G. Gonzales, C. Merino, P. **Biotechnology Letters**, v. 14, p. 919-924, 1992.
- Greve, A. , Kula, M-R. Cost structure and estimation for recycling of salt in a protein extraction process. **Bioprocess Eng.**, v. 06, p. 173-177, 1991.
- Hugenholtz, J., Sinderen, D.V. Kok, J. **Applied Microbiology**, v.53, p.853-859, 1987.
- Hughes, P., Lowe, C.R. Purification of proteins by aqueous two-phase partition in novel acrylic co-plimer systems. **Enzyme Microb. Technol**, v.10, p.115-122, 1988.

- Hummel, W., Schute, H., Kula, M.-R., New enzymes for the synthesis of chiral compounds. In **Enzyme engineering VII**, v. 434, A. Z. Laskin, G.T. Tsao, L.B. Wingard, Jr (eds), Academic of Sciences, New York, p. 194-205, 1984.
- Hustedt, H., Broner, B., Kroner, K.H., Papamichael, N. Fully automated countercurrent extraction of enzymes in two-stage plant. **Biotechnol. Tech**, v.01, p.49-54, 1987.
- Hustedt, H., Kroner, H.H., Kula, M.-R. Applications of phase partitioning in biotechnology. In Walter H., Brooks D.E. e Fisher D. (eds), **Partition in aqueous two-phase systems**, Academic Press, Orlando, p. 529-589, 1985.
- Jafarabad, K.R, Sawant, S.B., Joshi, J.B, Sidkar, S.K. Enzyme and protein mass transfer coefficient in aqueous two-phase system. I- spray extraction columns. **Chem. Eng. Sci**, v.47, p. 57-68, 1992 a .
- Jafarabad, K.R, Sawant, S.B., Joshi, J.B, Sidkar, S.K. Enzyme and protein mass transfer coefficient in aqueous two-phase system. II- York-Scheibel extraction columns. **Chem. Eng. Sci**, v.47, p. 69-73, 1992 b.
- Johansson, G. Determination of ionic charge by liquid-liquid partition, **J. Chromatography**, v. 32, p. 425-432, 1985.
- Juckes, I.R.M. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 229, p.535, 1971.
- Kennedy, F., Cabral, J.M.S. Recovery process for biological materials, New York; John Wiley, 1993.
- Kroner, K.H., Stach, W., Schutte, H., Kula, M.-R. Scale-up of formate dehydrogenase isolation by partition. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 32, p. 130-137, 1982.
- Kula, M.-R. Comprehensive Biotechnology , C.L. Cooney, A . E. Humphrey (eds), v. 02, p. 451-471, Pergamon Press, New York, 1985.
- Kula, M.-R. Purification of enzymes by liquid-liquid extraction, in **Advances in Biochemical Bioengineering**, A . Fiechter (ed), Springer-Verlag, New York, 1982.
- Kula, M.-R. Trends na futures prospects of aqueous two-phase extraction. **Bioseparation**, v. 01, p. 181-189, 1990.
- Kumar, A . , Hartland, S. **Trans. Instn. Chem. Engrs**, v.60, p. 35-39, 1982.
- Menge, U., Mon, M., Mayr, U., Kula, M.-R. Purification of human fibroblast interferon by extraction in aqueous two-phase systems. **J. Appl. Biochem**, v.05, p.75-90, 1983.

- Modlin, R.F., Alred, P.A., Tjerneld, F. utilization of temperature induced phase separation for the purification of ecdysone and 20-hydroxyecdysone from spinach. **J. Chromatography A**, v. 668, p. 229-236, 1994.
- Papamichael, N. Boren, B., Hustdet, H. Continuous aqueous phase extraction of proteins: automated on-line monitoring of fumarase activity and protein concentration. **J. Chem. Tech, Biotechnol.**, v. 50, p. 457-467, 1991.
- Papamichael, N. Boren, B., Hustdet, H. Continuous aqueous phase extraction of protein automated processing and recycling of process chemicals. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 54, p. 47-55, 1992.
- Pawar, P.A., Veera Parasu, U. Sawant, S.B. Joshi, J.B. Enzyme mass transfer coefficient in aqueous two-phase systems: modified spray extraction columns. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 75, n.04, p. 751-758, 1997.
- Polson, A., Potgieter, G.M., Largier, J.F., Mears, G.E.F., Joubert, F.J. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 82, p. 463, 1964.
- Pope, B.J., Shah, N.R. Na improved contactor for liquid-liquid extraction. **Int. solvent. Ext. Conference-ISEC**, p. 699-710, 1971.
- Porto, A. L.F., Lima-Filho, J.L., Aires-Barros, M-R., Cabral, J.M.S., Tambourgi, E.B. Extraction of recombinant cytochrome b5 from disrupted *Escherichia coli* cells with an aqueous two-phase system in a continuous perforated rotating disc contactor. **Biotechnol. Tech.**, v. 11, n.09, p. 641-643, 1997.
- Porto, A.L.F., Campos-Takaki, G.M., Lima-Filho, J.L. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 60, p. 115-122, 1996
- Pridham, T.G., Anderson, P., Foley, C. Lindenfelser, L.A., Hesseltine, C. W. Benedict, R.G. A selection of media for maintenance and taxonomic study of ***Streptomyces***. **Antibiotics Annual**, p. 947-953, 1956/1957 apud Shirling, E. B., Gottlieb, D. Methods for characterization of ***Streptomyces*** species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 16, n. 03, p. 313-340, 1966.
- Provenzano, M.D., Fujimoto, C.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk,
- Queiroz, J.A., Garcia, F. A .P., Cabral, J.M.S. Partitioning of ***Chromobacterium viscosum*** lipases in aqueous two-phase systems. **Bioseparation**, v. 05, p. 307-311, 1995.
- Rabelo, A. P. B. **Estudo da eficiência de separação numa coluna de extração líquido-líquido mecanicamente agitada por palhetas rotativas**. Tese de Mestrado em Engenharia Química, Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas-São Paulo, 1995.

- Raghav Rao, K.S.M.S., Szlag, D.S., Sikdar, S.K., Joshi, J.B., Sawant, S.B. Protein extraction in a column using a polyethylene glycol-maltodextrin two-phase polymer system. **Chem. Eng. J.**, v. 46, p. B75-B81, 1991.
- Reman, G.H. A new efficiency apparatus: the rotating disc contactor. **Proceedings Third World Petroleum Congress**, p. 121-131, 1951.
- Sánchez-Ferrer, A., Pérez-Gilabent, M., Núñez, E., Bru, R., García-Carmone, F. Triton -114 phase partitioning in plant protein purification. **J. Chromatography A**, v. 668, p. 75-83, 1994.
- Sarmiento, M.J. **Extração líquido-líquido de uma proteína recombinante, citocromo b5, utilizando sistemas de duas fases aquosas**. Lisboa, 1994, 74p. Tese de Mestrado em Engenharia Bioquímica- Instituto Superior Técnico de Lisboa, 1994.
- Sarmiento, M.J., Pires, M.J., Cabral, J.M.S., Aires-Barros, M.R. Liquid-liquid extraction of a recombinant protein, cytochrome b5, with aqueous two-phase systems of polyethylene glycol and potassium phosphate salts. **Journal of chromatography A**, v. 668, p. 117-120, 1994.
- Sawant, S.B., Sikdar, S.K., Joshi, J.B. Hydrodynamics and mass transfer in two-phase aqueous extraction using spray column. **Biotechnol. Bioeng.**, v.36, p. 109-115, 1990.
- Schmidt, A. S., Andrews, B. A., Ansejo, J. A. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 36, p. 617-626, 1996.
- Schmidt, A. S., Ventom, A. M., Ansejo, J. A. Partitioning and purification of α - amylase in aqueous two-phase systems. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 16, p. 131-142, 1994.
- Sebastião, M.J.C.B. **Purificação de lipases utilizando sistemas de duas fases aquosas**. Tese de Doutorado, 153p. 1996, Universidade Técnica de Lisboa, 1996.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A. K., Gardner, F.H., Hermanson, G.T., Mallia, A. K., Gardner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, C.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., **Analytical Biochemistry**, v.150, p.76-85, 1988.
- Souza, R.R. **Estudo e desenvolvimento de um extrator de palhetas rotativas**. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia Química da Universidade de Campinas- São Paulo, 1997.

- Walter, H., Johansson, G. partitioning in aqueous two-phase systems: an overview. **Anal. Biochem**, v. 155, p. 215-242, 1986.
- Westerterp, K.R., Landsman, P. Axial mixing in a rotating disk contactor- I apparent longitudinal diffusion. **Chem. Eng. Sci.**, v. 17, p. 363-372, 1962.
- Yang, W.Y., Lin, C.D., Chu, I.M., Lee, C.J. Extraction of cephalosporin C from whole broth and separation of desacetyl cephalosporin C by aqueous two-phase partition. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 43, p. 439-445, 1995.

- Strand, C.P., Olney, R.B., Ackerman, G.H. Fundamental Aspects of rotating disk contactor performance. **A. I. Ch. E. Journal**, v. 08, p. 252-261, 1962.
- Strothkamp, R.E., Dawson, C.R. **Biochemistry**, v. 16, p. 1926, 1977.
- Szoke, A., Campagna, P., Kriner, K. H., Hustedt, H. Improved extraction procedure for isolation of β -D- galactosidase from *Escherichia coli*. **Biotechnol. Techn.**, v.02, p. 35-40, 1988.
- Tambourgi, E.B. **Estudo da hidrodinâmica de uma coluna de discos rotativos**. Tese de Doutorado em Engenharia Química- Escola Politécnica da Universidade de São Paulo- São Paulo, 1989.
- Tambourgi, E.B., Pereira, J.A. F.R. The efficiency of a rotating disc contactor. **Latin Am. Appl. Research.**, v. 23, p.257-260, 1993.
- Tjerneld, F., Berner, S., Cajarville, A., Johansson, G. New aqueous two-phase system based on hydroxypropil starch useful in enzyme purification. **Enzyme Microb. Technol**, v.08, p. 417-423, 1986.
- Veide, A., Lindback, T., Enfors, S. O. Continuous extraction of β -D- galactosidase from *Escherichia coli* in aqueous two-phase system : effects of biomass concentration on partitioning and mass transfer. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 06, p. 325-330, 1984.
- Veide, A., Smeds, A. L., Enfors, S. O. A process for large-scale isolation of β -galactosidase from *Escherichia coli* in a aqueous two-phase system. **Biotechnol. Bioeng.**, v.25, p. 1789-1800, 1983.
- 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., Teixeira, J.A. Protein mass transfer studies on spray column using the PEG-Reppal PES 100 aqueous two-phase system. **Bioprocess Engineering**, v. 13, p. 251-255, 1995.
- Venâncio, A., Teixeira, J.A., Mota, M. Evaluation of crude hydroxypropil starch as a bioseparation aqueous-phase-forming polymer. **Biotechnol. Progress**, v. 09, p. 635-639, 1993.
- Von Bodman, S.B. Schuller, M.A., Jollie, D. R., Slingar, S.G. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.83, p. 9443-9447, 1986.