

Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia Química
Área de Concentração de Engenharia de Processos

**RECUPERAÇÃO DE PROTEÍNAS POR PRECIPITAÇÃO
E FLOTAÇÃO: POLIELETRÓLITOS E ÉTERES DE
CELULOSE COMO PRECIPITANTES**

Sebastião Avelino

Autor

Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana

Orientador

Prof. Dr. Everson Alves Miranda

Co-Orientador

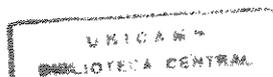
Tese submetida à comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Engenharia
Química da UNICAMP como parte dos requisitos necessários à obtenção do
título de Doutor em Engenharia Química

Campinas

Julho de 1997

Av32r

32215/BC



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
Unicamp	
Av 32r	
V.	Ex.
T: MBO BC/32.215	
PROC.	281/97
C <input type="checkbox"/>	D <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO R\$ 11,00	
DATA	25/11/97
N.º CPD	

CM-00103107-2

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

Av32r

Avelino, Sebastião

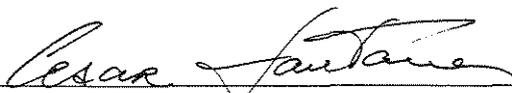
Recuperação de proteínas por precipitação e flotação:
polieletrólitos e éteres de celulose como precipitantes /
Sebastião Avelino. Campinas, SP [s.n.], 1997.

Orientadores: Cesar Costapinto Santana, Everson A.
Miranda.

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

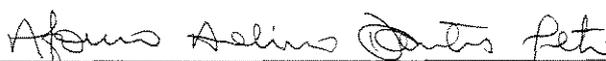
1. Proteínas - Separação 2. Precipitação (Química) 3. Flotação. 4. Polímeros. I. Santana, Cesar Costapinto.
II. Miranda, Everson A. III. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Tese defendida e aprovada, em 31 de Julho de 1997, pela banca
examinadora constituída pelos professores doutores:

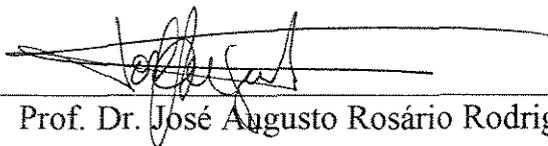


Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana

Orientador



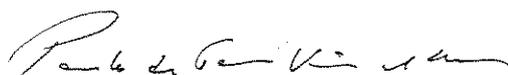
Prof. Dr. Afonso Avelino Dantas Neto



Prof. Dr. José Augusto Rosário Rodrigues



Prof.^a Dr.^a Sônia Maria Alves Bueno



Dr. Paulo de Tarso Vieira e Rosa

Esta versão corresponde à redação final da tese de doutorado defendida pelo Eng^o. Sebastião Avelino e aprovada pela banca examinadora em 31 de julho de 1997.



Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana

Agradecimentos

Ao Departamento de Engenharia Química (DEQ) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte pelo meu afastamento a fim de realizar o meu doutorado.

Ao Departamento de Termofluidodinâmica da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp pela oportunidade que me foi dada e pela utilização dos laboratórios.

Ao meu orientador prof. Dr. Cesar Costapinto Santana pela sua competência, compreensão, orientação e amizade ao longo do curso.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Everson Alves Miranda pela sua orientação técnica, sinceridade mesmo nos momentos difíceis e pelo aprendizado tanto a nível de organização de laboratório como também no desenvolvimento de todo o meu trabalho

À Prof^a. Dr^a. Maria Helena Andrade Santana pela cooperação e compreensão.

À Capes- Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - pelo apoio financeiro fornecido durante todo o trabalho de tese.

A minha esposa Maria Marlúcia da Rocha Avelino e aos meus filhos Mario Anderson Rocha Avelino, Karla Cristiane Rocha Avelino, Karlos Henrique Rocha Avelino e Keite Anny Rocha Avelino pela compreensão durante esse período que dediquei-me a esse trabalho.

Ao prof. Dr. Marcus Antônio de Freitas Melo (chefe do DEQ da UFRN no ano do meu afastamento) pelo apoio e incentivo dado à minha saída para doutoramento.

Ao Prof. Afonso Avelino Dantas Neto (atual chefe de DEQ da UFRN) pela colaboração e apoio dado no meu retorno, afim de que esse trabalho fosse concluído, assim como também pela aceitação de fazer parte da banca examinadora do meu doutorado.

Ao Engenheiro Dr. Paulo de Tarso Vieira e Rosa pelas sugestões técnicas e também por fazer parte da banca encaminhadora dessa presente tese.

Ao prof. Dr. José Augusto Rosário Rodrigues Prof^a. Dr^a. Sônia Maria Alves Bueno por terem participado da banca examinadora da minha tese.

Ao colega, irmão em Cristo e amigo Eduardo José de Arruda e família pela amizade e acolhida que me deram ao longo do curso, principalmente quando estive sozinho em Campinas.

Aos demais colegas do laboratório de biosseparação pela amizade e colaboração.

Resumo

A recuperação de proteínas por precipitação é uma técnica atrativa por ser de operação simples, de baixo custo e largamente utilizada na indústria em geral. Flotação é também uma técnica que apresenta estas propriedades de baixo custo e simplicidade de operação sendo largamente utilizada na indústria mineral. No entanto, os estudos que associam essas técnicas (precipitação de proteínas seguido de flotação desses precipitados) são bastantes escassos.

O objetivo deste trabalho foi estudar a recuperação de proteínas em uma solução utilizando as seguintes técnicas: a) Precipitação de proteínas utilizando-se polieletrólitos e polímeros não-iônicos. b) Testar a hidrofobicidade e flotabilidade desses precipitados e c) Separar os precipitados hidrofóbicos da solução através do emprego de flotação contínua em coluna..

Como polieletrólitos foram utilizados ácido poliacrílico (PAA) e quitosana. O PAA mostrou-se eficiente na precipitação de mioglobina (recuperação de 98%) a baixas dosagens (200-300 mg de PAA por grama de proteína). O quitosana mostrou-se igualmente eficiente na precipitação de pepsina no tocante tanto à recuperação de proteína como na recuperação de atividade. Apesar das altas recuperações nestas precipitações, a

flotabilidade destes foi mínima. Possivelmente uma carga residual ainda alta não propiciou hidrofobicidade suficientemente elevada para a adesão das partículas às bolhas de gás.

O precipitado formado por celulase com sulfato de amônio e do éteres de celulose, apresentou um caráter relativamente hidrofóbico e que apesar da baixa recuperação de atividade da celulase no precipitado usando sulfato de amônio com 40 % de saturação. No entanto foi possível recuperar totalmente a atividade desse através de flotação.

Os resultados deste trabalho mostraram ser de fundamental importância a utilização de agentes precipitantes de caráter hidrofóbico para que o precipitado formado possa ser separado do líquido por flotação. A neutralização de cargas por associação eletrostática entre proteínas e polieletrólitos, quer sejam estes catiônicos ou aniônicos, é suficiente em muitos casos para a eficiente precipitação do complexo formado, mas não para renderem às partículas significativa flotabilidade.

Abstract

Recovery of proteins through precipitation consists in an attractive technique as it is characterized by its simplicity, low cost and it is largely used in industry in general.

Flotation is also a technique (precipitation of proteins followed by flotation of these precipitates) are quite scarce.

The goal of the present work was to study proteins recovery in a solution with the use of the following techniques:

- a) Proteins precipitation using polyelectrolytes and non-ionic polymers.
- B) Testing the hydrophobicity and flotability of these precipitates.
- C) Separate the hydrophobic precipitates in the solution through the technique of continuous flotation in a column.

Polyacrylic acid (PAA) and chitosan were used as polyelectrolytes. PAA was found to be efficient in myoglobin precipitation (98 % recovery) under low rates (200-300 mg PAA/gram protein). Chitosan was also considered efficient in pepsin precipitation in relation to both protein recovery and activity recovery. Besides the high recoveries present in these precipitations, their flotability was very low. Possibly a residual high charge

did not allow enough high hydrophobicity for the adhesion of particles to the gas bubbles.

The resulting precipitate from cellulase with ammonium sulfate and from the ether cellulose presented a relatively hydrophobic characteristic even with the low activity recovery of cellulase in the precipitate, using ammonium sulfate with 40 % of saturation. However, it was possible to recover totally its activity through flotation.

Results taken from the present work show that there is a fundamental importance in the use of precipitating agents with hydrophobic characteristics with the goal of allowing the formed precipitate to be separated from the liquid phase through flotation. Neutralization of charges by electrostatic association between proteins and polyelectrolytes, either cationic or anionic, is enough in many cases for the efficient precipitation of the formed complex, but not to give the particles significant flotability.

Nomenclatura

- a - Atividade do soluto
- c_i - Concentração de íons
- G - Energia de Gibbs
- G_i^s - Energia de superfície
- i - Força Iônica
- m_i - Concentração
- N_a - Número de partículas por unidade de área
- N_v - Número de partículas por unidade de volume
- P - Probabilidade de coleção
- P_a - Probabilidade de junção
- P_c - Probabilidade de colisão
- Q - Taxa de fluxo de gás que entra na célula
- R - Raio limite
- r_b - Raio da bolha
- t - tempo
- V_c - Volume da célula
- z_i - Valência de íons
- γ - Tensão de superfície (energia livre por área de superfície)
- γ_{AB} - Energia livre de interface gás sólido

γ_{SA} - Energia livre de interface sólido-gás

γ_{SB} - Energia livre de interface sólido-líquido

γ_{LV} - Tensão de interface líquido-vapor

γ_{SL} - Tensão de interface sólido-líquido

γ_{SV} - Tensão de interface sólido vapor

SUMÁRIO

	Pg.
RESUMO	iii
ABSTRACT	v
NOMENCLATURA	vii
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiv
CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	1
1.1 Biotecnologia e processos de recuperação e purificação de bioprodutos	1
1.2 Precipitação e flotação e seus potenciais em processos biotecnológicos	2
1.2.1 Precipitação	2
1.2.2 Flotação	7
1.3 Utilização de flotação como processo de separação	12
1.4 Flotação como operação unitária	13
1.5 Objetivos e relevância do tema	16
CAPÍTULO 2 - Fundamentos da Precipitação de Proteínas	19
2.1 Característica gerais das proteínas	19
2.1.1 Tamanho e forma	21
2.1.2 Carga e hidrofobicidade	22
2.1.3 Solubilidade e função	23
2.2 Recuperação de proteína por precipitação	23
2.3 Aspectos físico- químicos de precipitação de proteínas	27
2.3.1 Estabilidade coloidal de proteína em suspensão	28

2.4 Métodos de precipitação de proteínas	28
2.4.1 Precipitação isoelétrica	29
2.4.2 Precipitação com polímeros não iônicos	29
2.4.3 Precipitação com polieletrólito	30
2.4.4 Precipitação de proteínas com sais	33
2.4.5 Precipitação com solventes orgânicos	36
2.4.6 Precipitação por temperatura	37
2.4.7 Precipitação por afinidade	39
CAPÍTULO 3 Separação de Proteínas por Bolha e Espuma	41
3.1 Considerações Gerais	41
3.2 Classificação geral dos processos de adsorção em bolhas	42
3.3 Termodinâmica da flotação	45
3.4 Cinética da flotação	47
3.5 Fracionamento por bolhas e espumas	51
3.5.1 Fracionamento por bolhas	51
3.5.2 Fracionamento com espuma	52
3.6 Flotação em coluna	53
3.6.1 Princípios operacionais	54
3.6.2 Parâmetro operacionais	60
CAPÍTULO 4 Materiais e Métodos	61
4.1 Materiais	61
4.1.1 Proteínas utilizadas	61
4.1.2 Polieletrólitos utilizados	62
4.1.3 Tampões utilizados	62
4.2 Métodos	62
4.2.1 Preparação de soluções	62
4.2.1.1 Preparação de solução estoque de HPMC MC	63
4.2.1.2 Soluções de proteínas	63
4.2.1.3 Solução saturada de sulfato de amônio	63
4.2.1.4 Solução de ácido dinitrosalicílico	64
4.2.2 Determinação de concentração de proteína	64
4.2.3 Determinação de atividade enzimática	65
4.2.3.1 Método de dosagem de atividade de pepsina ...	65
4.2.3.2 Métodos de dosagem de atividade da celulase .	66

4.2.4 Precipitação de proteínas com Polieletrólitos	67
4.2.4.1 Precipitação de mioglobina com ácido poliacrílico (PAA)	67
4.2.4.2 Recuperação de albumina de soro bovino (BSA) com quitosana.....	68
4.2.4.3 Precipitação de pepsina com quitosana	69
4.2.4.4 Precipitação seletiva de pepsina com quitosana em uma mistura binária pepsina e BSA	70
4.2.5 Precipitação de celulase	71
4.2.5.1 Experimentos preliminares de precipitação de celulase.	75
4.2.5.2 - Otimização da precipitação de celulase com HPMC.....	75
4.2.6 Ensaio de flotabilidade dos precipitados de proteínas	76
4.2.7 Flotação contínua do precipitado complexo celulase-HPMC	77
 CAPÍTULO 5 Resultados e Discussão	 82
5.1 Precipitação de mioglobina com ácido poliacrílico (PAA)	82
5.2 Recuperação de albumina de soro bovino com quitosana	84
5.3 Precipitação de pepsina com quitosana	90
5.4 Precipitação de pepsina e BSA com quitosana	95
5.5 Precipitação de proteína com sulfato de amônio e co-precipitantes	99
5.5.1 Resultados dos experimentos preliminares	102
5.5.2 Análise dos resultados do planejamento estatístico experimental	107
5.5.2.1 Massa protéica	108
5.5.2.2 Otimização de recuperação de atividade e massa protéica	114
5.6 Análise dos resultados experimentais e resultados estimados com modelo quadrático	119
5.7 Resultados dos testes de flotação contínua da celulase	123
5.8 Resultados dos testes de flotação contínua da celulase	127
 CAPÍTULO 6 Conclusão e Sugestões	 135
6.1 Conclusão	135
6.2 Sugestões	137
 CAPÍTULO 7 Referências Bibliográficas	 138

Lista de tabelas

Tabela		pg.
Tabela 1.1	Operações típicas usadas em processos de recuperação e purificação	4
Tabela 1.2	Técnicas de flotação classificadas com base no mecanismo de separação e tamanho do material separado	14
Tabela 2.1	Fatores de purificação em diferentes técnicas de separação	25
Tabela 4.1	Variáveis e níveis estudados	73
Tabela 4.2	Níveis das variáveis no planejamento estatístico	73
Tabela 5.1	Precipitação da mistura binária (pepsina e BSA) com quitosona à pH 5,0.	100
Tabela 5.2	Resultado da modelagem de precipitação da celulase (variável de resposta: porcentagem de recuperação da proteína total)	109
Tabela 5.3	Análise da variância dos teste de precipitação (variável de resposta: proteína total)	109
Tabela 5.4	Resultado da modelagem de precipitação de celulase (variável de resposta: porcentagem de recuperação da atividade total)	111
Tabela 5.5	Análise da variância dos teste de precipitação (variável de resposta: atividade total)	112

Tabela 5.6	Coeficientes de regressão e desvios padrão da recuperação de celulase	113
Tabela 5.7	Coeficiente de regressão	122
Tabela 5.8	Condições dos teste de flotação dos complexos HPMC-celulase	128
Tabela 5.9	Resultados da flotação contínua	129

Lista de Figuras

Figura		pg.
Figura 1.1	Fluxograma de um processo biotecnológico	3
Figura 1.2	Variações de cargas da proteínas e do polieletrólito com o pH. A uma faixa teórica de pH de precipitação é aquela na qual a proteína e polieletrólito possuem cargas líquidas com sinais opostos	6
Figura 1.3	Esquema do diagrama de uma célula de flotação	15
Figura 1.4	Célula de Hallimond	17
Figura 2.1	Esquema da distribuição de cargas e regiões hidrofóbicas na superfície de uma proteína típica (Scopes, 1988)	20
Figura 2.2	Representação do esquema da agregação de proteínas em uma mistura solvente orgânico e água (Scopes, 1988)	38
Figura 3.1	Fluxograma da classificação dos processos de separação por adsorção em bolhas (Lemlich, 1972)	43
Figura 3.2	Esquema da união de uma partícula à uma bolha de ar nos processos de flotação	46
Figura 3.3	Diagrama de coluna mostrando as zonas de coletas e de concentração	55

Figura 3.4	Estrutura da espuma. ϵ é uma fração de volume causado pelo aumento de volume devido ao gás (Yanatos et al., 1986)	59
Figura 4.1	Minicoluna de flotação utilizada nos testes de flotabilidade	78
Figura 4.2	Esquema básico da coluna utilizada nos experimentos de flotação	79
Figura 5.1	Recuperação de mioglobina com PAA de massa molecular de 90 kDa em tampão acetato 100 mM em função do pH. A dosagem de PAA igual a 0,2 mg de PAA por miligrama de mioglobina.....	83
Figura 5.2	Recuperação da mioglobina com PAA de massa molecular 90 kDa em tampão acetato 100 mM em (● pH 3,6; □ pH 4,5) Concentração de mioglobina igual a 1 mg/ml.....	85
Figura 5.3	Recuperação de mioglobina através da precipitação com PAA de várias massas moleculares (● 90 kDa, ■ 450 kDa e □ 1.000 kDa) e diferentes dosagens em tampão acetato 100 mM pH 5,0. Concentração de mioglobina 1 mg/ml.	86
Figura 5.4	Efeito do pH sobre a recuperação de BSA com quitosana. Concentração de BSA igual a 1 mg/ml; concentração de quitosana igual a 0,3 mg/ml. Dosagem igual a 300 mg de quitosana por grama de BSA. Acetato 100 mM pH igual a 5,0.	88
Figura 5.5	Efeito da dosagem sobre a recuperação do BSA com quitosana em tampão acetato 100 mM pH 5,9. Concentração da BSA igual a 1 mg/ml.	89
Figura 5.6	Estudo do efeito da concentração da pepsina (● proteína, □ atividade) com quitosana a dosagem de 0,2 mg de quitosana por miligrama de pepsina à pH 5,0	91

Figura 5.7	Recuperação de atividade através da precipitação da pepsina suína com quitosana em tampão acetato de sódio a 50 mM a diferentes valores de pH (● pH 3,4; ■ pH 4,2; □ pH 5,0).	93
Figura 5.8	Precipitação de pepsina suína com quitosana em tampão acetato de sódio 50 mM a diferentes valores de pH (● pH 3,4; ■ pH 4,2 e □ pH 5,0).	94
Figura 5.9	Recuperação de atividade da pepsina no precipitado realizado nos testes de precipitação de uma mistura binária pepsina-BSA (□ só pepsina e ● razão mássica de 0,5 mg de BSA por miligrama de pepsina) através do uso de quitosana como agente precipitante em tampão acetato 50 mM pH 5,0 a diferentes dosagens	96
Figura 5.10	Recuperação de pepsina no precipitado em testes de precipitação de mistura binária pepsina-BSA (□ razão mássica de 1 mg de BSA por miligrama de pepsina e ● e razão mássica de 2 mg de BSA por miligrama de pepsina) através do uso do quitosana em tampão acetato 50 mM pH 5,0 a diferentes dosagens	97
Figura 5.11	Precipitação de quitosana com sulfato de amônio. Fração solúvel do quitosana que permanece em solução. A concentração foi determinada pela quantidade de quitosana que permaneceu em solução medida e comparada com a concentração original.....	101
Figura 5.12	Precipitação de celulase e hidroxipropilmetilcelulose com sulfato de amônio 40% saturado à várias razões mássicas em tampão acetato pH 5,0	103
Figura 5.13	Recuperação de atividade através da precipitação de celulase (□ com HPMC e ● sem polímero) com solução de sulfato de amônio a diferentes porcentagens de saturação; razão mássica (mg de HPMC por miligrama de celulase) igual a 1. Tampão acetato 50 mM à pH 5,0 .	105

Figura 5.14	Precipitação de celulase (□ com HPMC e ● sem polímero) com solução de sulfato de amônio a diferentes porcentagens de saturação; razão mássica (mg de HPMC por miligrama de celulase) igual a 1. Tampão acetato 50 mM à pH 5,0.	106
Figura 5.15	Influência da temperatura na recuperação da atividade (●) e da proteína (□) no precipitado, nas condições de precipitação próximo ao ponto central. Vazão da adição do sulfato de amônio 80% de saturação igual a 15,1 ml/min	115
Figura 5.16	Influência do envelhecimento na recuperação da atividade (●) e da proteína (□) no precipitado, nas condições de precipitação próximo ao ponto central. Vazão da adição do sulfato de amônio 80% de saturação igual a 15,1 ml/min; frequência de agitação do shaker igual a 165 rpm e temperatura de incubação de 35 °C. ...	116
Figura 5.17	Influência da vazão da adição da solução de sulfato de amônio 80% saturada na recuperação da atividade (●) e proteína (□) no precipitado, nas condições de precipitação próximo ao ponto central. Tempo de envelhecimento igual a 11 horas; frequência de agitação do shaker igual a 165 rpm e temperatura de incubação de 35 °C	117
Figura 5.18	Influência da agitação do shaker na recuperação da atividade (●) e da proteína (□) no precipitado, nas condições de precipitação próximo ao ponto central. Vazão da adição da solução de sulfato de amônio com 80% de saturação igual a 15,1 ml/min; tempo de envelhecimento igual a 11 horas e temperatura de incubação de 35 °C.	118
Figura 5.19	Estudo do efeito da temperatura sobre a recuperação no precipitado através da superfície de resposta	120

Figura 5.20	Recuperação de atividade na precipitação de celulase com HPMC à vários pH para ser utilizado como alimentação nos experimentos de flotação (□ complexo formado por celulase-HPMC e ● sobrenadante). Vazão de adição da solução de sulfato de amônio a 80% de saturação igual a 100 ml/min; concentração final de celulase igual a 0,5 mg/ml; razão mássica igual a 1 mg de HPMC por miligrama de celulase; tempo de envelhecimento igual a 1 hora; agitação em pá mecânica a 50 rpm à temperatura de 25 °C.	124
Figura 5.21	Recuperação de proteína nos testes de precipitação de celulase com HPMC à vários pH para ser utilizado como alimentação nos experimentos de flotação (□ complexo formado por celulase-HPMC e ● sobrenadante). Vazão de adição da solução de sulfato de amônio a 80% de saturação igual a 100 ml/min; concentração final de celulase igual a 0,5 mg/ml; razão mássica igual a 1 mg de HPMC por miligrama de celulase; tempo de envelhecimento igual a 1 hora; agitação em pá mecânica a 50 rpm à temperatura de 25 °C.	125
Figura 5.22	Recuperação de atividade no concentrado dos testes de flotação de celulase (● sobrenadante e □ complexo sólido formado pela celulase e HPMC). Condições de flotação (Tabela 5.7).	130
Figura 5.23	Atividade no rejeito dos testes de flotação de celulase (● sobrenadante e □ complexo sólido formado por celulase e HPMC). Condições de flotação (Tabela 5.7)	131
Figura 5.24	Recuperação de proteína no concentrado dos testes de flotação de celulase (● sobrenadante e □ complexo sólido formado por celulase e HPMC) Condições de flotação (Tabela 5.7).....	132
Figura 5.25	Rejeito de celulase nos experimentos de flotação . (● sobrenadante e □ complexo sólido formado por celulase e HPMC). Condições de flotação (Tabela 5.7).	133

Capítulo 1

Introdução e Objetivos

1.1. Biotecnologia e processos de recuperação e purificação de bioprodutos

A biotecnologia é uma ciência que lida com a utilização de células animais, células vegetais e microorganismos ou partes destes para produzir produtos úteis ao ser humano. Um dos produtos mais antigos e conhecidos em todo mundo é o álcool etílico encontrado nas bebidas alcoólicas, principalmente do vinho obtido a partir da fermentação do suco de uvas. Dentre os bioprodutos destacam-se as proteínas por suas propriedades enzimáticas e terapêuticas. Proteínas são compostos macromoleculares formados pela associação de aminoácidos e possuem massas moleculares que podem variar de alguns milhares até a ordem de alguns milhões de dáltons.

A engenharia genética é responsável pelos mais recentes avanços em biotecnologia e entre esses avanços destaca-se a previsão do grau de controle dos crescimentos dos microorganismos.

A biotecnologia é uma ciência que depende muito da interação de diversas áreas de conhecimento tais como microbiologia, bioquímica e engenharia de processos. Normalmente num processo biotecnológico para produção de material microbiológico pode ser dividido em três partes:

preparação de meio de cultura, inoculação e esterilização; fermentação como a etapa de síntese; e processo de recuperação e purificação do produto da proteína desejada (Figura 1.1). Cada parte deve ser realizada em condições ótimas para maximizar o rendimento do produto final.

Com a finalidade de melhorar a produção de enzimas, Wenzig et al. (1993) sugeriu duas estratégias: A primeira consiste de uma manipulação genética de produção de microorganismos, enquanto que a segunda otimiza as condições de fermentação do meio. Todavia esses esforços são anulados, caso haja perda de produtos durante etapas subseqüente. Por essa razão é que os métodos de separação e purificação são considerados os mais importantes em processos de biotecnologia. As operações típicas de recuperação usadas em biotecnologia estão listadas na Tabela 1.1.

1.2 - Precipitação e flotação e seus potenciais em processos biotecnológicos

1.2.1 - Precipitação

A precipitação é utilizada para separar uma substância através da sua conversão em sólido, que em geral pode ser removido posteriormente por uma etapa de separação sólido líquido. Precipitação é um dos métodos primários utilizados na recuperação e concentração de produtos.

Precipitação é uma das técnicas mais simples e utilizadas na purificação de produtos biológicos. Como exemplo típico temos a precipitação de antibióticos e proteínas., cuja concentração desses produtos em solução é na faixa de 0,1 a 5% em peso. Tais concentrações são compatíveis com os valores usados em eluições cromatográficas, porém maiores que as concentrações usadas em operações de extração e adsorção (Belter et al., 1988).

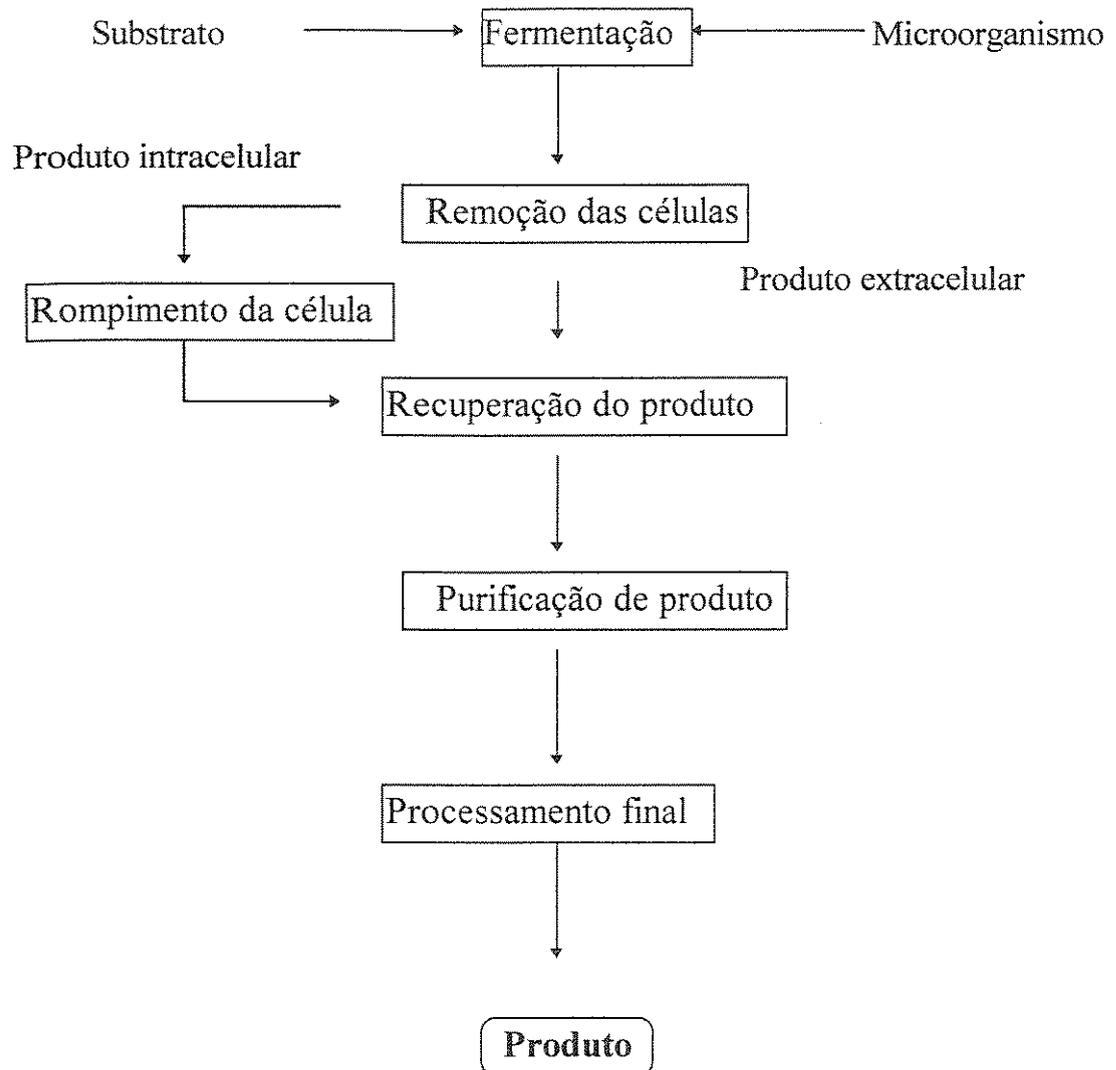


Figura 1.1 - Fluxograma de um processo biotecnológico (Wensing et al.,1993).

Tabela 1.1 - Operações típicas usadas em processos de recuperação e purificação (Wenzig et al., 1993).

Remoção de células	Centrifugação, filtração, flotação, floculação
Rompimento de células	Mecânico, térmico, químico, enzimático
Enriquecimento	Evaporação, , extração, fracionamento por espuma, precipitação processos de membranas
Purificação	Cromatografia, eletroforese , cristalização
Processamento final	Secagem

A precipitação de proteínas por diminuição de solubilidade através de modificações físico-químicas induzidas no solvente ou alternativamente na superfície do soluto é uma técnica relativamente conhecida e utilizada em tratamento de eluentes (Tchobanoglous e Burton, 1991).

A obtenção de um precipitado de natureza amorfo (flocos) pode ser conseguida com a variação do pH, adição de sais, solventes orgânicos, polímeros não iônicos polímeros contendo grupos ionizáveis denominados de polieletrólitos (Glatz e Fisher, 1990). Essa última alternativa é particularmente atrativa devido a sua efetividade mesmo a baixa concentração de substância que possuem moléculas contendo cargas positivas e negativas como é o caso das proteínas segundo as descrições dos trabalhos de Sternberg e Hershberger (1974), Clark e Glatz (1990) e de Chen e Berg (1993). Exemplos de polieletrólitos utilizados são: ácidos poliacrílicos (PAA), poliacrilamida, carboximetil-celulose (CMC) e polietileno glicol (PEG).

O esquema apresentado na Figura 1.2 mostra o efeito do pH na variação de cargas do polieletrólito e da proteína identificando a faixa teórica do pH na qual é possível ocorrer a precipitação. No presente trabalho procurou-se explorar esse fundamento através do estudo de diversas combinações de proteína-polieletrólito com o objetivo de obter dados que permitam prever o comportamento desses sistemas em operações de recuperação de proteínas efetuando-se a otimização das condições de precipitação.

A Recuperação de proteínas normalmente envolve uma etapa de precipitação. Bonnerjea (1986) analisou os dados relativos a purificação e aos rendimentos de purificação de proteínas publicados em 100 artigos

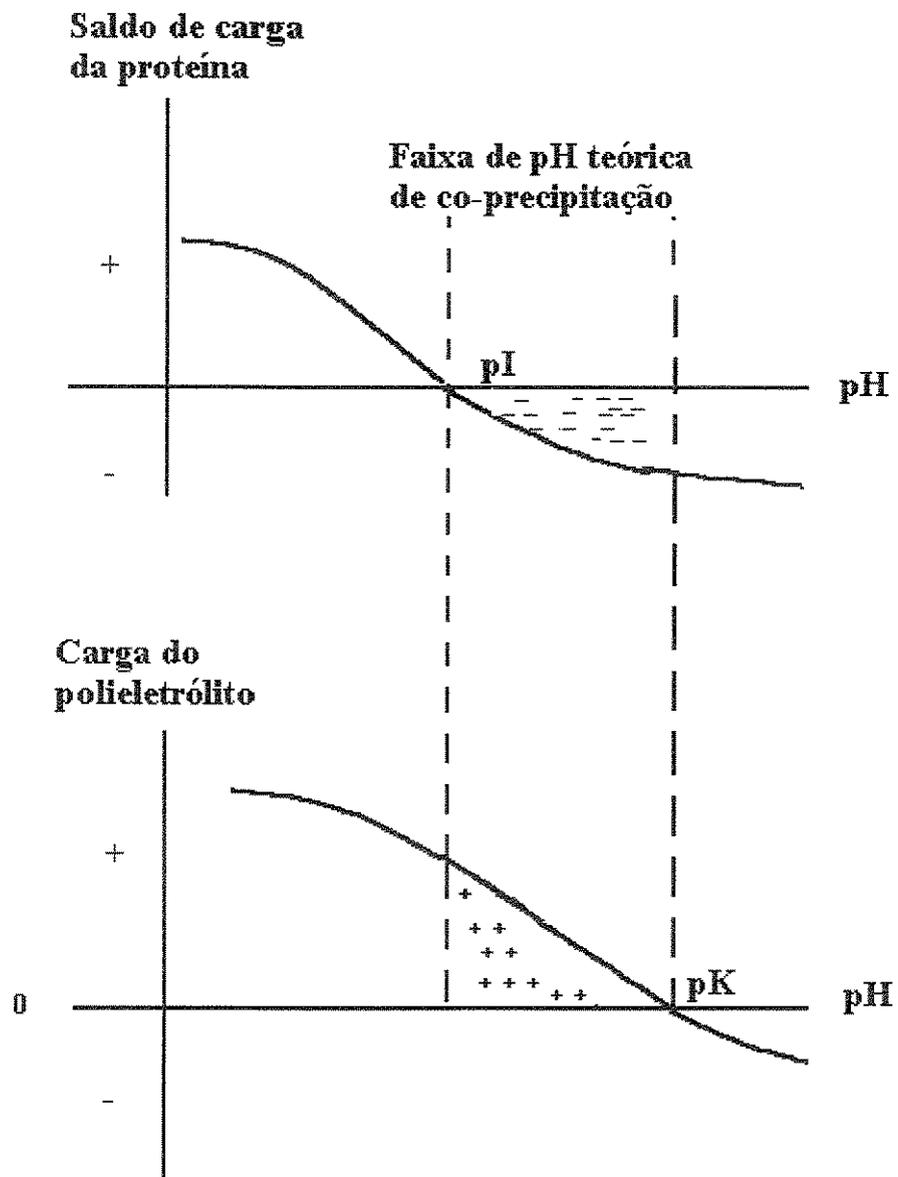


Figura 1.2 - Variações de cargas da proteína e do polieletrólito com pH. A faixa teórica de pH de precipitação é aquela na qual a proteína e polieletrólito possuem cargas líquidas com sinais opostos.

durante o ano de 1984 em oito jornais de bioquímica e observou que a maioria desses (57%) relatou o uso de pelo menos uma etapa de precipitação. Em processo de purificação de proteínas nos quais são usadas mais de uma etapa, a precipitação vem logo após a homogeneização, sendo então seguida pelas etapas de cromatografia de troca iônica, separação por

- afinidade e finalmente filtração em gel. Essa seqüência de técnica de purificação não está explícita nas literaturas padrão sobre purificação e recuperação de proteínas (Jacoby, 1984),(Cooper, 1977) e (Scopes, 1987). Essa seqüência pode ser explicada, pelo fato dos processos de precipitação apresentarem: um menor custo de operação e poder ser realizada em grandes quantidades

1.2.2 - Flotação

O uso de flotação até recentemente era limitado aos processos de recuperação ou enriquecimento de minérios (e que as pesquisas em biotecnologia eram concentradas apenas para o desenvolvimentos de novos bioreatores). No entanto na industrialização de bioprodutos é a recuperação e purificação desses produtos (RPP) quem determina a sua viabilidade econômica. Na primeira metade desse século a borracha natural de guayule (*Parthenium Argentatun Gray*) era produzida intermitentemente em escala comercial, usando flotação para separar a borracha do bagaço. Em 1976 o governo mexicano em parceria com as indústrias de borrachas sintéticas, polpa e papel construíram uma planta piloto, onde se utilizava uma coluna de flotação, cuja finalidade era melhorar os processos de separação de partículas ou de tratamento de resíduos industriais (Engler, 1984). Entre muitas técnicas de separação a flotação foi citado como uma das que

apresenta um grande potencial em biotecnologia (Gehle et al., 1991; Hernainz et al., 1987; Zlokarnik, 1990). Paralelamente no entanto, existe receio por parte de alguns pesquisadores devido a perda generalizada de atividade biológica. A perda na atividade dessas proteínas pode variar de 0 a 50 por cento, dependendo do sistema específico e das condições usadas (Thomas e Winkler, 1977; Uraizee e Narsimhan, 1990).

A potencialidade da aplicação de flotação em biotecnologia está relacionada a recuperação ou separação de sólido-líquido em processos de RPP, especialmente quando se trata de produtos de fermentação tais como proteínas aminoácidos, antibióticos e polissacarídeos. Essas separações podem ser obtidas através de duas aproximações. Primeiro, alguns produtos são insolúveis naturalmente e outros podem se tornarem insolúveis no meio e então serem flotados. Microorganismos, proteínas e polissacarídeos podem ser considerados bons exemplos de produtos solúveis que podem se tornarem insolúveis através de modificações no meio através de um agente precipitante. Segundo, a maioria dos métodos de separação em biotecnologia baseados em interações físicas ou químicas, podem ser adaptados para flotação usando-se precipitação como uma etapa intermediária na recuperação desses produtos..

Miyazu e Yano (1974) determinaram que *Mycotorula japonica* pode ser eficientemente recuperado de uma suspensão aquosa por flotação onde as células são crescidas com n-parafina ao invés de glicose. Recuperação contínua de *Hansenula polymorpha* e *Saccharomyces cerevisiae* de um meio de cultura a nível de planta piloto produziu resultados melhores que teste de laboratório no Institut für Technische Chemie, Alemanha, um dos institutos líderes no desenvolvimento de aplicação de flotação em biotecnologia (Gehle et al., 1991).

Precipitados de proteínas podem ser suficientemente hidrofóbico para serem adsorvidos às bolhas de ar. libuchi e co-autores reportaram que caseína e hemoglobina podem ser recuperadas por flotação de partículas melhor do que por fracionamento por espuma quando a proteína está em solução (libuchi et al., 1974).

Polissacarídeo com aplicação em alimentos ou não tais como xantano, curdlan, levano e derivados de celulose são bioprodutos que em algum ponto do seu protocolo de purificação utilizam uma etapa de insolubilização pelo uso de íons específicos pH álcool, aumento da força iônica, etc. (Cadmus et al., 1976; Godet; 1973; Han 1990; Harada et al., 1968). Todavia existe a possibilidade de substituição das etapas de centrifugação e especialmente de filtração por flotação nesses processos desde que esses produtos tenham uma tendência a formar géis que fechem drasticamente o meio filtrante. Muitos desses compostos são não iônicos, o que é uma característica desejável quando o objetivo final é ter uma partícula hidrofóbica.

A segunda aproximação em relação ao segundo parágrafo da página anterior é a recuperação de bioprodutos através do uso de um sistema carreador. Produtos solúveis podem ser flotados pela engenharia utilizando-se um sistema carreador insolúvel (ou pode ser insolubilizado) e flotável. A motivação para a construção de tais sistema está baseado na interação entre as moléculas que estão sendo separadas e um grupo de moléculas (agente de separação) adicionadas ao sistema, como um sólido, líquido ou uma espécie em solução. Tais interações podem ser não-específicas, como por exemplo, como no caso da adsorção do carvão vegetal ou específica tais como eletrostática, hidrofóbica ou interações por afinidade com substrato análogo, inibidores, antígenos, anticorpos, etc. Se o agente de separação de flotação

estiver situado na superfície de uma partícula, tem-se então o caso de adsorção. Se o bioproduto estiver em solução e houver a formação de duas fases imiscíveis, tem-se então o caso de extração em duas fases aquosas. A formação de um complexo insolúvel caracteriza uma precipitação comum ou precipitação por afinidade. Se o agente de separação é um composto de alta massa molecular e a separação física é acompanhada por ultrafiltração, tem-se o caso de ultrafiltração por afinidade. Em geral esses processos se baseiam em uma interação básica entre as moléculas que estão sendo separada e o agente de separação.

O uso desses princípios de separação na forma de flotação deve apresentar muitas vantagens. Primeiro a imobilização dos produtos em uma partícula pode contribuir para a proteção desta contra a desnaturação. Segundo, quando o agente de precipitação é um líquido, a flotação deve combinar as vantagens da adsorção com as vantagens da extração em duas fases aquosas (cinética rápida dos sistemas líquidos).

Uma das técnicas de flotação utilizada em biotecnologia é a flotação de partículas com ar dissolvido (FAD), esse tipo de flotação é aplicada quando as partículas em suspensão são muito pequenas, necessitando portanto de microbolhas para serem carretadas até o topo da coluna. Holland (1990) usou quitosona para promover formação de flóculo formado por quitosona e proteínas micobianas de uma suspensão de *Candida utilis* com subsequente recuperação de flocos utilizando o sistema de FAD. Nessa operação o autor obteve 98% de recuperação da célula. Couillard e Garipey (1990) utilizaram flotação para o tratamento de efluentes de matadouro de suínos e nesse caso os autores separaram as gorduras e o óleo dos efluentes por flotação, onde as concentrações residuais dessas gorduras e óleo foram de 4,4 e 5,2 mg/ml respectivamente. Bahr et al. (1991) estudaram o efeito da

recuperação das células de *Hansenula polymorpha* utilizando coluna de flotação. Nesse estudo, essas células produzidas na fermentação foram recuperadas continuamente pelo uso de flotação em coluna. A solução vinda diretamente do meio de cultura alimentava a coluna na proximidade do topo da região de coleta e o ar na base. Nagle e Rivard (1992) utilizaram FAD na produção de fertilizantes através da conversão biológica da fração orgânica de rejeitos de indústria de pescado de atum com rejeitos sólidos municipal.

Os esforços de pesquisa na área de flotação são justificados pela necessidade de produção e ou recuperação de produtos biológicos como por exemplos: proteína e enzimas a partir da fermentação desses. Miranda e Berglund (1993) utilizaram flotação precipitativa para recuperar e separar α -amilase de *Bacillus stearothermophilus* expressa em *Escherichia coli* pelo uso de um polímero de grau alimentício, hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e sulfato de amônio. Nesse trabalho, a enzima produzida no fermentador foi concentrada através de precipitação com hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e sulfato de amônio, em seguida esses precipitados foram separados da solução por flotação contínua em coluna. Em seu trabalho o autor conseguiu uma recuperação de atividade enzimática de mais de 90 por cento. Schurgerl et al. (1994) em seus trabalhos de recuperação e precipitação de proteínas citam flotação como uma possibilidade futura. Palmiers et al. (1996) testaram a eficiência da flotação de célula de levedo crescida em um meio de cultura e verificou que a habilidade de flotação não estava correlacionada diretamente com a concentração de proteína extracelular total da cultura, no entanto havia uma relação entre a hidrofobicidade da célula e a capacidade de flotação.

1.3 - Flotação como processo de separação

Os processos de flotação são úteis na separação de uma grande variedade de espécies, tais como, substâncias moleculares, iônicas, microorganismos, partículas minerais existente em uma solução. Esses processos são particularmente atrativos, principalmente em caso de separação envolvendo soluções muito diluídas, onde normalmente não é possível separar essas espécies pela maioria de outros processos. Propriedade como hidrofobicidade, indesejável em alguns processos devido a perda de atividade e problemas operacionais de fermentações, contribuem atualmente para que a flotação seja utilizada em tais moléculas (Evans et al., 1970; Kalischewski et al., 1979; Kolsaridu et al., 1983; Vardar-Sukan, 1988).

O sucesso da flotação depende principalmente da tendência com que essas substâncias que apresentam de atividade superficial (por exemplo, tensoativos) têm de se concentrar na interface água-ar e na capacidade do sistema de flotação de selecionar os materiais hidrofóbicos que não apresentam superfícies ativas por meio de adsorção ou associação com essa interface.

O efeito da dispersão das bolhas de ar na solução para conduzir as partículas até o topo da unidade de separação é fundamental para a obtenção de um bom desempenho nesse processo para melhorar a flotabilidade dessas partículas é aconselhável um aumento nos tamanhos dos flocos, sem no entanto aumentar a sua densidade (Priesing, 1962).

Sugere-se então que as partículas mais densas devem ser removidas por sedimentação antes de ser realizada a flotação, pois as mesmas podem misturar-se com as menos densas dentro dos flóculos, e diminuir a eficiência da flotação.

Com base no mecanismo de separação e tamanho do material a ser separado, o processo de flotação pode ser classificado segundo a Tabela 1.2 (Somasundaran e Ananthapadmannabhan, 1987). Então, a separação de espécies que apresentam superfície ativa tais como, detergente de solução aquosa é conhecida como fracionamento dessas espécies por espuma, enquanto substâncias que não apresentam superfície ativa, por exemplos, mercúrio e fosfato, os quais podem ser complexados com vários tensoativos é chamado de flotação molecular ou iônica. A separação de partículas de tamanho coloidal de superfície ativa e superfície não-ativa são conhecidas como flotação com espuma e microflotação respectivamente. Lemlich (1972) descreve um número de aplicações e possíveis aplicações desse tipo de flotação.

1.4 - Flotação como operação unitária

Flotação como a engenharia de minas prefere chamá-la, é um processo de separação de espuma. Em engenharia química, flotação é vista como uma operação unitária baseada na adsorção de partículas hidrofóbicas do mineral em suspensão aquosa nas bolhas de ar. Flotação é uma operação unitária simples, versátil, de baixo custo operacional muito utilizada na separação seletiva e concentração de partículas, principalmente minerais.

Em flotação, a alimentação é constituída de uma solução contendo partículas em suspensão, no caso de flotação de minério, o mesmo é triturado para aumentar a área superficial, e em seguida diluído em água com reagentes de flotação desejados, incluindo modificadores de pH e coletores. O sistema é agitado em uma célula de flotação como mostrado na Figura 1.3, onde o ar introduzido na zona de agitação fica bem disperso na solução.

Tabela 1.2 - Técnicas de flotação classificadas com base no mecanismo de separação e tamanho do material separado (adaptado de Somassundaran e Ananthapadmannabhan, 1987).

Mecanismo	Molecular	Tamanho da partícula	
		Microscópio	Macroscópico
Substâncias com atividade de superfície	Fracionamento com espuma, por exemplo, detergente em solução aquosa	Flotação por espuma: exemplo, precipitados contendo proteínas, microorganismo,	Flotação de minerais não polares: exemplo, enxofre
Associação com tensoativos	Flotação de íons, flotação de moléculas, flotação de colóide: exemplo, Sr^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} .	Microflotação, flotação de colóide, : exemplo, partículas em água residuais, microorganismo, argila	Flotação: exemplo, minerais tais como sílica Flotação de precipitados

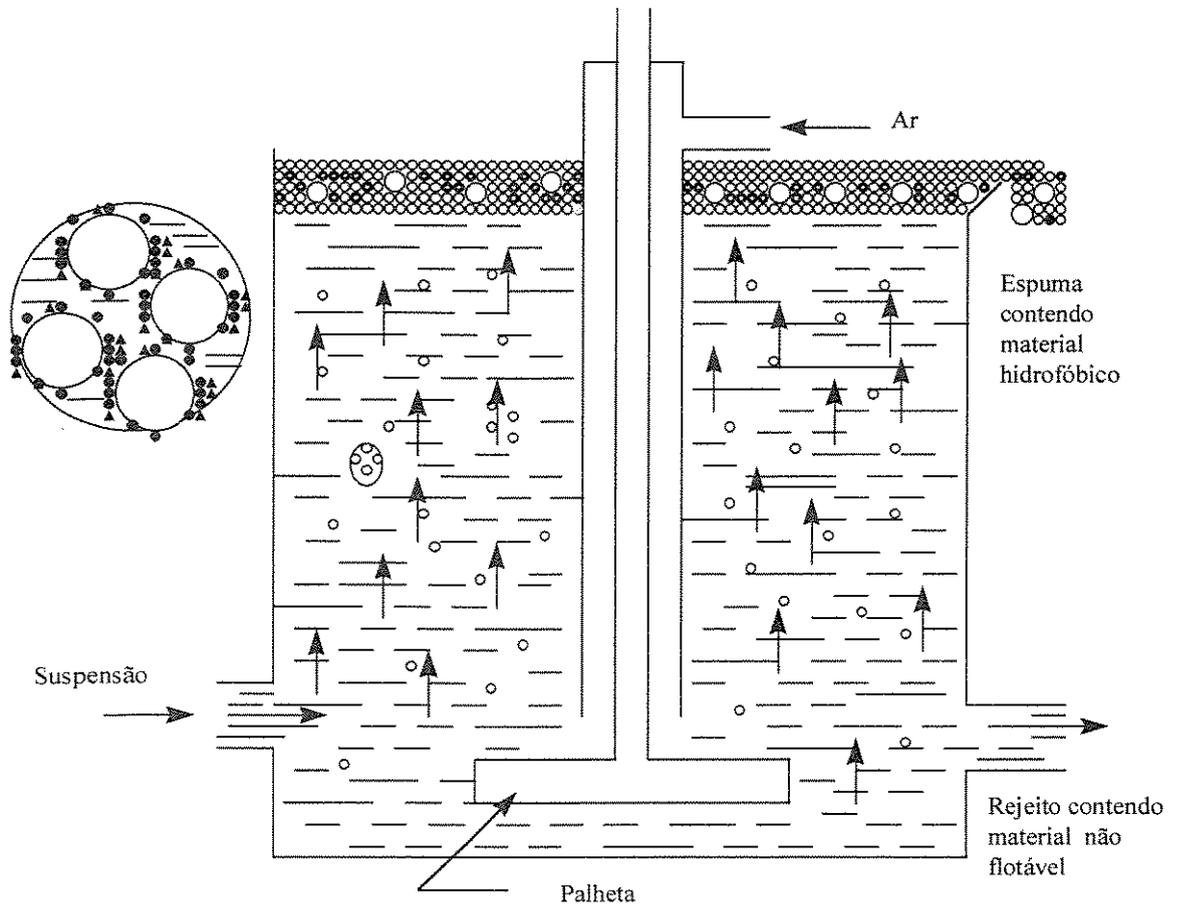


Figura 1.3 - Esquema do diagrama de uma célula de flotação (de Somasundaram e Ananthapadmabhan, 1987).

As partículas dispersas na solução dentro da célula é separada de modo seletivo, isto é possível devido a habilidade das partículas hidrofóbicas em suspensão aquosa ligar-se as bolhas de gás as quais conduzem-nas para o topo da fase líquida devido ao seu poder de flutuação.

Os agregados bolhas-partículas são conduzidos ao topo da célula de onde são removidos. Nessa operação o enriquecimento ocorre quando a junção da partícula-bolha é seletiva com relação a uma determinada classe de partícula. O estudo de flotabilidade de minérios são realizados normalmente através da utilização das células de Hallimond e Fuerstenau (Figura 1.4).

1.5 - Objetivos e relevância do tema

Objetivo Geral:

O objetivo desse trabalho foi estudar a recuperação de proteínas através das operações de precipitação e flotação. Na precipitação utilizou-se os métodos de precipitação por polímeros acoplado ou não a precipitação com sais e seguido de separação sólido-líquido através da flotação.

Os precipitados formados em cada sistema de precipitação foram submetidos a ensaios qualitativos de flotabilidade em uma minicoluna adaptada de uma célula de Hallimond. A célula de Hallimond é composta duas partes, na parte inferior é introduzido o gás o qual é disperso através de uma placa porosa que funciona como dispersor de gás, nessa parte é colocada a suspensão juntamente com um magnético (peixinho) para manter a suspensão homogênea. Na segunda parte do tubo é constituída da zona de recuperação por onde as partículas flotadas são escoam por intermédio de uma saída um pouco abaixo do topo da coluna como mostra a Figura 1.4.

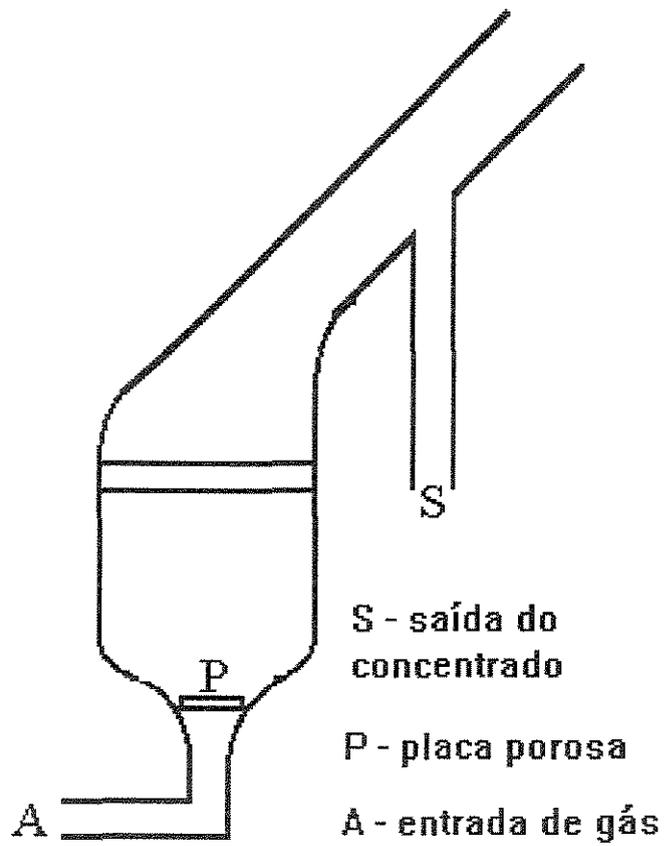


Figura 1.4 - Célula de Hallimond.

O objetivo desses ensaios foi escolher o sistema de precipitado a ser submetido à flotação contínua em coluna. A precipitação do sistema de melhor desempenho nesses ensaios foi otimizada através de planejamento estatístico experimental pelo estudo das seguintes variáveis: pH, tempo e temperatura de envelhecimento, taxa de adição da solução do sal e nível de agitação.

Nas condições ótimas de precipitação para este sistema, estudou-se as variáveis que influenciam a coleta desses precipitados com a utilização de bolhas e espumas em coluna de flotação contínua.

1) Nos estudos de precipitação utilizou-se apenas polímeros e polieletrólitos como agentes precipitantes. Nestas precipitações procurou-se utilizar proteínas e enzimas cuja faixa de ponto isoelétrico permitiram a utilização da variação de pH de modo a viabilizar a precipitação. Nesse caso escolheu-se os seguintes sistemas: ácido poliacrílico com mioglobina, quitosona com albumina de soro bovino e com pepsina.

2) Na precipitação de um complexo enzimático procurou-se utilizar um co-precipitante onde esperava-se que o mesmo apresentar-se afinidade com essas enzimas e que formassem um precipitado pela adição de uma solução com alta concentrações de sal neutro, cujo objetivo foi formar um sólido complexo contendo todo o conjunto de enzimas e que fosse hidrofóbico, para em seguida separá-lo da solução utilizando a coluna de flotação contínua. Nesse caso, escolheu-se uma celulase de *Trichoderma reesei* fornecida pela Biobrás e éteres de celulose e sulfato de amônio.

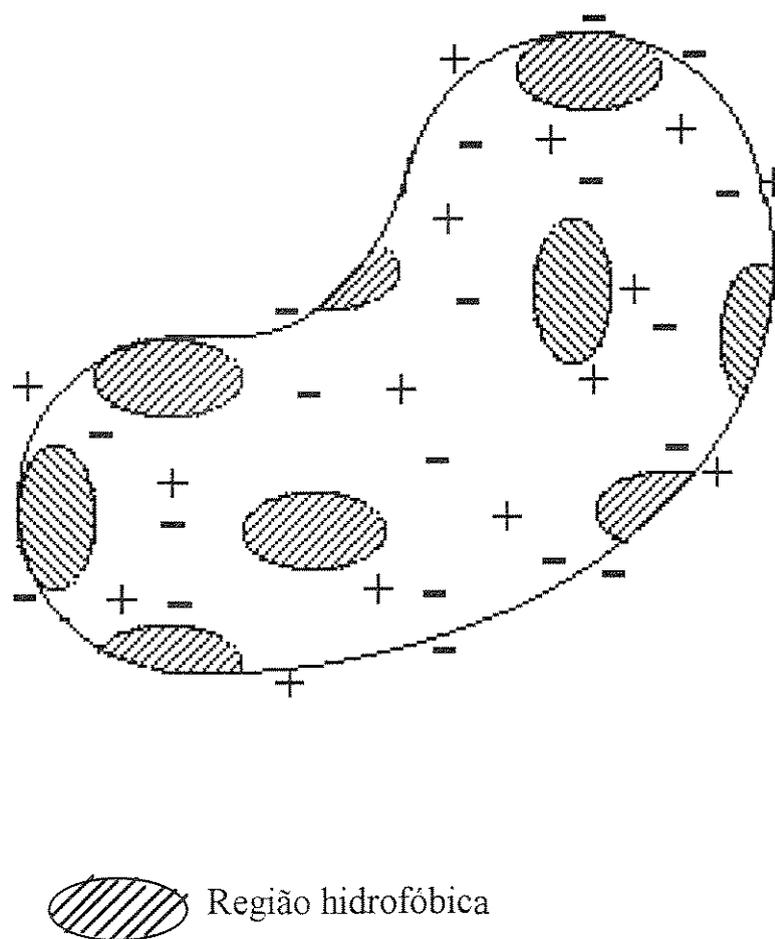


Figura 2.1 - Esquema da distribuição de carga e regiões hidrofóbicas na superfície de uma proteína típica (Scopes, 1987).

A solubilidade da molécula de proteína em vários tipos de solventes é determinada pela distribuição dos resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos na sua superfície (Scopes, 1987)

Diferenças nas propriedades físicas, químicas e funcionais das proteínas fornecem as bases para a concentração e separação das mesmas. As principais propriedades que são exploradas visando a separação são descritas a seguir.

2.1.1 - Tamanho e forma

A massa molecular das proteínas varia numa faixa bastante ampla. A insulina, por exemplo, possui um massa molecular de 5.700 dáltons enquanto a hemocianina tem massa molecular de 6.700.000 dáltons. A massa molecular média da maioria das proteínas está, no entanto, compreendido na faixa de 40.000 a 80.000 dáltons, sendo as proteínas maiores compostas geralmente de sub-unidades. A proteína globular hemoglobina, que consiste de 574 aminoácidos em 4 cadeias com massa molecular total de 64.500 dáltons tem a forma aproximadamente esférica com diâmetro de 64 Angstroms. Como comparação, um aminoácido simples como a alanina tem aproximadamente 5 Angstroms de comprimento.

A forma das proteínas pode variar desde a linear (proteínas fibrosas) a até a formas aproximadamente esféricas (proteínas globulares). Essa propriedade é altamente influenciada pelo aspectos físicos e químicos do ambiente onde se encontra a proteína tal como o pH.

2.1.2 - Carga e hidrofobicidade

Levando-se em conta que todas as proteínas contêm terminais aminos e carboxílicos além de muitas cadeias laterais carregadas, as soluções protéicas possuem comportamentos ácido-base. A carga líquida da proteína depende fortemente do pH do meio. Num pH característico em que o balanço total de cargas positivas e negativas se cancelam a proteína se encontra no ponto isoelétrico (pI). Para valores de pH superiores ao pI a proteína apresenta uma carga líquida negativa, enquanto que para valores inferiores ao pI a proteína possui uma carga líquida positiva (Figura 1.2).

O número, tipo e distribuição dos resíduos não polares de aminoácidos determina o caráter hidrofóbico da proteína. Em soluções aquosas esses grupos hidrofóbicos estão freqüentemente na região interna da proteína já que são repelidos pelas moléculas polares da água. A interação entre as cadeias laterais apolares presente nessa região hidrofóbica é um fator importantes na estabilização da estrutura da proteína e pode contribuir para outras interações pelo fato de prover um ambiente menos polar do que aquele obtido em solução.

Uma proteína globular pode ser caracterizada como um polímero anfótero com um grande número de regiões hidrofóbicas distribuídos não uniformemente sobre a superfície. A densidade de carga na superfície freqüentemente é baixa até mesmo para uma proteína que apresente um máximo de carga dissociada. Por exemplo, uma albumina de ovo cuja massa molecular é aproximadamente 40.000 dáltons não tem mais do que 28 cargas de superfície (Bell et al., 1983)

2.1.3 - Solubilidade e função

Ao contrário dos grupos hidrofóbicos, a maior parte dos resíduos iônicos dos aminoácidos está localizada na superfície da molécula da proteína. A carga superficial contribui para a solubilidade das proteínas globulares tornando-as apropriadas para função que exigem mobilidade e interação com o ambiente fisiológico. Cada proteína tem como característica: solubilidade e ambiente definido; quaisquer mudanças nas condições (tipo de solvente ou tampão, força iônica, temperatura) pode causar uma precipitação diferenciada.

A estrutura iônica assim como a distribuição a presença de aminoácidos específicos em uma de proteína determina a sua função ou atividade bem como a sua bioespecificidade na interação com outras moléculas. A estrutura nativa da proteína deverá estar intacta para que a interação funcional ocorra o que constitui a base dos métodos denominados de afinidade.

2.2 - Recuperação de proteína por precipitação

A precipitação de proteínas tem sido utilizada em várias escalas, atingindo até as aplicações industriais na qual oferece diversas vantagens, como baixo consumo do precipitante (Hill e Zadow, 1974; Sternberg e Hershberger, 1974), alta recuperação de proteína (Fisher e Glatz, 1987), e alto grau de fracionamento (Clark e Glatz, 1990).

Quando se deseja separar uma proteína específica de uma solução contendo várias proteínas pode-se utilizar uma técnica conhecida como precipitação seletiva. A eficiência desse processo é determinada não só pela quantidade de proteína precipitada, mais também pelo fatores de purificação

e de separação. Precipitação seletiva é a técnica de separação mais freqüentemente utilizada nos processos de recuperação e purificação “downstream processing” de proteínas para a realização de purificação parcial ou de concentração de volume (Bonnerjea, 1986). A concentração de produtos reduz os custos porque volumes menores serão utilizados em outras operações ou processos. A escolha do agente precipitante é muito importante. Um precipitante de custo elevado pode ter sua escolha justificada desde que tenha grande seletividade e seja reciclado.

Os precipitantes incluem ácidos e bases (usados na precipitação isoéletrica), sais neutros, solventes orgânicos, polímeros não iônicos, polieletrólitos, íons metálicos multivalentes. Exemplos de técnica de separação com respectivos fatores de purificação são listados na Tabela 2.1. Entre estas técnicas, a cromatografia por afinidade é a que apresenta fator de separação mais elevada, no entanto essa técnica apresenta várias limitações (Mattiasson, 1989): a) resistência à transferência de massa através de limitação difusional e impedimento estérico; b) tratamento de material particulado ou viscoso, devido ao entupimento, o qual resulta em altas quedas de pressão, que por sua vez limita a taxa de fluxo; c) limitação na escala de produção devido a deformação de leito com altas queda de pressão. A técnica de precipitação supera essas limitações e além disso apresenta a vantagem de poder ser realizada em operações contínuas (Chen, 1990).

O enfoque da revisão feita na Tabela 2.1 é mostrar a seletividade dessas técnicas para separar uma proteína específica em uma mistura de proteínas. Quantitativamente a seletividade de um processo de separação pode ser determinada através de três fatores: fator de purificação (γ), fator de separação (α) e uma variante do fator de separação. Qualquer das duas

Tabela 2.1 - Fatores de purificação em diferentes técnicas de separação (Glatz et al., 1992)

Técnica de separação	Fatores de purificação	
	Médio	Máximo
Cromatográfica por afinidade	100	3000
Adsorção inorgânica	12	110
Filtração de gel	6	60
Cromatografia hidrofóbica	20	60
Troca iônica	9	50
Precipitação	3	10
Precipitação seletiva	11	30
Extração de fase aquosa	10	25

definições pode ser utilizada para comparar as seletividades dos vários precipitantes, deste modo elas podem ser calculadas de dados experimentais.

Em uma mistura de proteínas a diferença entre o fator de separação é utilizado para na separação de uma proteína em relação a uma outra proteína específica e o fator de purificação é utilizado com relação a quantidade de proteína total

O fator de purificação (γ) é definido como:

$$\gamma = \frac{\left(\frac{C_p}{C_t}\right)_{prec}}{\left(\frac{C_p}{C_t}\right)_{extr}} \quad \text{Equação 2.1}$$

Onde C_p é a concentração de uma proteína específica, C_t é a concentração total de proteínas. Os sub-índices “prec” e “ext” se referem as frações precipitado e extrato (solução de proteína no sobrenadante).

O fator de separação (α) é definido como:

$$\alpha = \frac{\left(\frac{C_p}{C_o}\right)_{prec}}{\left(\frac{C_p}{C_o}\right)_{extr}} \quad \text{Equação 2.2}$$

Onde C_o é a concentração da outra proteína da qual deseja-se separar a proteína específica.

A terceira definição é uma variante de (α) e difere apenas no denominador, onde extrato é trocado por sobrenadante. Fator de separação ou purificação maior que a unidade indica enriquecimento da proteína específica no precipitado.

A Tabela 2.1 mostra especificamente no caso de precipitação um baixo fator de purificação. Um exemplo de precipitação seletiva, utilizando o carboximetil celulose (CMC) como agente precipitante, é a precipitação de lisozima de uma mistura binária contendo igual quantidade de ovalbumina, que apresentou um fator de purificação igual a 1,84 e um fator de separação igual a 11,2 (Clark e Glatz, 1987). Frequentemente os fatores de separação encontrados na literatura, são dados em termos de atividades específicas para enzimas. Por exemplo, uma mistura de duas enzimas que apresentem atividades específicas diferentes e que cujos métodos de análise sejam independente e não sofram interferência mútuas, então o fator de separação pode ser calculado medindo as duas atividades específicas no precipitado e no extrato.

Os processos de precipitação de proteínas podem ser realizados em grande escala em operações contínuas, esta operação também pode ser utilizada na recuperação de enzimas desde que não haja grandes perdas de atividade.

2.3 - Aspectos físico-químicos de precipitação de proteínas

Os métodos de precipitação de proteínas pode ser dividido em dois grupos. No primeiro grupo, a solubilidade das proteínas é reduzida pela

adição de altas concentrações de reagentes, os quais mudam as interações entre as proteínas e o solvente. Nessa categoria estão incluídos solventes orgânicos tais como etanol, acetona, éter e sais neutros tal como sulfato de amônio. No segundo grupo a solubilidade das proteínas é reduzida pela adição de baixas concentrações de reagentes, os quais interagem diretamente com a proteína. Nesse grupos estão incluídos os ácidos, bases e alguns íons metálicos.

2.3.1 - Estabilidade coloidal de proteínas em suspensão

A estabilidade das partículas coloidais formadas por proteínas em suspensão aquosa é atribuída a hidratação e as cargas eletrostáticas. Esses fenômenos depende principalmente da composição química e da estrutura dos substratos na interface sólido-líquido. A estabilidade de proteínas em suspensão pode ser melhor discutida pela teoria Derjaguin London Verwey Overbeek (DLVO). As Forças de atração e de repulsão entre esferas coloidais liofóbicas de cargas ou potenciais uniformes podem produzir uma barreira energética à agregação. A magnitude dessa barreira energética relativa à energia térmica das colisões é quem determina a existência ou não de agregação de proteínas assim como também a velocidade de formação dessas partículas.

2.4 - Métodos de precipitação de proteínas

2.4.1 - Precipitação isoelétrica

Em soluções de baixa força iônica o ajuste de pH no ponto onde a proteína tem carga líquida zero, ou seja, no seu ponto isoelétrico (pI), implicará numa redução brusca na sua solubilidade, coagulação de proteínas

e formação de agregados, os quais podem ser suficientemente grandes para se separar da solução original. No pI a carga global próximo de zero das moléculas de proteínas minimiza a repulsão eletrostáticas entre elas, por isso, as interações atrativas entre as partes hidrofóbicas das moléculas vizinhas são aumentadas, conduzindo então à agregação e precipitação de proteínas.

A precipitação isoelétrica é mais eficiente no caso proteínas de baixa constante de hidratação ou de superfície com alta hidrofobicidade. Essas proteínas tem sido largamente usadas, e como exemplo, podemos citar caseína, uma proteína com essas característica. Ela precipita no seu ponto isoelétrico formando agregados grandes e resistentes, no entanto, a gelatina, uma proteína com uma hidrofobicidade elevada, não precipita em seu ponto isoelétrico em baixa força iônica, devido a gelatina apresentar uma forte afinidade pela a água (Shaw, 1975).

Normalmente a maior vantagem de precipitação isoelétrica efetuada em pH ácido está no baixo custo de ácidos minerais e no fato que vários desses ácidos, tais como clorídrico, fosfórico e sulfúrico serem aceitáveis em proteína de produtos alimentares. A principal desvantagem do uso de ácido é o seu potencial como agente desnaturante de proteína.

2.4.2 - Precipitação com polímeros não iônicos

Polímeros não iônicos também tem sido utilizado na precipitação de proteínas. Entre os polímeros mais usados estão os dextrona e os glicóis de polietileno. A precipitação com esses polímeros ainda não pode ser explicado detalhadamente, no entanto, os trabalhos de Laurent (1967) e Ogston (1970) sugeriram que os polímeros excluem as proteínas de uma parte da solução e reduz a quantidade efetiva de água disponível para a sua

solvatação. Isso faz com que aumente a concentração da proteína no restante da solução até que ocorra a precipitação da proteína. A vantagem dos polímeros não iônicos é que os mesmos estabilizam as proteínas e podem ser usados à temperatura ambiente (Bell et al.,1983). O polímero não iônico polietileno glicol (PEG) precipita proteínas em solução aquosa sem desnaturá-las.

2.4.3 - Precipitação com polieletrólito

Polieletrólitos são polímeros solúveis em água contendo grupos ionizáveis como unidades repetidas. O ácido poliacrílico (PAA) e a carboximetil celulose (CMC) são exemplos de poliânions enquanto que o quitosana (CHI) é um polication. Devido as estruturas das suas unidades básicas, esses polímeros podem se ligar às moléculas de proteínas carregadas com cargas opostas e formar complexos não estabilizados por repulsão de cargas, resultando na precipitação.

O mecanismo e a cinética de floculação com polímeros têm sido largamente estudados e bem documentados na literatura. Gregory (1987, 1988) descreveu o processo global de floculação em cinco etapas: (a) misturas das moléculas do polímeros com as proteínas formando partículas, (b) adsorção das cadeias de polímeros nas partículas, (c) rearranjo das cadeias adsorvidas, (d) colisão entre as partículas que possuem os polímeros adsorvidos para formar agregados e (e) quebras dos flóculos formados.

No caso de proteínas com o mesmo pI similares foi observado inicialmente que essas proteínas e os polieletrólitos se combinam por difusão para formar um complexo (partículas primárias) em escala sub-micron (Chen, 1992; Fisher e Glatz, 1987). Em seguida as colisões entre os

complexos conduz à formação e crescimento de agregados os quais precipitam. A formação dos complexos é, em geral, muito rápida (Glatz e Fischer, 1986) e possui como força motriz a atração eletrostática entre as moléculas de proteínas e de polieletrólitos, bem como as ligações de hidrogênio e do tipo hidrofóbica (Gekko e Noguchi, 1978). Por outro lado a formação dos flocos é relativamente lenta e pode ocorrer segundo três possíveis mecanismos:

- (1) Neutralização da carga das partículas primárias com um polieletrólito de carga oposta (Gregory, 1969)
- (2) Formação de regiões carregadas na superfície das partículas (Kasper, 1971)
- (3) Pontes de polímeros entre as partículas com diversos pontos de ligação (Ruehrwein e Ward, 1952).

A neutralização das cargas e a formação das regiões carregadas resultam em flocos mais fracos que aqueles formados por pontes de polímeros, mas que se reagrupam mais facilmente quando quebrados através de tensões mais elevadas. Os flocos formados por pontes de polímeros são irreversíveis quando quebrados (Gregory, 1987). Exemplos de neutralização de cargas são: a floculação da celulose micro-cristalina através de polímeros catiônicos (Sander e Luner, 1974) e a precipitação de lisozima com PAA de baixa massa molecular (2 kDa) (Chen, 1992). Por sua vez, a precipitação de lisozima usando PAA de alta massa molecular (1.360 kDa) ocorre com o mecanismo de formação de pontes de polímeros.

A eficiência da precipitação com polieletrólitos pode ser otimizada através de diversos fatores como pH, força iônica, dosagem de polímeros e massa molecular do polímero. Mudanças no pH afetam a distribuição de cargas na proteína e no polieletrólito, o que acusa uma faixa relativamente

estreita de pH para a recuperação máxima de proteínas. O esquema apresentado na Figura 1.2 mostra o efeito do pH na variação de carga do polieletrólito e da proteína identificando a faixa teórica de pH na qual é possível ocorrer a precipitação. Essa faixa de pH varia com a natureza da proteína e do polieletrólito utilizado (Clark e Glatz, 1990; Gonzales et al., 1991; Hill e Zadow, 1974; Sternberg e Hershberger, 1974).

Na precipitação com polieletrólito, o aumento da força iônica de uma solução de proteína conduz a uma redução na recuperação de proteína e nesse caso torna-se necessário um aumento na quantidade de polímero para que se obter uma precipitação ótima (Hill e Zadow, 1974; Sternberg e Hershberger, 1974). Esse fato pode ser explicado através das interações eletrostáticas entre as moléculas de proteínas e do polieletrólito na formação do complexo. A recuperação de proteína cresce com a dosagem do polímero até um valor ótimo quando então decresce com a adição de polieletrólito (Clark e Glatz, 1987; Clark e Glatz, 1990; Gonzales et al., 1991; Sternberg e Hershberger, 1974). A altas concentrações de polímeros, o excesso do mesmo no complexo formado, faz com que o mesmo se torne mais solúvel e que o saldo de carga que promove a desagregação entre os flocos e reduzindo assim a precipitação de proteínas. Clark e Glatz (1992) propuseram um modelo de acoplamento para a precipitação de proteínas com carboximetil celulose (CMC), levando em conta os efeitos da dosagem de polímeros, do pH da solução e da força iônica.

O efeito da massa molecular do polímero na recuperação de proteínas com polieletrólitos tem sido estudado, no entanto tem sido observado que o aumento da massa molecular em alguns casos diminui e em outros aumenta a recuperação de proteínas. Shieh e Glatz (1991) observaram que a densidade de cargas do PAA e a remoção de proteínas

independe da massa molecular do polímero molecular desse polímero para a precipitação de lisozima. Todavia quando se trata de clara de ovos, os mesmos autores verificaram que as massas mais elevadas do polímeros são mais eficientes na remoção de proteínas por precipitação. Sternberg e Hershberger (1974) reportaram que a recuperação da proteína é mais elevada com PAA de pesos moleculares mais elevados. Chen e Berg (1993) mostraram que PAA de diversas massas moleculares são igualmente efetivos em termos de recuperação de proteínas a baixa dosagem, verificando, porém, que em dosagem mais elevadas a influência da dosagem é menos significativas na recuperação de proteínas utilizando PAA de massas moleculares menores.

É importante enfatizar que a modelagem do fenômeno da precipitação é ainda restrita a alguns sistemas específicos, o que acarreta a necessidade da experimentos para a determinação das condições ótimas de precipitação.

2.4.4 - Precipitação de proteínas com sais neutros

As proteínas são eletrólitos de altas massas moleculares geralmente com múltiplos grupos ácidos-bases, das quais dependem suas propriedades de solubilidade. A solubilidade das proteínas depende também dos seguintes fatores: concentrações dos sais neutros dissolvidos, da polaridade do solvente, pH e temperatura. A interação íon-proteína foi estudada extensivamente por Ararawa e Timasheff (1982, 1984). Esses autores mostraram que existem uma forte correlação entre as interações preferenciais das proteínas com sal e os efeitos dos sais sobre a solubilidade e a estabilidade conformacional das proteínas. As interações proteína-sal podem ser considerada como sendo uma combinação da exclusão

preferencial não específica de sais causado pelo efeito da tensão superficial exposto pela teoria hidrofílica de Melander - Horvath e da ligação específica do sal com uma proteína.

Os sais neutros tem um pronunciado efeito sobre a solubilidade das proteínas globulares em água.. Os sais de íons bivalentes tais como sulfato de amônio e cloreto de magnésio são solutos muito mais efetivos que íons monovalentes tais como cloreto de sódio, cloreto de amônio e cloreto de potássio. A habilidade dos sais neutros de influenciar a solubilidade das proteínas depende de sua força iônica e o número de cargas elétricas nos ânions e cátions do sal. A força iônica (I) é representada pela Equação 2.3.

$$I = (\sum c_i z_i^2)/2 \quad \text{Equação 2.3}$$

Onde c_i é a concentração de íons e z_i a sua valência.

A mudança na concentração de sal de uma solução pode causar a precipitação de proteínas. A baixa força iônica "salting-in" a solubilidade da proteína aumenta com o aumento da concentração de sal, ou seja, diminui a interação iônica entre as proteínas. A alta força iônica "salting-out" a solubilidade diminui com o aumento da concentração do sal.

A baixa força iônica, os íons de cargas opostas adicionais cobrem com maior efetividade as múltiplas cargas iônicas das moléculas proteicas, deixando-as mais solúveis (Voet e Voet, 1990). Quando a concentração de sal diminui, a interação iônica entre as proteínas cresce (poucos íons de carga contrária para proteger as múltiplas cargas iônicas da proteína), as forças eletrostática repulsivas são insuficientes para manter as moléculas separadas, conduzindo à formação de complexos, os quais poderão se

agregarem para formarem grandes flocos sobre a influência de forças de van der Waals.

A altas concentrações de sais (salting-out), a solubilidade das proteínas diminui com o aumento da concentração de sais, porque os mesmos removem água de solvatação das proteínas, reduzindo assim a sua solubilidade. As proteínas desprovidas de moléculas de água interagem entre si formando grandes aglomerados insolúveis. As proteínas precipitadas em altas concentrações de sais retêm a sua formação nativa e podem ser redissolvidas sem que ocorram desnaturação das mesmas.

O sulfato de amônio é o sal preferido para a precipitação “salting-out” de proteínas porque permite alcançar forças iônicas muito altas em função da sua alta solubilidade em água. Uma solução saturada de sulfato de amônio em água a 25°C tem uma concentração igual a 4,05 M e sua densidade relativa é igual a 1,235. A sua solubilidade varia muito pouco na faixa de 0 a 30^o C. O sal pode ser adicionado a solução na forma sólida sobre agitação controlada ou como solução saturada, contanto que a sua diluição não envolva mais que duas vezes a concentração inicial. Em uma solução que contém uma mistura de proteínas, pode se ajustar a concentração de sal abaixo do ponto de precipitação da proteína a ser purificada; deste modo muitas proteínas indesejáveis podem ser eliminadas da solução. Em seguida, esses precipitados podem ser removidos por filtração ou centrifugação, ao sobrenadante adiciona-se mais sal de modo que a solução atinja uma concentração que precipite a proteína desejada. Desse modo a precipitação “salting-out” pode ser justificada para purificar e precipitar grandes quantidades de proteínas. Essa é uma das técnicas mais usadas em purificação de proteínas (Scopes, 1987). Esse processo depende fortemente da hidrofobicidade da proteína, enquanto que “salting-in” é uma

técnica menos explorada, e depende mais da distribuição de cargas na superfície e interação polar com o solvente.

2.4.5 - Precipitação com solventes orgânicos

O método de precipitação com solventes orgânicos miscíveis em água tem sido empregado desde os primeiros dias de purificação de proteínas. Esse método tem sido especialmente importante em escala industrial, em particular no uso de fracionamento de proteínas do sangue (Curling, 1980). Os princípios desse tipo precipitação são diferentes de precipitação com altas concentrações de sais "salting-out", no entanto, o sulfato de amônio pode ser utilizado como uma etapa adicional.

A adição de solventes tais como etanol ou acetona em um extrato aquoso contendo proteína tem uma variedade de efeitos, que combinados, conduzem a formação de um precipitado. O efeito principal é a redução na atividade da água.

Em termos de constante dielétrica, o poder de solvatação da água pura no caso de uma molécula de enzima hidrofílica diminui com o aumento da concentração do solvente. Isto pode ser descrito como a redução da constante dielétrica ou simplesmente em termos do volume de água deslocado mais a imobilização parcial das moléculas de água através da hidratação do solvente orgânico.

A disposição da estrutura das moléculas de água em torno da área hidrofóbica podem ser solúveis em solventes puros, no entanto a presença dessas proteínas diminuem as solubilidades de outras que são solúveis em água no ponto de agregação e precipitação.

As causas principais de agregação são as forças eletrostáticas e van der Waals, semelhantes àquelas que ocorrem na ausência de solvente

orgânico. As interações hidrofóbicas são menos envolvidas por causa da influência solubilizante dos solventes orgânicos nessa área.

Semelhantemente à precipitação isoelétrica, no ponto isoelétrico da proteína é requerida uma menor quantidade de solvente orgânico para que ocorra a agregação. A Figura 2.2 mostra uma representação bidimensional de proteínas em uma mistura de água e solvente orgânico. A formação de agregados se dá pela interação entre as áreas de cargas opostas das superfícies das proteínas.

Um outro fator que afeta a precipitação com solvente orgânico é o tamanho das moléculas. Scopes (1987) estudou a influência da concentração do solvente orgânico e do tamanho das moléculas de proteínas na precipitação das mesmas, e verificou que as moléculas de menor tamanho requeriam uma maior quantidade de solvente.

Os requisitos necessários para um solvente ser utilizado neste tipo de precipitação são que eles devem ser completamente miscíveis em água, não reagir com as proteínas. Os dois solventes mais utilizados nesse método são: etanol e acetona. Algumas proteínas reagem com acetona formando ϵ -N isopropilisina (Farfán, 1994). Outros solventes tais como, metanol, n-propanol, i-propanol, dioxana, 2-metoxi-etanol e vários outros éteres e cetonas e álcoois são também utilizados. No entanto, deve-se tomar cuidado tanto com a sua inflamabilidade como em termos de vapores tóxicos. Por essa razão, é que dioxana, 2-metoxi-etanol e outros éteres devem ser eliminados dessa lista de reagentes.

2.4.6 - Precipitação por temperatura

A mudança de temperatura pode afetar a precipitação de dois modos: o primeiro dele é que a maioria das proteínas e muitos sais exibem um

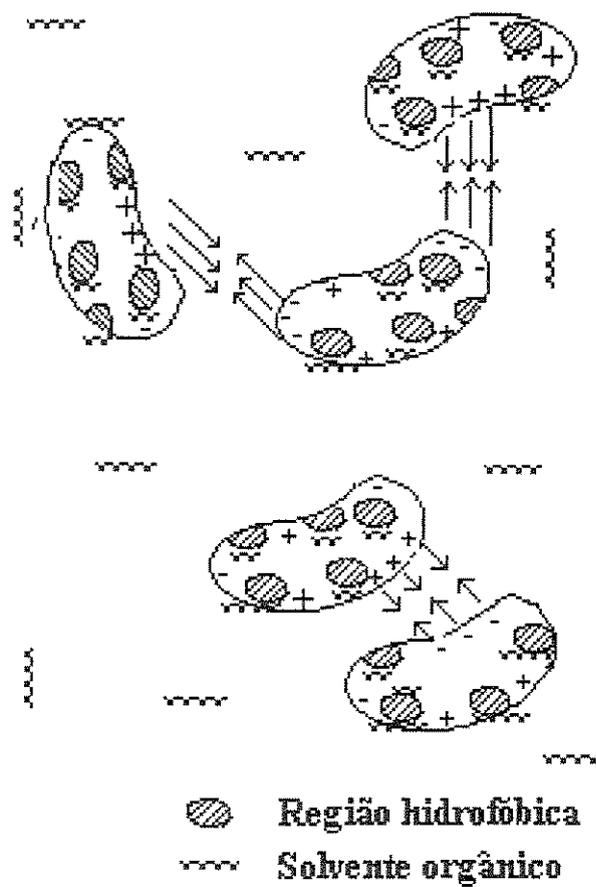


Figura 2.2 - Representação do esquema da agregação de proteínas em uma mistura solvente orgânico e água (Scopes, 1987).

decréscimo em suas solubilidade com a diminuição de temperatura, e no segundo é que a altas temperaturas as proteínas se desnaturam, perdendo assim as suas estruturas secundárias e terciárias e expõem os seus grupos hidrofóbicos, os quais se ligam a outras moléculas e formam agregados insolúveis (Wheelwright, 1991).

2.4.7 - Precipitação por afinidade

Os métodos de afinidade em purificação de proteínas podem ser definidos como sendo aqueles que fazem uso das interações específicas e seletivas de proteínas com um ligante. No caso das enzimas, normalmente usa-se um substrato ou um inibidor, o qual pode ser imobilizado a uma matriz insolúvel ou ficar livre em solução. Entre os métodos de afinidade estão incluídos: cromatografia, eletroforese e partição de fases. Nessa categoria, também se encontra o método de precipitação.

Precipitação por afinidade é uma técnica baseada na interação entre uma dada proteína e um ligante o qual se liga a proteína de uma maneira específica. Em alguns casos, a simples adição de um ligante a uma solução de proteína pode causar precipitação, especialmente se o ligante for uma molécula grande, tal como, um ácido nucléico. Em geral essa ligação formada entre o ligante e a enzima não produz alteração suficiente na solubilidade das enzimas para essa etapa de purificação seja bem sucedida. A precipitação por afinidade normalmente ocorre através de dois mecanismos (Chen, 1990): O primeiro envolve a ligação cruzada de moléculas multivalentes de proteínas com um bi ou poliligante (Larsson e Mosback, 1979).

No segundo mecanismo, os complexos são formados entre uma dada molécula de proteína e um ligante os quais são ligados a um polímero solúvel em água, e os complexos são precipitados tanto pela redução da solubilidade do polímero através da mudança no pH (Morris et al., 1993; Mattiasson, 1989), ou pela ligação cruzada do polímero com a ligação polímero-proteína (Mattiasson, 1989). O primeiro mecanismo recebe o nome de precipitação por afinidade com ligante homo-bifuncional e o segundo como precipitação de efeito primário. Guzman et al. (1990) descreveram uma terceira técnica de precipitação por afinidade na qual os autores utilizaram um ligante-fosfolipídio modificado, o qual foi solubilizado em solução aquosa por tensoativos não iônico conectado com moléculas de proteínas contendo múltiplos sítios de ligação. Powers (1992) estudou os fatores que influenciam a precipitação de proteína utilizando ligante-fosfolipídio modificado.

Capítulo 3

Separação de Proteínas por Bolha e Espuma

3.1 - Considerações gerais

Técnicas de separação de moléculas em soluções aquosas por adsorção, são baseadas nas diferenças de atividade de superfície de várias substâncias presente em uma solução ou suspensão. Essas substância pode ser iônica, molecular, coloidal, cristalina ou celular “in nature”, todavia em todos os casos elas devem ter uma superfície ativa na interface ar-líquido, ou seja, essas espécies devem adsorver seletivamente a interface ar-líquido das espumas ou bolhas que sobem através do líquido. Isto permite a separação e concentração das espécies de superfície ativa em um pequeno volume de espuma coletado na parte superior do equipamento. No entanto é bastante comum uma substância que não apresente uma superfície ativa na interface ar-líquido, poder ser adsorvida através de um coletor que apresente atividade de superfície tanto em relação a essa substância como a interface ar-líquido ou ainda através da reação entre o coletor - substância (se esta for um íon), o qual converte o produto dessa reação em um complexo com atividade de superfície.

A técnica de separação por adsorção em bolha estende-se a uma grande faixa de substância incluindo íons, moléculas neutras, carbono ativo,

minerais, proteínas e bactérias. A base fundamental de todo o processo de separação adsorptiva de bolha é a equação de Gibbs (Adamson, 1990). A equação a seguir representa a equação de Gibbs quando apenas um soluto está presente:

$$\Gamma = -\frac{a}{RT} \frac{d\gamma}{da} \quad \text{Equação 3.1}$$

Onde: Γ é o excesso de superfície do soluto, “a” é a atividade do soluto e γ é a tensão de superfície (a energia livre por unidade de área da interface).

O equilíbrio entre as fases sólida, líquida e gasosa é dado pela equação de Young

$$\gamma_{SA} - \gamma_{SB} = \gamma_{AB} \cos \theta \quad \text{Equação 3.2}$$

Onde γ_{SA} é a energia livre da interface sólido-gás, γ_{SB} é a energia livre da interface sólido-líquido, γ_{AB} é a energia livre da interface gás-sólido e o θ é o ângulo de contato entre as interfaces sólido-líquido e gás-líquido.

3.2 - Classificação geral dos processos de adsorção em bolhas

As técnicas de separação por adsorção em bolha tem sido classificada de acordo com o emprego ou não de espuma, se o soluto removido está ou não na forma sólida e quais as características do soluto no caso do mesmo ser sólido (Lemlich, 1972). Essa classificação (Figura 3.1) e nomenclatura proposta à alguns anos, representa uma combinação razoável

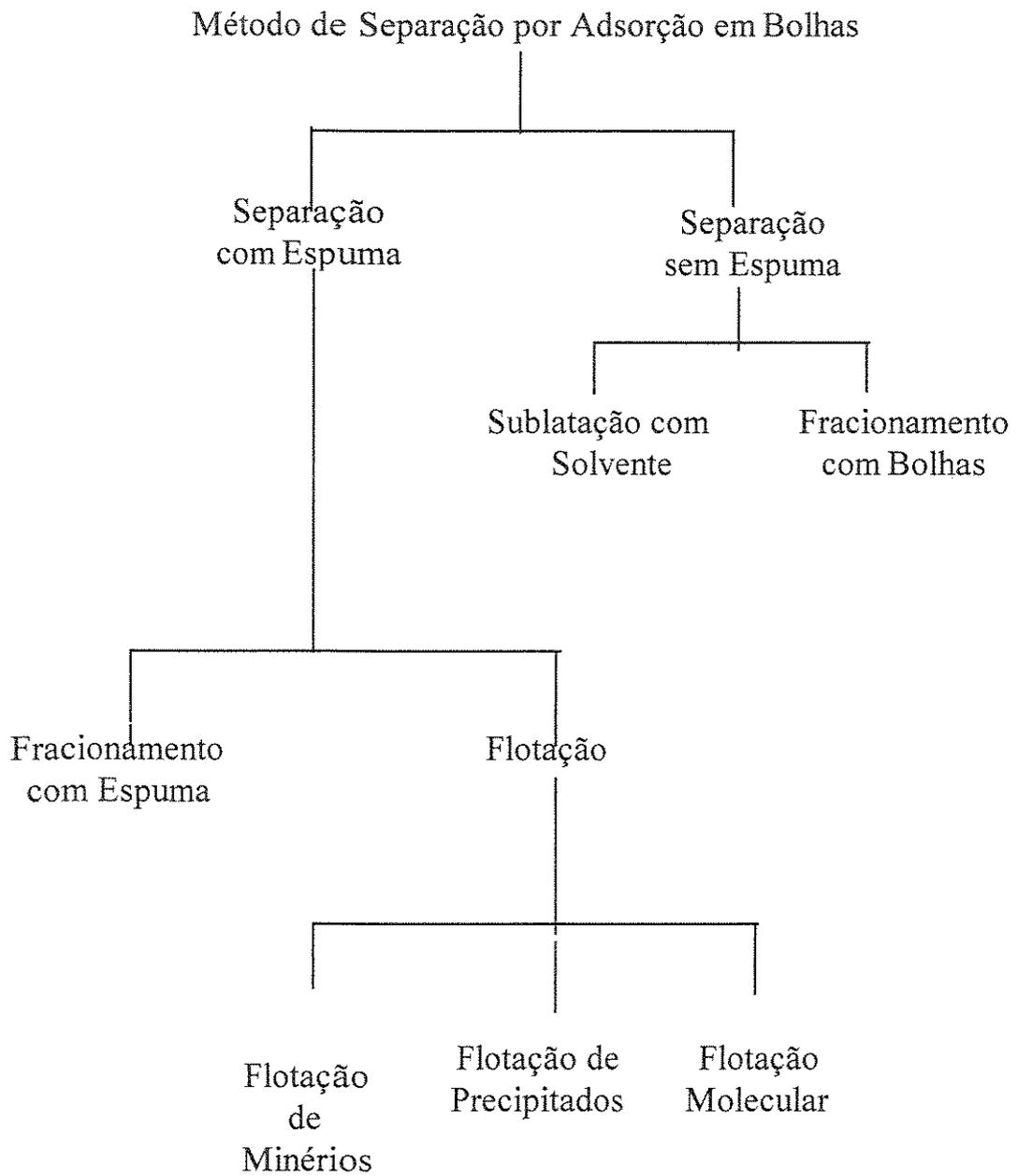


Figura 3.1 - Fluxograma da classificação dos processos de separação por adsorção em bolhas (Lemlich, 1972).

entre a terminologia comum e a sistemática lógica envolvida e empregada pela maioria dos pesquisadores dessa área.

Os processos de separação com bolhas são classificados de acordo com a formação ou não de espumas. A separação com adsorção em bolhas sem a formação de espumas está subdividida em: fracionamento com bolhas e sublatação de solvente. No fracionamento com bolhas, o material de atividade em superfície é conduzido até o topo da coluna de líquido adsorvido nas bolhas de ar que é injetada na parte inferior da coluna. Esse material é então separado das bolhas no topo da coluna através da quebra das bolhas (Lemlich,1972). A sublatação de solvente opera de modo muito semelhante ao fracionamento com bolhas, exceto nos casos onde os solutos com atividades de superfície são transferido para a camada de líquido imiscíveis que se encontra flutuando no topo do líquido do qual soluto está sendo extraído.

As separações com espumas estão divididos em fracionamento com espumas, dispersão em microbolhas e flotação.

No fracionamento com espuma as substâncias de atividade na superfície são removidas da solução por adsorção na interface gás-líquido. No segundo caso, essas separações são caracterizadas pelos tamanhos extremamente pequeno das bolhas. A flotação é caracterizada pelo tamanho das partículas que são separadas do líquido, a flotação está subdividida em vários grupos; desses destacaremos apenas flotação de minérios que se refere a separação de minerais na polpa do minério, a flotação molecular onde as moléculas presentes na solução não apresentam atividades de superfície e nesse caso é utilizado um coletor (substância anfifílica) para que o precipitado possa ser removido da espuma e flotação precipitativa onde

uma substância presente em uma solução é precipitada através de um agente precipitante e flotada sem a utilização de um coletor..

A flotação está subdividida em vários grupos; desses destacaremos apenas flotação de minérios que se refere a separação de minerais na polpa do minério ,flotação molecular onde as moléculas sem atividade de superfície se liga com um coletor para formar um precipitado com atividade de superfície, o qual é removido pela espuma e flotação precipitativa onde uma substância presente em uma solução é precipitada e flotada.

3.3- Termodinâmica da flotação

Em processo de flotação de minério, as partículas minerais colidem com as bolhas. Se houver uma união entre elas, de modo que essas partículas sejam conduzidas pelas bolhas até a camada de espuma, então esses sólidos podem serem classificados como flotáveis. A Figura 3.2 mostra a partícula sólida e a bolha antes e após essa união. A condição básica para que essa união seja possível (sobre uma unidade de área básica; temperatura, pressão e a composição química dada pelo número de moles, todas constantes) é que a variação de energia livre (ΔG) durante o processo de união (como mostra a Figura 3.2) seja negativo.

$$\Delta G = G_2 - G_1 = G_2^s - G_1^s = \gamma_{SV} - \gamma_{SL} - \gamma_{LV} < 0 \quad \text{Equação 3.3}$$

Onde: G_1 e G_2 são energia livre de Gibbs do sistema antes da união (estado 1) e após união (estado 2) respectivamente. G_1^s e G_2^s corresponde a energia livre de superfície, as quais podem serem igualadas a G_1 e G_2 respectivamente, onde apenas a porção da energia livre de superfície muda

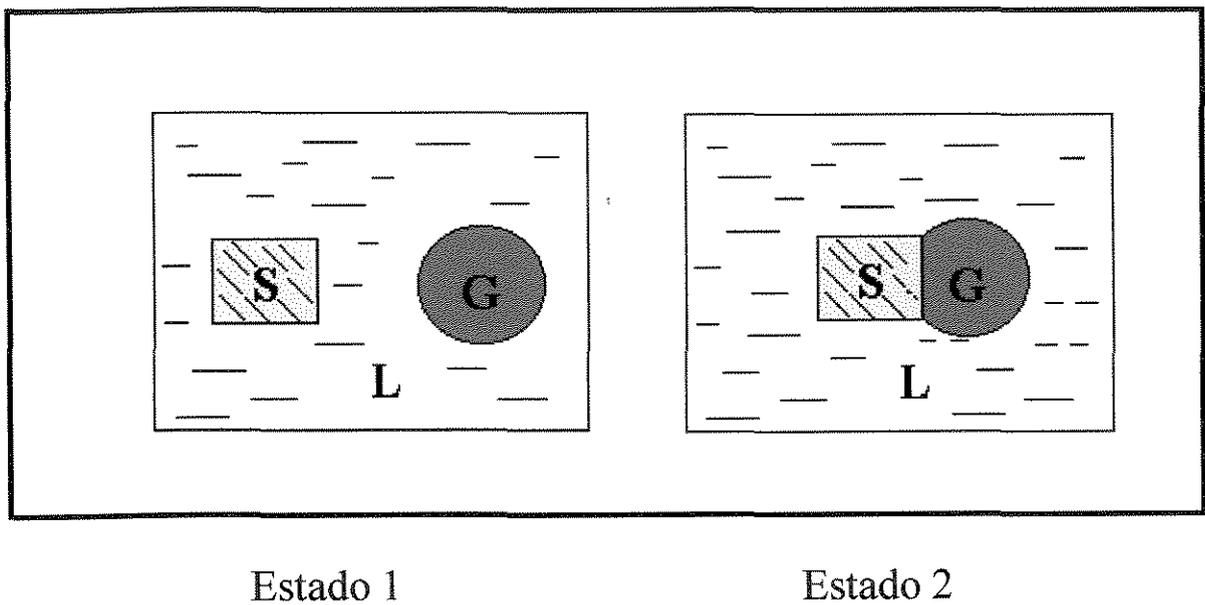


Figura 3.2 - Esquema da união de uma partícula à uma bolha de ar nos processos de flotação.

durante esse processo; γ_{SV} , γ_{SL} e γ_{LV} são tensões de interface sólido/vapor, sólido/líquido e líquido/vapor, respectivamente.

Pela introdução da equação de Yong, a Equação 3.3 pode ser convertida a uma fórmula mais útil:

$$\Delta G = \gamma_{LV} (\cos\theta - 1) \quad \text{Equação 3.4}$$

Onde θ denota o ângulo de contato, obviamente ΔG é igual a zero para θ igual a zero e menor que zero para θ maior que zero.

A Equação 3.4 é conhecida como sendo a equação que determina o critério termodinâmico da flotação. A sua interpretação rigorosa é dada como a seguir: Quanto maior o valor negativo de ΔG maior é a probabilidade das partículas se aderirem.

3.4 - Cinética de flotação.

O valor Schumann (15) mostrou que a taxa de flotação tem a mesma dimensão do significado da taxa específica para a reação química de primeira ordem. Então a cinética de flotação pode ser descrita pela Equação 3.5.

$$\frac{dN_p}{dt} = -K' N_p^n N_a^n n_a \quad \text{Equação 3.5}$$

Onde N_p representa o número de partícula por unidade de volume, e N_a é o número de bolha por unidade de volume.

Se no experimento a vazão do ar fornecido, diâmetro e o número de bolhas forem mantidos constantes, então a taxa da Equação 3.5 assume a forma:

$$\frac{dN_p}{dt} = -K N_p^n \quad \text{Equação 3.6}$$

Onde a constante K é a taxa de flotação, o qual passa a ser uma função complexa que também envolve o tamanho das bolhas e partículas, número de colisão e probabilidade de junção das bolhas e partículas, concentração dos reagentes, projeto das células, etc. No entanto essa equação não envolve a concentração dos constituintes de interesse.

A etapa mais essencial em uma flotação elementar é a colisão das partículas e as bolhas. Durante essa colisão a espessura do filme que separa as partículas das bolhas deve diminuir, quebrar e se reorganizar em um pequeno intervalo de tempo. Os agregados formados pelas partículas e as bolhas devem ser bastante forte para resistir as forças de cisalhamento na célula de flotação.

Assumindo-se que todas partículas na polpa colidem com as bolhas dentro de uma região πr_b^2 são removidas, então o número de colisões por unidade de tempo é dado pela Equação 3.7

$$\frac{dN_p}{dt} = \pi r_b^2 N_b \frac{N_p}{V_c} \quad \text{Equação 3.7}$$

Onde r_b é o raio da bolha, N_p/V_c o número de partículas na célula (V_c é o volume da célula e N_b é o número de bolhas por unidade de tempo).

Se a vazão do gás que entra na célula é Q, então o número de bolhas é dado por:

$$N_b = \frac{3Q}{4\pi r_b^3} \quad \text{Equação 3.8}$$

Combinando as Equações 3.7 e 3.8, obtém-se a Equação 3.9:

$$\frac{dN_p}{dt} = \frac{3Q}{4V_c r_b^3} N_p \quad \text{Equação 3.9}$$

Realmente, nem todas as partículas dentro da região descrita por πr_b^2 colidem com a bolha, e nem toda colisão ocorrida acarreta em uma união (colecção) bolha-partícula. Isso pode ser calculado pela introdução da probabilidade de colecção, P

$$P = P_c \cdot P_a \quad \text{Equação 3.10}$$

Onde P_c é a probabilidade de colisão, P_a é a probabilidade de junção.

Sutherland (1948), mostrou como a hidrodinâmica do fluxo de líquido que ocorre na vizinhança da bolha afeta o número de colisões. Em sua aproximação, somente as partículas inseridas na região de raio limite R (não o raio da bolha r_b) eventualmente colidem com as bolhas. De acordo com Sutherland, a relação entre R e r_b é dado pela Equação 3.11:

$$P_c = \frac{\pi R^2}{\pi r_b^2} = \frac{3r_p}{r_b} \quad \text{Equação 3.11}$$

Onde a região πR^2 é igual a $3\pi r_b r_p$ e r_p é o raio da partícula. Essa equação (Schulze, 1984) é mais segura para determinação do potencial nas condições (Grande número de Reynolds de bolhas).

Pela condição de Stokes (para valores baixos de Reynolds)

$$P_c = \frac{\pi R^2}{\pi r_b^2} = \frac{3}{2} \left(\frac{r_p}{r_b} \right)^2 \quad \text{Equação 3.12}$$

Onde $P_c / \pi R^2$ é igual a $3/2\pi r_p^2$.

Yong e Luttrell (1989) mostraram que para número de Reynolds intermediários a variação de P_c é diretamente proporcional a r_p^2 e inversamente proporcional a r_b^2 sob as condições de fluxo de Stokes. Nessas condições essa variação depende também do número de Reynolds das bolhas. Combinando as Equações 3. 9 e 3. 10, obtém-se:

$$\frac{dN_p}{dt} = \frac{3P_c}{4V_c} \frac{P_a}{r_b} \frac{Q}{r_b} N_p \quad \text{Equação 3.13}$$

Sob as condições do potencial do fluxo, as Equações. 3.11 e. 3.13 são conduzidas a Equação 3.14.

$$\frac{dN_p}{dt} = \frac{9r_p}{4V_c} \frac{Q}{r_b^2} \frac{P_a}{r_b} N_p \quad \text{Equação 3.14}$$

rearranjando as Equações. 3.12 e. 3.13 nas condições do regime de Stokes obtém-se a Equação 3.15.

$$\frac{dN_p}{dT} = \frac{9r_p^2}{8V_c} \frac{Q}{r_b^3} \frac{P_a}{r_b} N_p \quad \text{Equação 3.15}$$

Como visto a hidrodinâmica afeta taxa de flotação via probabilidade de colisão.

3.5. Fracionamento por bolhas e espumas

3.5.1. Fracionamento por bolhas

O fracionamento de compostos com atividades de superfície por bolhas foi desenvolvido por Dorman e Lemlich (1965) com a finalidade de separar tais compostos de uma solução através da adsorção desses à bolhas de ar, sem no entanto ocorrer a formação de espumas.

No caso de operação em batelada coloca-se uma solução diluída contendo os compostos de atividade de superfície na coluna, em seguida injeta-se o ar pelo dispersor situado em sua base. Esses compostos são adsorvidos nas bolhas e conduzido até o topo da coluna de onde são removidos, outros no entanto retornam à solução devido a quebra das bolhas. Um gradiente de concentração do soluto (compostos com atividade de superfície) ao longo da altura da coluna é formado como resultado desse fenômeno. A concentração desse soluto é maior na superfície da solução do que na base da coluna (DeSouza, 1990). A separação desses compostos em uma mistura é função das suas atividades específicas, uma mistura de

solutos com diferentes atividades específicas podem ser separadas através do fracionamento com bolhas (DeSouza, 1991).

No caso de operações contínuas a solução de alimentação é introduzida na coluna à uma altura intermediária, o concentrado é colhido no topo da coluna enquanto que o rejeito é descartado pela parte inferior da coluna.

3.5.2. Fracionamento com espuma

O fracionamento com espuma é semelhante ao fracionamento com bolha, só que nesse caso há a formação de uma camada de espumas devido ao movimento das bolhas que por sua vez conduzem por adsorção os flocos com atividades de superfície até a camada de espuma. As espumas resultantes das bolhas que permanecem intactas, tendem reter o soluto adsorvido, desde que as espumas possam ser removidas do sistema e serem quebradas com um quebrador dentro de um frasco coletor do concentrado. O sistema de fracionamento de proteínas pode se tornar viável, desde que o gás disperso na solução aquosa gere espuma, sem a necessidade de tensoativos. O fracionamento de compostos com atividades de superfície pode apresentar viabilidade na concentração, separação e recuperação de tais compostos a partir de soluções diluídas.

Montero (1992) usou o processo de fracionamento de proteínas com espumas para concentrar soluções diluídas de celulasas cuja concentração era da ordem de 0,1 mg/ml. Foram realizados testes em bateladas em colunas. Nesse trabalho os autores estudaram os efeitos do pH e do gás carbônico na recuperação da celulase no concentrado (solução formada pela quebra das espumas no quebrador de espuma) e observaram que a pH moderado e neutro os autores conseguiram uma solução de celulase (no

concentrado) cujo os valores de razão de separação (RS) definida como sendo a concentração da amostra no topo, no meio ou na zona de espuma dividido pela concentração na base da coluna estavam situados na faixa de 30 a 220. Santana (1994) utilizou o processo de separação de proteínas por adsorção em bolhas para reduzir contaminantes de superfície ativa em rejeitos de águas industriais. Lucena (1996) estudou os efeitos de refluxo externo com a finalidade de melhorar a recuperação ou redução de contaminantes em estudos realizados por Santana (1994).

3.6 - Flotação em coluna

Como já foi visto anteriormente, a técnica de flotação é muito usada para separação e concentração de partículas, principalmente minerais. Os melhores textos sobre os princípios básicos de flotação se encontrados nos livros de Gaudin (1957), Fuersteneau (1976) e Leja (1982).

Em seu trabalho sobre recuperação de amilase utilizando flotação de precipitados, Miranda e Berglund (1993) relatam a importância da seleção de partículas pelas bolhas para um melhor entendimento sobre os fenômenos básicos de flotação ou seja as partículas adsorvidas pelas bolhas são hidrofóbicas e as que não são adsorvidas são hidrofílicas.

A flotação em coluna apresentam as seguintes vantagens: trata-se de uma operação rápida, apresenta um baixo custo em termos de investimento e operacional, pode ser realizada em grandes escalas. A flotação em coluna pode ser utilizada na recuperação de sólidos valiosos, na redução de íons inorgânicos muito tóxico assim também como diminuir a quantidade de surfatantes contido em rejeitos industriais e municipais, respectivamente.

3.6.1. Princípios operacionais

A primeira coluna utilizada para flotação foi patenteada no Canadá no início dos anos 60 por Boutin e Tremblay. Sua descrição foi apresentada em trabalhos por Wheeler, Boutin e Wheeler (Fuerstenau, 1976). O modelo dessas colunas às vezes é chamada de "coluna canadense", no entanto devido a sua grande variação essas colunas são chamadas de colunas de flotação. Existem outros tipos de colunas, tais como coluna de Leeds e coluna de Flotaire.

A ênfase dada a coluna canadense reside no fato de que a grande maioria dos trabalhos publicados e das plantas em operação que utiliza a flotação como processo de separação de sólido-líquido usa esse tipo de coluna, representada esquematicamente na Figura 3.3.

A entrada da alimentação está situada a um terços do topo (dado de engenharia) e as bolhas de gás normalmente são geradas um dispersor colocado na base da coluna. As bolhas coletam as partículas flotáveis na seção da zona líquida, que por essa razão é chamada de zona de coleta. Essa zona é equivalente a zona de recuperação em uma célula convencional. As partículas coletadas são transferidas para uma zona de espuma. O papel da água de lavagem no início é limpar a espuma das partículas hidrofílicas que são arrastadas pela água que cruzam com as bolhas da zona de coleta. A zona de espuma também é chamada de zona de clareamento. O uso da água de lavagem é uma ferramenta que permite aumentar eficiência da operação de flotação.

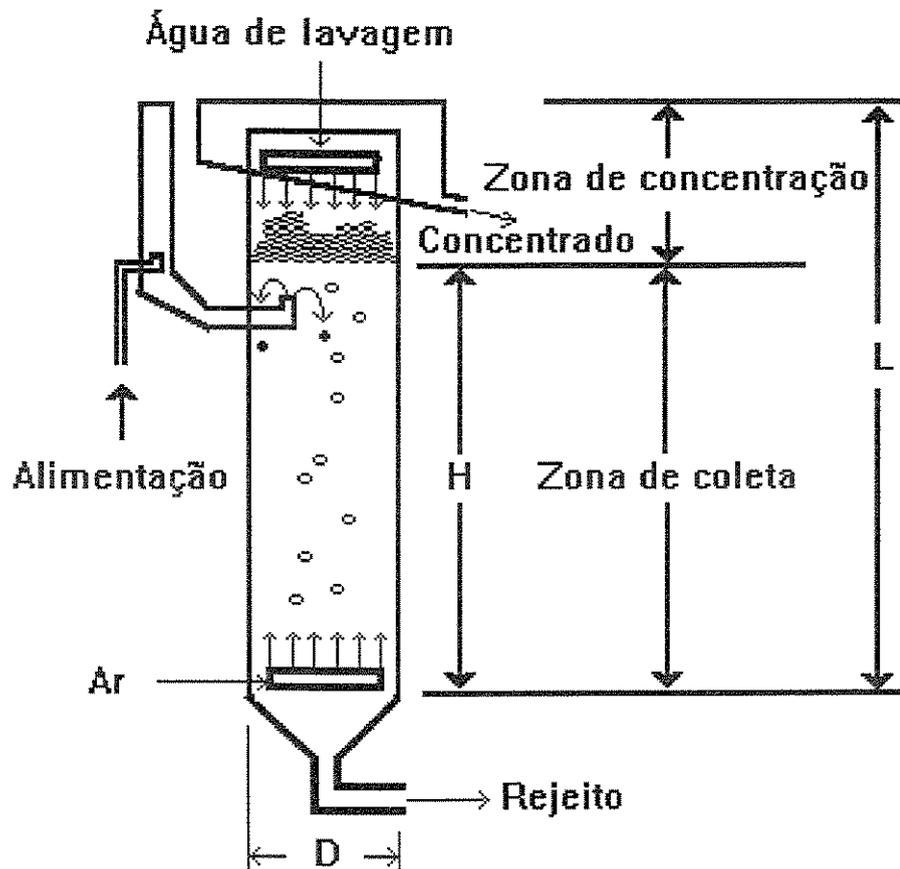


Figura 3.3 - Diagrama de coluna mostrando as zonas de coleta e de concentração.

O desempenho da flotação é influenciada pela interação entre as Zonas de coleta e ou de recuperação de lavagem. Com relação a performance é o "froth dropback" ou seja a quantidade material hidrofílico que entra na zona de espuma e retorna à zona de coleta. A vazão do rejeito normalmente é ligeiramente maior do que vazão da alimentação, devido a água de lavagem. Uma pequena parte dessa água vai para o concentrado (acompanha a mesma direção do fluxo das partículas flotadas) e o restante da água vai para o rejeito (direção contrária ao fluxo das partículas flotadas). Esse desbalanço entre as vazões volumétricas entre a alimentação e o rejeito é chamada de "bias".

Na zona de recuperação existe um fluxo em contracorrente de suspensão e bolhas de ar geradas no fundo da coluna.

Na coluna não há necessidade de agitação mecânica por intermédio de pás para manter as partículas em suspensão afim de que elas possam manter o contato com as bolhas de ar. Isso é altamente vantajoso principalmente quando se trabalha com proteínas e enzimas, pois a agitação mecânica causada por pás tanto pode desnaturar as proteínas como diminuir o tamanhos dos precipitados. No entanto, a colisão entre as partículas e bolhas é ao mesmo tempo é prejudicial a flotação porque essa turbulência faz com que as bolhas se livrem das partículas anteriormente absorvidas.

Essas partículas (mesmo sendo hidrofóbicas) ao se chocarem com as bolhas nem sempre são absorvidas pelas mesmas, pois essa adsorção depende do ângulo de contato entre bolha e partícula. Desse modo essas partículas descem dentro da coluna até que ocorra a sua adsorção junto a bolha.

O processo de coleção das partículas pelas bolhas na zona de coleta pode ocorrer através de dois processos: 1) Colisão entre partícula e bolha

seguida da adsorção dessa a bolha devido a natureza hidrofóbica das partículas; 2) Arraste de partículas que ficam entre as bolhas. Uma característica muito importante em coluna de flotação é que as partículas não hidrofóbicas recuperadas pelo arraste podem ser virtualmente eliminadas da zona de concentração.

Em células convencionais, entretanto, após as partículas e as bolhas deixarem a zona de coleta as suas velocidades são diminuídas, o que diminui a probabilidade de colisão entre elas. Além disso a zona de recuperação é capaz de recuperar quase que a totalidade das partículas que são separadas acidentalmente das bolhas na seção de lavagem o que não ocorre com as células convencionais. A saída do rejeito nunca é entupida devido as localizações da alimentação e da saída ficarem no topo e fundo da coluna, respectivamente.

Determinadas colunas de flotação possuem água de lavagem. Essa água fica localizada na seção de clareamento. Em aparelhos convencionais de flotação existe uma drenagem do leito de espuma onde as partículas não-flotáveis que foram eliminadas pelas bolhas que subiam são drenadas. As bolhas que chegam a interface do leito espuma-líquido da coluna estão cercadas de uma grande quantidade de suspensão. As partículas não-flotáveis contidas na suspensão junto às bolhas que sobem dentro da camada de espuma são drenadas e retornam a fase líquida. Entretanto, isso faz com que as bolhas unam-se umas as outras devido a uma aumento da espessura da paredes entre elas, ao ponto das bolhas funcionarem como um filtro prendendo entre elas as partículas não-flotáveis.

Na coluna de flotação, o fluxo da água de lavagem desce na seção de clareamento, varrendo desse modo os rejeitos que seguem as bolhas até a camada de espuma.

Além disso, a espessura da camada de líquido entre as bolhas as previne de qualquer entrelaçamento, justamente o oposto do que acontece no dreno da camada de espumas. Isso evita todo o limo não flotável de alcançar o concentrado pela água de lavagem que desce. Na coluna com lavagem não existe nenhum dreno na camada de espuma, porém a estrutura é composta de duas seções devido a injeção da água de lavagem em um ponto interno da coluna (Figura 3.4).

A seção acima do ponto de injeção é justamente a seção de espuma que a caracteriza como uma drenagem convencional da camada de espuma. Todavia a porção abaixo do ponto de injeção é uma configuração mais livre de bolhas devido, ao fluxo da água de lavagem limitado pela camada de bolhas. No fundo, certamente na interface entre a suspensão a zona de borbulhamento e a camada expandida de bolha; está localizada a camada empacotada de bolha (Yanatos et al., 1986).

O posicionamento da água de lavagem é parcialmente controlado pela a quantidade de líquido recuperado com as partículas flotadas. Isso é medido pela taxa volumétrica de concentração, i. é., a razão entre a vazão de alimentação e do concentrado. Altas taxas de concentração volumétrica são uma desejáveis nas operações unitárias de processos de recuperação e purificação e quase que uma obrigação no caso da operação unitária ser uma das primeiras etapas num esquema de recuperação e purificação.

A consequência prática mais importante dessa diferença fundamental entre coluna e células mecânicas convencional é o seu alto desempenho de recuperação. Outras vantagens das colunas de flotação sobre os aparelhos convencionais são: altas capacidades, facilidade de operação, baixo consumo de energia, menor espaço para instalação e menor custo de operação e manutenção.

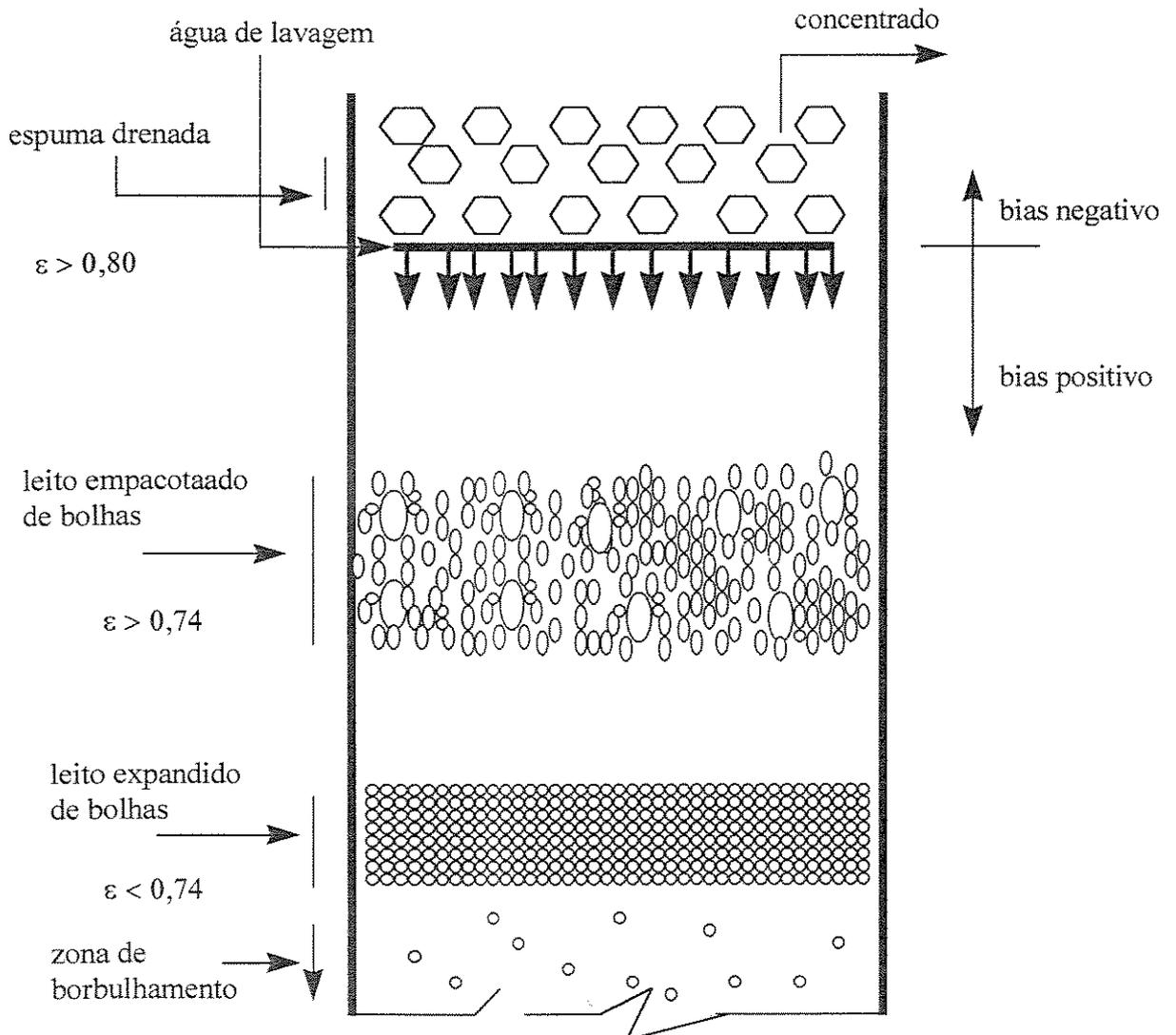


Figura 3.4 - Estrutura da espuma em uma coluna de flotação. (ϵ é a razão entre o volume do gás e o volume do gás mais o volume do líquido) (Yanatos et al., 1986).

3.6.2. Parâmetros operacionais e dados de projetos

Os parâmetros operacionais e os dados do projetos são muito importante no desempenho da coluna. Segundo Schubert (1988) esses parâmetros são:

- Altura da coluna L ;
- Diâmetro da coluna D ;
- Razão altura e diâmetro da coluna L/D ;
- Posição da entrada da alimentação;
- Tipo de aerador;
- Tamanho das bolhas;
- Velocidade de superfície do ar;
- Velocidade da polpa;
- Porcentagem de volume de sólido na alimentação; e
- Velocidade superficial da água de lavagem.

Os cinco primeiros parâmetros são determinados pelo projeto da coluna e os demais podem ser ajustado dentro dos limites operacionais

Capítulo 4

Materiais e Métodos

Este capítulo está destinado ao relato dos equipamentos, reagentes, métodos de análises de concentração e atividade de proteína, métodos de operações utilizados na precipitação e flotação de proteínas.

4.1 - Materiais

4.1.1 - Proteínas utilizadas

Nos experimentos de precipitação as proteínas utilizadas foram fornecidas pela Sigma (Dt. Louis, MO, Estados Unidos), essas proteínas são: proteínas albumina de soro bovino (BSA) A-7030 lote 24H0174 com pureza superior a 98 % via gel eletroforese com ponto isoelétrico (pI) igual a 4,9 e massa molecular de aproximadamente 67.000 dáltons; hemoglobina bovina H-2675 lote 64H9310 grau substrato com pI igual a 6,9 e massa molecular de aproximadamente 68.000 dáltons; mioglobina de coração de cavalo com 97% de pureza, massa molecular 18.800 dáltons; pepsina de mucosa de estômago de porco, com 3.100 Unidades por miligrama e massa molecular de aproximadamente igual a 39.000 dáltons e pI próximo a 1. Nos experimentos de precipitação e flotação foram utilizadas celulases industrial

com 15% de proteína cedida gentilmente pela Bioquímica do Brasil S.A. (Biobrás), Montes Claros, MG.

4.1.2 - Polieletrólitos utilizados

Os polímeros não iônicos utilizados nos testes de precipitação seguida de flotação foram metilcelulose (MC) e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) cedida pela Dow Química do Brasil, os polieletrólitos aniônicos ácidos poli-acrílicos (PAA) de massa moleculares iguais a 90.000, 450.000 e 1.000.000 de dáltons foram adquiridos junto à Polysciences Inc. (Warrington, PA, Estados Unidos). Como polieletrólito catiônico foi utilizado o quitossona C-3646 de grau comercial e massa molecular estimadas em 900.000 dáltons obtido a partir de resíduos de crustáceos adquirida junto à da Sigma.

4.1.3 - Tampões utilizados

Na dissolução de proteínas foram utilizados os seguintes tampões: citrato e acetato. Na preparação desses tampões foram utilizados citrato de sódio e ácido cítrico e no segundo ácido acético e acetato de sódio, sendo ambos de grau analítico e obtido junto à Fischer Scientific (Pittsburgh, PA, Estados Unidos).

4.2 - Métodos

4.2.1 - Preparação de soluções

No preparo das soluções de proteínas foram utilizadas tampões preparados em águas ultra pura obtida pelo sistema Milli-Q Plus.

4.2.1.1 - Preparação da solução estoque de HPMC e MC

Pesou-se em uma balança analítica Mettler AJ150L 1 g de HPMC e adicionou-se aos poucos com agitação junto a 33 ml de tampão acetato quente pH 5,0 em um becker de 250 ml, cuja finalidade foi de hidratar as moléculas do polímero, após a sua total dissolução, também com agitação através de um bastão de vidro foram adicionados mais um terço do mesmo tampão gelado. Essa solução foi transferida para um balão volumétrico de 100 ml e completada com o tampão, sendo então homogeneizada filtrada a vácuo e guardada em um frasco na geladeira.

4.2.1.2 - Soluções de proteínas

Para as soluções de pepsina, miglobina, hemoglobina, BSA, a quantidade de proteína desejada era pesada na balança citada no item anterior e fazia-se a dissolução da proteína no tampão preestabelecido com uma agitação suave manualmente com um bastão de vidro para evitar a desnaturação da mesma. No caso da celulase essas soluções eram submetidas a uma centrifugação de 3.000 g durante 5 minutos em uma centrífuga Hitachi.

4.2.1.3 - Solução saturada de sulfato de amônio

Para obter-se solução saturada de sulfato de amônio, adicionou-se 761 g de sulfato de amônio a cada 100 ml de água destilada e deixou-se a mesma sobre agitação de 200 rpm à 25 °C durante 24 horas, efetuou-se o ajuste de pH com hidróxido de amônio, o aferimento do pH foi feito através de uma diluição de 1 ml da solução de sulfato de amônio para 4 ml de água

para não danificar o eletrodo. Na determinação do pH foi usado um pHmetro Metter Delta 340.

4.2.1.4 - Solução de ácido dinitrosalicílico (DNS)

A solução de DNS foi preparada dissolvendo-se 10,6 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico em 1416 ml de água destilada aquecida e após a dissolução de DNS dissolveu-se 19,8 g de NaOH, 7,6 ml de fenol fundido a 50 °C e 8,3 g de metabissulfito de sódio. Essa solução foi submetida a um borbulhamento de nitrogênio durante 30 minutos e guardada na geladeira em frasco escuro.

4.2.2 - Determinação da concentração de proteínas

As concentrações de proteínas foram determinadas através de dois métodos: espectrofotometria a 280 nm e Bradford (1976) (, 1976). No primeiro método de determinação de concentração de proteínas a curva padrão foi obtida a partir da diferença entre as absorvâncias a 280 e 320 nm, sendo que a absorvância a 320 nm foi tomada como linha de base para diminuir os efeitos negativos da turbidez sobre os valores da absorvância (Gehle e Schugerl, 1984). Esse método foi utilizado na quantificação preliminar de proteínas, sendo que o método colorimétrico de Bradford (1976) foi utilizado nos demais ensaios de quantificação de proteínas a 595 nm. O espectrofotômetro usado foi o modelo Hitachi Espectrophotometer U-2000 (Nissei Sangyo Co, Japão). As curvas de calibração foram determinadas para cada proteína nos testes de precipitação com substâncias puras, para os demais experimentos usou-se a albumina de soro bovino como padrão.

Na determinação de proteínas em uma mistura binária pepsina - BSA, determinou-se inicialmente a quantidade de proteína total pelo método Bradford (1976) e em seguida determinou-se a quantidade de pepsina da sua atividade específica, uma vez que no pH estudado a BSA não foi hidrolizada pela pepsina.

4.2.3 - Determinação de atividade enzimática

Todas as determinações das atividades enzimáticas, foram realizadas em triplicatas e acompanhadas dos brancos de enzimas e substratos. Para o branco da enzima, o substrato foi substituído pelo tampão usado na reação, enquanto que, para o branco do substrato, a enzima foi substituída pelo tampão.

4.2.3.1 - Método de dosagem de atividade de pepsina

A determinação da atividade da pepsina foi realizada utilizando a hemoglobina bovina como substrato à 37 ° C, pH igual a 2,0 segundo o método de Anson (1939). A atividade da pepsina foi determinada em triplicatas na solução inicial da proteína antes de serem realizados os testes de precipitação. Após a precipitação da proteína, foram determinadas as atividades da pepsina no sobrenadante e precipitado. Para a determinação da atividade da pepsina tomou-se uma amostra de 1 ml de solução de pepsina com concentração igual a 1 mg/ml e deixou-se incubando por 10 minutos à 37 °C, em seguida adicionou-se 1 ml de hemoglobina bovina e deixou a mistura incubando em banho termostato à 37 °C por 10 minutos e por último foi adicionado 2 ml de ácido tricloroacético com a finalidade de parar a reação de hidrólise entre pepsina (enzima) e a hemoglobina (substrato). A

suspensão foi centrifugada a 5.000 g durante 5 minutos e efetuou-se a leitura da absorbância do sobrenadante a 280 nm. Uma unidade de atividade específica (U/ml) foi definida como sendo o valor dessa absorbância a 280 nm após 10 minutos de reação nas condições de teste.

4.2.3.2 - Método de dosagem de atividade da celulase

O método foi usado para a determinação de atividade celulolítica foi método de Dubois et al.(1956), usando papel de filtro whatman # 1 como substrato de acordo com Mandels (1975). Para cada ensaio foi utilizado 15 discos de papel com diâmetro de aproximadamente 5 mm . Foi adicionado 0,5 ml de tampão acetato 50 mM pH 5,0 os quais foram incubados á 30 °C durante 15 minutos. A seguir adicionou-se 0,25 ml da amostra contendo celulase e deixou-se a mistura reagindo por 150 minutos.

Para determinação da atividade contida no precipitado efetuou-se a dissolução do mesmo em 100 ml de tampão acetato 50 mM pH 5,0 de modo que a concentração de enzima na amostra fosse menor que 0,15 mg/ml, pois a concentração maiores verificou-se uma diminuição na atividade específica da mesma.. Canevascini e Gatten (1981) verificaram que na determinação de atividade específica da celulase é necessário um controle de diluição, pois os autores verificaram que a atividade específica das celulases é aumentada com a diluição da celulase.

O sobrenadante foi submetido a ultrafiltração em ultrafiltro Amicon (PM 10) para retirar os íons sulfato e amônio, os quais, interferem na determinação de atividade da celulase. A quantidade de açúcar redutor presente na reação produzido no ensaio enzimático foi determinada pela medida de absorbância a 540 nm e comparada com a curva padrão de glicose de acordo com o método do ácido dinitrosalicílico de Miller (1959)

A temperatura utilizada por Dubois (1956) na determinação da atividade da celulase foi de 50 °C no entanto, a presença de MC ou de HPMC (um éteres de celulose) aumenta a viscosidade da solução com o aumento da temperatura, dificultando a reação do complexo enzimático da celulase com a celulose. Com base nessa propriedade desses ésteres foi feito um controle da temperatura de reação entre esse complexo enzimático e a celulose, tendo sido escolhida a temperatura de 30 °C como sendo a melhor temperatura para a determinação de atividade nos experimentos de precipitação de celulase e MC ou HPMC com sulfato de amônio.

4.2.4 - Precipitação de proteínas com polieletrólitos

Os experimentos de precipitação de proteínas com polieletrólitos foram realizados em tubos de centrifugas com capacidade de 28 ml. O volume final das soluções envolvidas nesses testes foram de 15 ml e a separação do precipitado da solução foi feita por uma centrifuga modelo Hitachi, que possibilita uma aceleração de até 15.000 g. Essas misturas foram encubadas durante 60 minutos em agitador recíproco à temperatura ambiente após a adição do polieletrólito a proteína. As suspensões foram centrifugadas a 7.000 g durante 30 minutos.

Os precipitados foram dissolvidos à pH 2,0. Foram então recolhidas amostras dos sobrenadantes e precipitados para determinação da quantidade de proteínas pelo método Bradford (1976) a 595 nm.

4.2.4.1 - Precipitação de mioglobina com ácido poliacrílico (PAA)

Nos experimentos de precipitação de mioglobina com PAA foram estudadas a influência do pH e da dosagem do PAA de massa molecular

igual a 90.000 dáltons na recuperação de proteínas. Também foi estudado a influência da massa molecular do PAA na precipitação da mioglobina. Em todos os experimentos de precipitação com a mioglobina foram utilizados a mesma concentração final dessa proteína como sendo igual a 1 mg/ml.

Inicialmente estudou-se a influência do pH na precipitação da mioglobina com PAA de massa molecular igual a 90.000 dáltons. Foram preparadas seis soluções de mioglobinas com concentração de 2 mg/ml em tampão acetato 100 mM numa faixa de pH de 3,5 a 5,8 em intervalo de pH igual a 0,5 com exceção do último intervalo de pH que é 0,3. Também foram preparadas diversas solução de PAA a 0,1 % em acetato 100 mM com as mesmas soluções tampão usada na dissolução de mioglobina. Transferiu-se 7,5 ml de cada solução de mioglobina nos diversos pH para os tubos de centrífugas e em seguida adicionou-se igual volume da solução de PAA em seus respectivos pH. A dosagem (mg de PAA por mg de mioglobina) nesses experimentos foi igual a 0,2. Em seguida estou-se a influência da dosagem (de 0,02 a 0,4 mg de PAA por mg de mioglobina) e pH utilizando o PAA de massa moleculares iguais a 90, 450 e 1.000 kDa.

4.2.4.2 - Recuperação de albumina de soro bovino (BSA) com quitosona

As precipitações com quitosona foram realizadas de modo idêntico às com PAA. As soluções de BSA com concentração de 1 mg/ml foram preparadas pela dissolução da proteína liofilizada na solução de tampão acetato 100 mM e no pH determinado. A quitosona foi dissolvido em soluções a 2% de ácido acético antes de ser adicionado à solução tampão acetato, obtendo-se soluções-estoque com concentração de 1 mg/ml. As variáveis estudadas foram pH e dosagem em mg de quitosona por g de BSA. No estudo da influência do pH, foram realizados ensaios com dosagens de

300 mg de quitosona por grama de BSA numa faixa de pH de 5,3 a 6,3 e no estudo da influência da dosagem, utilizou-se a faixa de dosagem e 10 a 500 mg de quitosona por grama de BSA a um pH de 5,9.

4.2.4.3 - Precipitação de pepsina com quitosona

Precipitações de pepsina com quitosona foram realizadas em bateladas de 15 ml em tubos de centrífugas à temperatura ambiente. Foram estudados três valores de pH (3,4; 4,2 e 5,0) e dosagens de quitosona (razão entre massa de quitosona e massa de proteínas iguais a 0,02 a uma concentração fixa de proteína 0,667 mg/ml). Os valores limites da faixa de pH estudados foram estabelecidos pelos valores de pH máximo e mínimo obtidos quando se combinava quitosona requeridos para a dosagem de 1,0 com o volume necessário de diluente nos seus pH(s) máximo e mínimo. Esses diluentes foram acetato de sódio 50 mM (pH 7,4) e ácido acético 50 mM (pH 3,2), respectivamente, uma vez que se trabalhou com tampão acetato 50 mM.

O protocolo experimental era o de se pesar em um tubo de centrífuga a quantidade necessária de uma solução de quitosona a 1% (dissolvido em ácido acético 2%v/v) para 1 mg de pepsina suína (10 mg/ml em tampão acetato de sódio pH 5,0). À esta porção de quitosona adicionava-se diluente até completar 14 ml, homogeneizava-se e finalmente 1 ml da solução de pepsina de 10 mg/ml era adicionada provocando a precipitação do complexo pepsina-quitosona. Após envelhecimento de 30 minutos à 25 °C a suspensão foi centrifugada a 7.000g por 20 minutos sendo então separado o precipitado do sobrenadante. Foram efetuadas as medidas de concentração e atividade

da pepsina tanto no precipitado como na solução sobrenadante e também na solução inicial.

A atividade proteolítica da pepsina nas diversas frações foi determinada pelo método de Anson como descrito no item 4.2.2. De posse dos dados de concentração de proteínas e atividade enzimática, foram elaborados os balanços de massa e atividade.

4.2.4.4 - Precipitação seletiva de pepsina com quitosona em uma mistura binária pepsina e BSA

A precipitação seletiva de pepsina com quitosona em uma mistura binária (pepsina e BSA) foi realizada em bateladas de 15 ml em tubos de centrífugas à temperatura ambiente e tampão acetato 50 mM pH 5,0. Foram estudadas cinco de dosagem 0,03; 0,08; 0,13; 0,2; e 0,3 (mg quitosona por miligrama de Pepsina) e quatro de razões protéicas 0,0 (pepsina pura); 0,5; 1,0 e 2,0 (mg de BSA por miligrama de Pepsina) correspondendo a um total de 20 experimentos.

O protocolo experimental era o de pesar em tubos de centrífugas a quantidade necessária de uma solução de quitosona a 1% (dissolvido em ácido acético 2% v/v). Em seguida adicionava-se tampão e volumes de soluções de BSA e pepsina ambas com concentrações iguais a 10 mg/ml. A seqüência dos restantes dos experimentos foi realizada como no item anterior. Com a finalidade de se estudar o fator de separação, determinou-se as concentrações de BSA e pepsina assim como a atividade específica da pepsina, tanto no precipitado como no sobrenadante.

Foram realizados controles para verificar se a pepsina hidrolizava a BSA e se ela sofria autohidrólise, tendo sido constatado que em nenhum caso houve hidrólise, o que tornou possível determinar as quantidades

protéicas de BSA e pepsina. Para isso, determinou-se primeiro a atividade da pepsina e a massa protéica global tanto no sobrenadante como no precipitado. A massa de pepsina foi determinada com base na de atividade de pepsina, e a massa de BSA pela diferença entre a massa protéica global (soma da massa de proteína da pepsina e BSA) e a massa de pepsina.

4.2.5 - Precipitação de Celulase

Com o objetivo de otimizar a precipitação da celulase e HPMC com sulfato de amônio estudou-se seis variáveis, sendo que as variáveis razão mássica (mg de HPMC por miligrama de celulase) e saturação de sulfato de amônio foram realizadas em bateladas de 15 ml de solução em tubos de centrífugas de 28 ml de capacidade volumétrica à temperatura de 25 °C e envelhecimento de 1 hora. Para as demais variáveis (temperatura de encubação, envelhecimento, adição de sal e agitação do shaker) foram realizadas em batelada de 20 ml Emerlenmeyer de 50 ml, usando um shaker termostaticado para controlar agitação e temperatura de encubação.

Foram efetuadas experimentos de precipitação de celulase com HPMC variando-se a razão mássica e a porcentagem de saturação de sulfato de amônio. Em uma primeira batelada foram realizados cinco valores de razão mássica (0,2; 0,5; 1,0; 2,0 e 5,0) a uma saturação de sulfato de amônio de 40 % e oito valores de saturação de sulfato de amônio a uma razão mássica igual a 1. Todos experimentos foram realizados em triplicatas.

Foi efetuado um planejamento estatístico experimental com finalidade de otimizar o processo de precipitação, e nesse caso as variáveis testadas foram as seguintes: temperatura, envelhecimento do precipitado, vazão de adição da solução de sulfato de amônio 80 % saturada (pois esses experimentos foram todos a 40% de saturação e os volumes das soluções de

sulfato de amônio e da solução contendo proteína e éster são iguais) e a agitação do shaker em vários níveis como mostra a Tabela 4.1.

Em todos os ensaios foram mantidos constantes as seguintes condições:

Saturação de sulfato de amônio no meio igual a 40 %

Razão mássica igual a 1 mg de HPMC/mg de celulase

Concentração de celulase igual a 0,5 mg/ml.

pH da solução igual a 5,0.

Segundo o planejamento estatístico fatorial 2^4 , foram efetuados inicialmente 16 ensaios todos em duplicatas para o estudo de regressão linear e em seguida mais 13 ensaios todos em duplicatas, sendo que cinco destes ensaios foram no ponto central como pode ser visto na tabela 4.2.

4.2.5.1 - Experimentos preliminares de precipitação de celulase e HPMC com sulfato de amônio

Segundo o protocolo, pesou-se em tubos de centrifuga as quantidades de 1,50; 3,75; 7,50; 15,00 37,50 mg de uma solução de HPMC a 1% correspondente as razões mássicas 0,2; 0,5; 1,0; 2,0 e 5,0 mg de HPMC por mg de celulase respectivamente. A cada tubo foram adicionadas quantidades diferentes tampão acetato 50 mM pH 5,0 para que em cada tubo tivesse 6,00 ml de solução. A mistura foi homogeneizada em um shaker com uma agitação de 150 rpm à 25 °C e em seguida foi adicionado 1,5 ml de solução estoque de celulase com uma concentração de 5 mg/ml onde a mistura foi mais uma vez homogeneizada nas mesmas condições anterior, então foram adicionadas em cada tubo 7,5 ml de solução de sulfato de amônio com 80 %

Tabela 4.1 Variáveis e níveis estudados

Variáveis	Níveis				
	-2	-1	0	1	2
X ₁ - Temperatura (°C)	25,0	30,0	35,0	40,0	45,0
X ₂ - Envelhecimento (h)	1,0	6,0	11,0	16,0	21,0
X ₃ - Adição de sal (ml/min)*	0,2	7,5	15,1	22,6	30,0
X ₄ - Agitação do shaker (RPM)	75,0	120,0	165,0	210,0	255,0

* Solução de sulfato de amônio a 80 % de saturação

Tabela 4.2 - Níveis das variáveis no planejamento estatístico

N° do ensaio	Variáveis			
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	-1
3	-1	1	-1	-1
4	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	-1
6	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1
8	1	1	1	-1
9	-1	-1	-1	1
10	1	-1	-1	1
11	-1	1	-1	1
12	1	1	-1	1
13	-1	-1	1	1
14	1	-1	1	1
15	-1	1	1	1

Tabela 4.2 - Continuação

Nº do ensaio	Fator			
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
16	1	1	1	1
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0
20	0	0	0	0
21	0	0	0	0
22	-2	0	0	0
23	2	0	0	0
24	0	-2	0	0
25	0	2	0	0
26	0	0	-2	0
27	0	0	2	0
28	0	0	0	-2
29	0	0	0	2

de saturação à pH 5,0 pois o volume final da solução em cada teste é de 15 ml e que a condição de saturação de sulfato de amônio em cada teste é de 40 %.

A mistura foi deixada envelhecendo no shaker com uma pequena agitação de 100 rpm à 25 °C durante 30 minutos. O precipitado foi separado do sobrenadante por centrifugação a 13.000 g a 25 °C durante 20 minutos.

O precipitado foi dissolvido em 15 ml de tampão acetato 50 mM. A atividade da celulase foi determinada pela quantificação dos açúcares redutores totais (ART) com ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) e a massa protéica pelo método Bradford (1976). Na determinação de atividade em cada teste foi usada uma solução controle (amostra da solução de celulase diluída para 0,1 mg de celulase por ml de solução) e cada amostra analisada tanto do sobrenadante quanto do precipitado foi diluída de modo que a solução apresentasse um valor de absorbância menor do que a solução controle.

De posse dos dados de volumes de frações, concentração de proteína e atividade enzimática, foram elaborados os balanços de massa e atividades.

4.2.5.2 - Otimização da precipitação de celulase com HPMC

Foram preparadas soluções estoques de HPMC conforme manual da Dow e celulase em tampão acetato 50 mM pH 5,0 ambas a 10 mg/ml. A solução de celulase foi centrifugada a 5.000 g durante 10 minutos para retirar algumas impurezas insolúveis.

Misturou-se 25 ml da solução enzimática a 2 mg/ml com igual volume de solução de HPMC também a 2 mg/ml e deixou a mesma homogeneizando no shaker a temperatura determinada sobre agitação de

120 rpm durante uma hora. Em seguida transferiu-se 10 ml dessa solução para um frasco Erlenmeyer de 50 ml, e por último 10 ml de solução de sulfato de amônio 80% saturado foi adicionada por intermédio de uma bomba dosadora conforme vazão estabelecida para o ensaio. O precipitado formado foi envelhecido com agitação e temperatura preestabelecida para o experimento. Logo após o envelhecimento o precipitado foi separado do sobrenadante por centrifugação a 14.000 g durante 20 minutos e dissolvido em 20 ml de tampão acetato 50 mM pH 5,0 em banho de gelo (pois a solubilidade dos precipitados de proteínas com a HPMC ou MC aumenta com a diminuição de temperatura) com agitação magnética lenta. Uma vez dissolvido o precipitado, retirou-se uma alíquota de 5 ml e diluiu-se 2,5 vezes para determinação da massa de proteína pelo método Bradford (1976) e uma outra alíquota foi diluída 5 vezes para determinação de atividade celulásica.

4.2.6 - Ensaio de flotabilidade dos precipitados de proteínas

Foram realizados testes de flotabilidade dos flocos formados nas precipitações de proteínas dos sistemas mioglobina e PAA, BSA e quitosona, pepsina e quitosona, celulase e HPMC com sulfato de amônio. Para verificação da flotabilidade dos precipitados preparou-se 50 ml de suspensão com esses sistemas. Para a precipitação de mioglobina com PAA utilizou-se as seguintes condições dosagem igual a 0,3 g de PAA por g de mioglobina, massa molecular do PAA igual a 90.000 dáltons à pH 5,0; BSA com quitosona foram utilizadas uma dosagem de 0,1 g de quitosona por g de BSA à pH 5,9; No caso da precipitação de pepsina foi utilizada uma dosagem de 0,15 g de quitosona por g de pepsina à pH 5,0. Na precipitação da celulase utilizou-se o HPMC como co-precipitante e o sulfato de amônio

como precipitante nas seguintes condições razão mássica igual a 1 g de HPMC por g de celulase concentração de celulase igual a 0,5 mg/ml, porcentagem de saturação de sulfato de amônio igual a 40 % e pH 5,0.

Utilizou-se Erlenmeyer de 100 ml para promover a precipitação de proteína e o tempo de envelhecimento dos precipitados foi de 1 hora.

Após envelhecimento, colocou-se os 50 ml da suspensão de um determinado sistema em uma minicoluna (adaptada de uma célula de Hallimound) de flotação com capacidade volumétrica de 70 ml (Figura 4.1) e injetou-se nitrogênio na parte inferior da coluna, que sua vez possui uma placa porosa para formar pequenas bolhas de ar.

Na parte superior da coluna adaptou-se um sifão formado por um pequeno tubo de silicone de tamanho 18 e na outra extremidade colocou-se um becker de 250 ml para coletar o concentrado, o rejeito permaneceu na coluna. A vazão do gás (10 ml/min) foi controlada manualmente através de uma válvula.

4.2.7 - Flotação contínua do precipitado complexo Celulase-HPMC

O equipamento utilizado na flotação de precipitado de proteínas foi uma coluna contínua feita de vidro pyrex. O dispersor de gás consiste de um cilindro feito de vidro sinterizado com poros de 40 a 60 μm , diâmetro de 1 cm e comprimento de 2 cm fixado na extremidade inferior da coluna conforme esquema mostrado na Figura 4.2. O alarguemento no topo da coluna é devido ao acúmulo de partícula na superfície interna da coluna (Oliveira, 1990). O alarguemento no fundo é para compensar a redução da área devido a presença do distribuidor de gás e evitar o congestionamento das bolhas nessa seção.

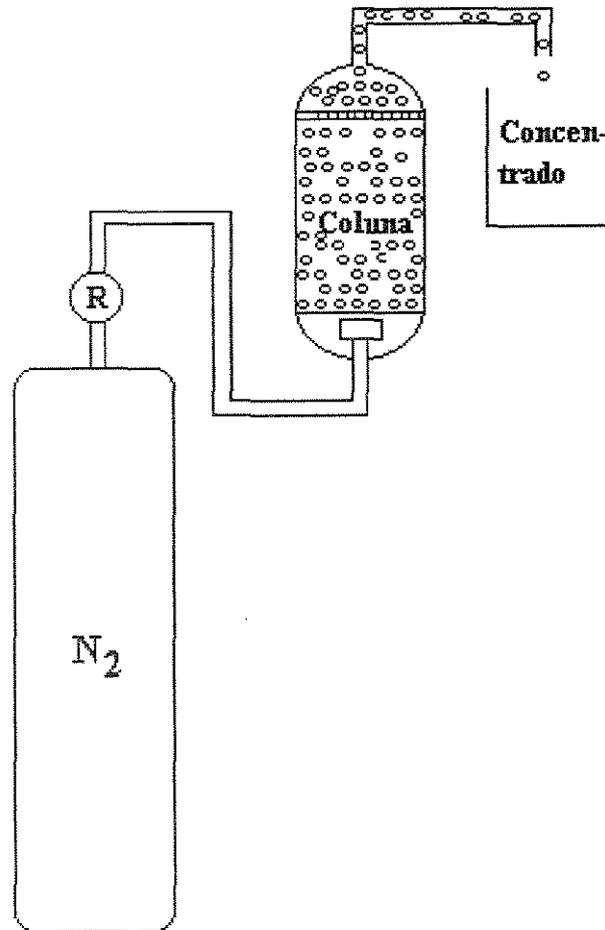


Figura 4.1 - Minicoluna de flotação utilizada nos testes de flotabilidade

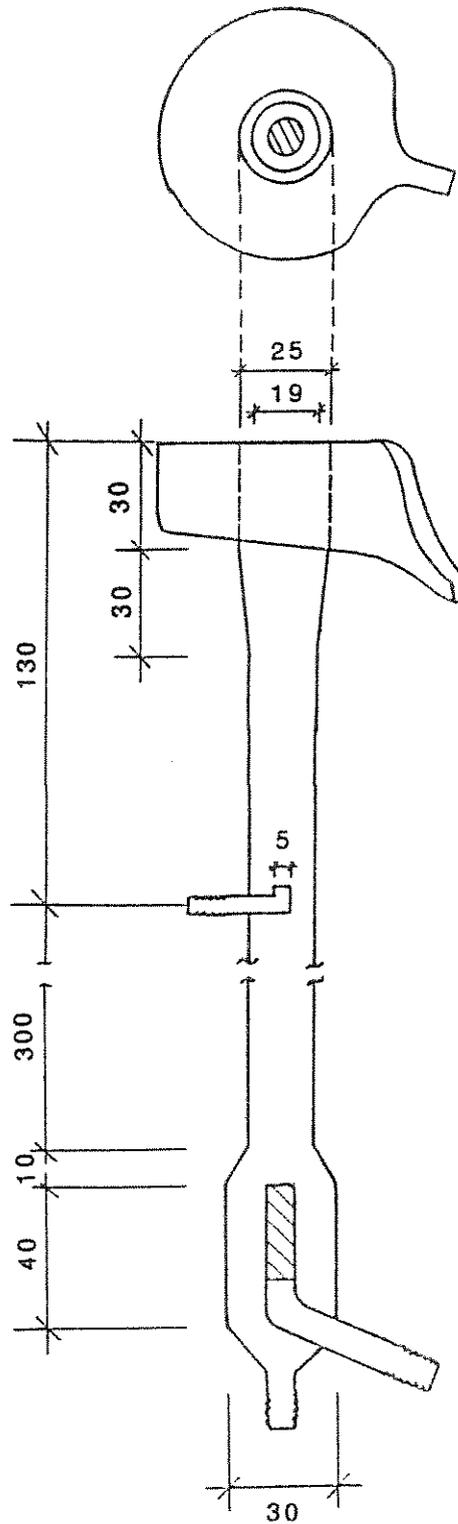


Figura 4.2 - Esquema básico da coluna utilizada nos experimentos de flotação. Medidas em milímetros.

A parte externa em forma xícara situada no topo da coluna coleta a espuma que transborda no topo (fração do concentrado). A linha de alimentação consistiu de um tubo de vidro imerso na suspensão, de uma mangueira de silicone Masterflex tamanho 13. O controle da alimentação foi efetuado por uma bomba peristáltica Masterflex Digi-Staltic modelo 7522-10.

O controle da vazão do resíduo da flotação foi feito através de um sifão móvel, utilizando-se uma mangueira de silicone de mesma dimensão da mangueira da alimentação. Uma extremidade da mangueira foi conectada no fundo da coluna e a outra em um tubo de vidro em forma de U. Esse tubo de vidro colocado na extremidade da mangueira tem como finalidade controlar a vazão do rejeito e da altura da zona de recuperação.

Um funil posicionado abaixo desse tubo de vidro ajudou a coletar o rejeito em uma proveta graduada de 2 litros. A linha de gás foi constituída de uma mangueira de silicone tamanho 16 conectando o reservatório de gás ao dispersor de gás colocado na extremidade da coluna. O gás utilizado foi nitrogênio pressurizado contido em um cilindro e a vazão foi controlada manualmente com o uso de uma válvula. Um transdutor Cole-Parmer Instrument Co. foi utilizado para fornecer uma leitura entre 0 e 20.000 (unidade arbitrária) previamente calibrada com a vazão do gás. Antes de ser introduzido na coluna o gás foi previamente borbulhado em água contida no saturador, cuja finalidade foi umidificar o gás.

Os experimento contínuos foram iniciados com um fluxo de gás (20 ml/min) e a suspensão foi bombeada a uma vazão de 8 ml/min para coluna que inicialmente continha 100 ml de tampão. A altura do tubo do sifão que controlava a vazão do rejeito era diminuída lentamente até que a interface suspensão-espuma alcançava o nível desejável. Depois que a vazão do gás e

o nível da interface atingia os valores desejados a coluna era operada em regime de pré-corrída por um tempo equivalente ao bombeamento da solução de alimentação pelo menos três vezes o volume da zona de recuperação. Durante a pré-corrída o rejeito e o concentrado foram descartados. A partir desse ponto foi cronometrado o tempo da corrída e foram coletados o rejeito e o concentrado. O concentrado foi coletado em um becker com tampão acetato para dissolução das partículas de HPMC e o rejeito foi coletado em uma proveta de 500 ml. Foram determinadas as atividades da celulase no sobrenadante e precipitado na suspensão, concentrado e rejeito.

A coluna de flotação contínua esquematizada na figura 4.2 foi utilizada para a recuperação de precipitados formados pela precipitação “salting-out” de celulasas-HPMC como alternativa ao uso de operações como filtração ou centrifugação.

A Coluna foi alimentada por uma suspensão formada pelo complexo acima, esse complexo foi mantido homogeneizado lentamente para não quebrar os flóculos no reservatório de alimentação, enquanto o nitrogênio era borbulhado na base da coluna. As bolhas arrastam parte das partículas, obtendo-se um concentrado no topo e um resíduo no fundo da coluna.

As vazões de alimentação e nitrogênio utilizadas foram de 8 e 20 ml/min, respectivamente, à temperatura ambiente de 25 °C. Foram efetuadas medidas dos volumes totais de alimentação, concentrados e resíduos obtidos durante a corrída experimental de 150 minutos, bem como as concentrações de proteínas e atividade da celulase em cada uma das correntes de entrada e saída. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976) e a atividade pelo método de Dubois (1956).

Capítulo: 5

Resultados e Discussão

5.1. - precipitação de mioglobina com ácido poliacrílico (PAA)

A precipitação de proteína com polieletrólito é muito eficiente e requer pequenas dosagens para se obter altas recuperações. As Figuras 5.1, 5.2 e 5.3 mostram os resultados obtidos na precipitação da mioglobina de com ácido poliacrílico. O PAA é um polímero aniônico e a sua interação com a mioglobina é eletrostática. A Figura 5.1, que mostra uma recuperação máxima de 98 % numa faixa de pH entre 3,5 e 5,0. Isso pode ser explicado pelo fato do precipitado esta numa faixa de pH abaixo do ponto isoelétrico da mioglobina cujo valor é 6,8 (Righetti et al., 1976) e o PAA apresentar um pKa ácido. Essa recuperação máxima nessa faixa de pH pode ser explicada através dos valores do pI e pKa da proteína e do polieletrólito, respectivamente. A valores de pH um pouco abaixo do pI da mioglobina a sua carga líquida positiva é quase nula e a valores muito baixo apesar da carga líquida positiva da mioglobina ser alta o PAA apresenta um grau de ionização muito baixo, conforme Nagasawa et al. (1965), cujos valores são 0,1; 0,2; 0,5; e 0,8 para os pHs 3, 4, 5 e 6 respectivamente. Deste modo, a mioglobina e o PAA apresentam uma interação eletrostática máxima na faixa de pH discutida acima, e como consequência uma melhor recuperação.

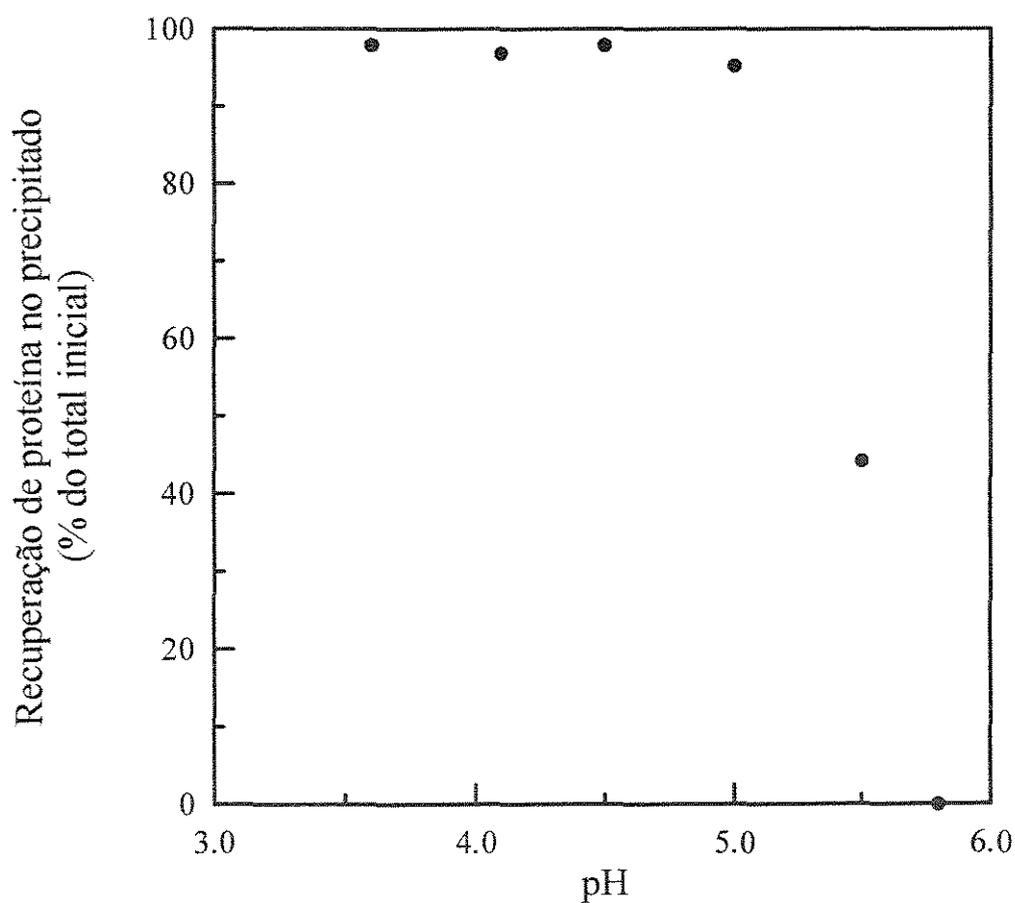


Figura 5.1 - Recuperação de mioglobina com PAA de massa molecular de 90 kDa em tampão acetato 100 mM em função do pH. A dosagem de 0,2 mg de PAA por miligrama de mioglobina.

A recuperação de mioglobina com PAA de massa molecular igual a 90 kDa mostrou o mesmo comportamento com relação a dosagem (mg de PAA por miligrama de mioglobina) para os valores de pH 3,6 e 4,5 como mostrado na Figura 5.2. Essa faixa de pH foi escolhida para estudar o comportamento da recuperação da mioglobina em função da dosagem já que com a dosagem de 0,2 mg de PAA por miligrama de mioglobina não praticamente nenhuma influência do pH e que em ambos os casos foi possível uma recuperação de até 98 por cento de proteína. Este comportamento pode ser explicado pela alta densidade de carga desse polieletrólito a pH ácido como visto no capítulo 2.

A Figura 5.3 mostra o efeito da dosagem e da massa molecular do ácido poliacrílico na precipitação de mioglobina com PAA. Foram utilizados nos experimentos soluções de PAA com três massas moleculares (90 kDa, 450 kDa e 1.000 kDa) diferentes, verificando-se que valores ótimos de massa molecular estão na faixa de 90 kDa a 450 kDa, com recuperações de proteína da ordem de 98 %, no entanto não existe uma relação absoluta do comportamento da massa molecular do polímero em relação a recuperação de proteínas (Sternberg et al., 1974). O valor ótimo para a dosagem situou-se entre 200 a 300 mg de PAA por grama de mioglobina.

5.2. Recuperação de albumina de soro bovino com a quitosona

A quitosona é um polímero catiônico com pKa igual a 6,2, uma solução com pH abaixo desse valor a sua carga líquida é positiva, a albumina de soro bovino por sua vez, tem pI em torno de 4,9. Nesse intervalo de pH existe uma interação eletrostática entre as cargas líquidas negativa da proteína e da carga líquida positiva do polieletrólito (Figura 1.2).

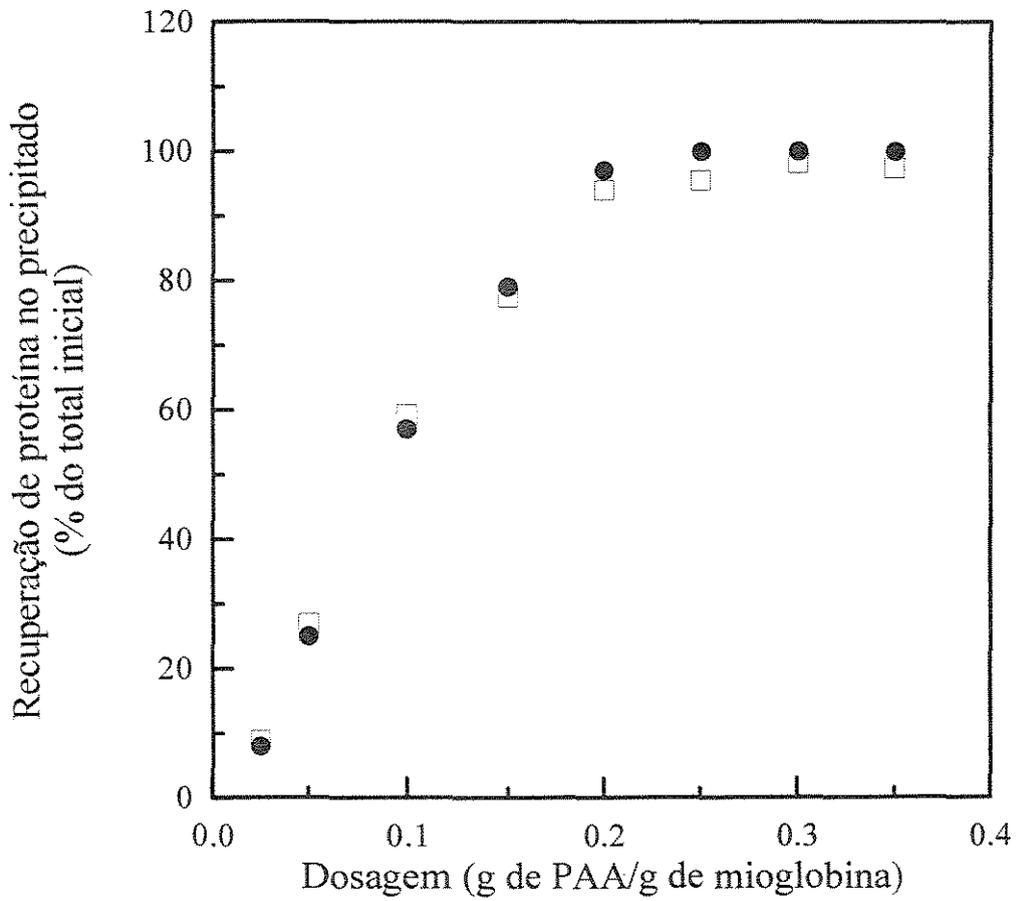


Figura 5.2 -Recuperação da mioglobina com PAA de massa molecular 90 kDa em tampão acetato 100 mM em função da dosagem e pH (● pH 3,6; □ pH 4,5).Concentração de mioglobina igual a 1 mg/ml.

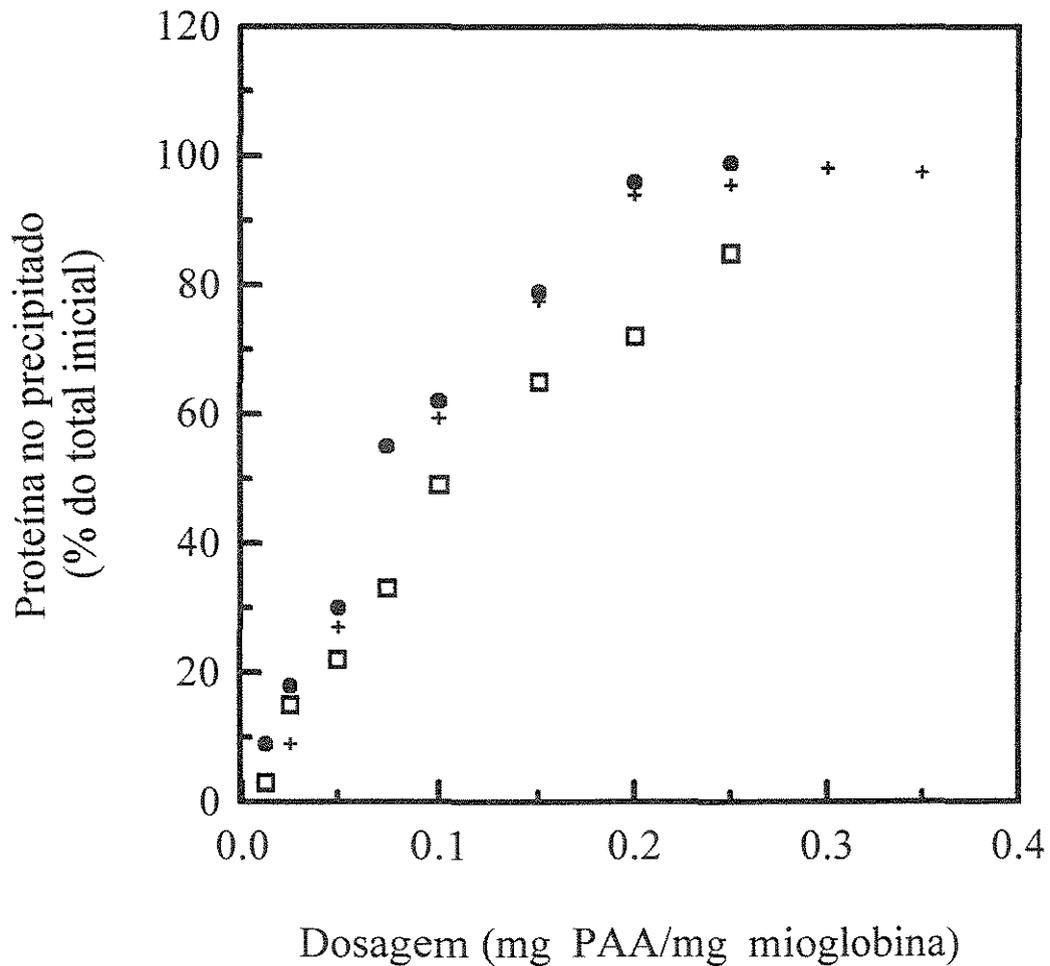


Figura 5.3 - Recuperação de mioglobina através de precipitação com PAA de várias massas moleculares (MM + 90 kDa, ■ 450 kDa e □ 1.000 kDa) e diferentes dosagens em tampão acetato 100 mM pH 5,0. Concentração de mioglobina igual a 1 mg/ml.

A Figura 5.4 mostra o comportamento da recuperação da albumina de soro bovino (BSA) com a quitosona em função do pH a uma dosagem de 100 mg de quitosona por grama de BSA em tampão acetato 100 mM. O valor ótimo de pH de recuperação de BSA mostrado nessa figura foi de 5,9 ou seja, um valor intermediário entre os valores do pI e do pKa da proteína e da quitosona, respectivamente.

A Figura 5.5 mostra o efeito da dosagem sobre a recuperação do BSA com quitosona em tampão acetato a pH 5,9 e que a dosagem de mais alta recuperação foi de 90 mg da quitosona por grama de BSA. Essas duas figuras (Figuras 5.4 e 5.5) mostram que a melhor recuperação foi de 68 % a um pH de 5,9 e dosagem de 90 mg de quitosona por grama de BSA.

O valor não muito alto dessa recuperação pode ser explicado pelas proximidades dos valores de pI da BSA 4,9 (Righetti et al., 1976) e do pKa da quitosona respectivamente, havendo portanto baixas densidade de carga tanto no polímero quanto na proteína. O valor da dosagem ótima de 90 mg de quitosona por grama de BSA pode ser explicado pelo fato quitosona ter um alto grau de ionização apesar da sua carga líquida positiva ser pequena nesse valor de pH próximo a 6,2 e que o aumento na dosagem diminui a interação eletrostática entre a proteína e o polieletrólito. Chen(1994) recuperou BSA de uma solução através de precipitação com polieletrólito usando PAA como precipitante. O pH valor ótimo de recuperação foi de 5,9. Isso deveu-se ao fato da proteína ainda apresentar carga líquida positiva e também do grau de ionização do PAA ser mais significativo. Precipitação entre proteínas e polieletrólitos também ocorrem em valores de pH onde ambos apresentam cargas líquidas negativas, e tal fenômeno é atribuído ao forte efeito dipolar localizado e de ionização induzida, o qual modifica o campo elétrico no sítio de interação Snoeren et al. (1975).

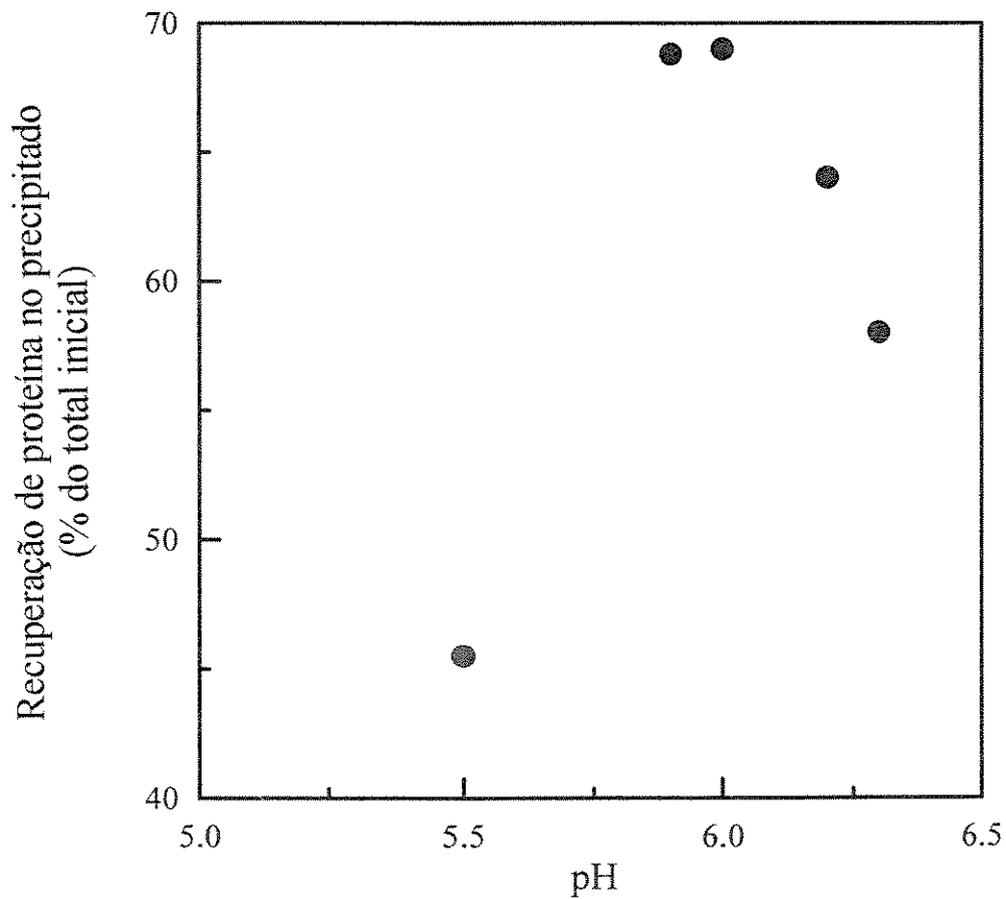


Figura 5.4 - Efeito do pH sobre a recuperação de BSA com quitosona. Concentração de BSA igual a 1mg/ml; concentração de quitosona igual a 0,3 mg/ml. Dosagem igual a 300 mg de quitosona por grama de BSA. Acetato 100 mM.

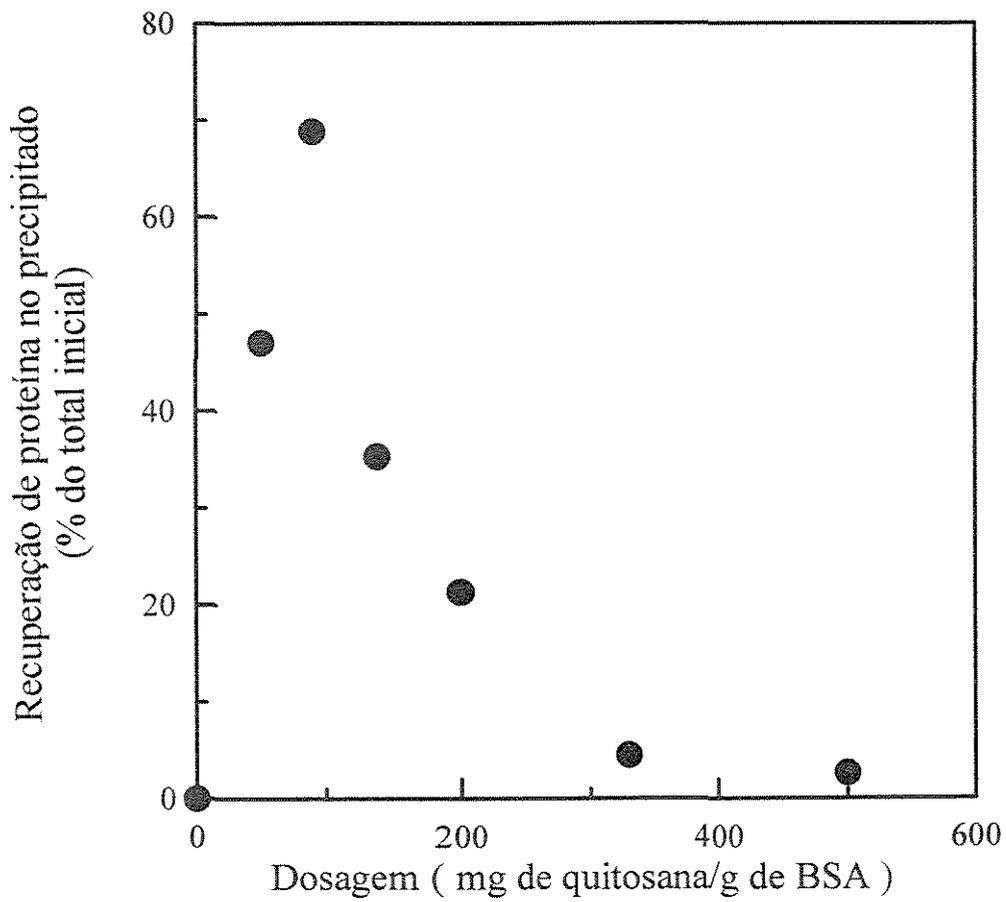


Figura 5.5 - Efeito da dosagem sobre a recuperação do BSA com a quitosona em pH 5,9. Concentração da BSA igual a 1 mg/ml.

5.3. - Precipitação de pepsina com quitosona

Foram realizados experimentos com uma enzima para a verificação da viabilidade de precipitação com polieletrólitos numa situação em que seja possível medir a atividade biológica. Foi escolhida a pepsina (uma enzima membro da família das proteases ácidas) como modelo devido ao seu baixo ponto isoelétrico (pI 1,0), o qual permitiu a utilização de experimentos numa faixa de pH de 3,0 a 6,0.

Nessa faixa de pH essa proteína apresenta carga líquida negativa e o quitosona positiva, pois o mesmo é um polieletrólito catiônico.

Antes de serem realizados os experimentos de precipitação foi feito um estudo experimental sobre a estabilidade dessa proteína. Nessa etapa estudou-se a estabilidade dessa proteína como função do tempo, temperatura e do pH já que a pepsina digere proteínas em ambiente ácido e que seu pH ótimo de atividade é igual a 2,0 (Anson, 1939). O objetivo do controle nos testes de precipitações com a quitosona foi verificar se a pepsina sofria autohidrólise. Nesse estudo preliminar (dados não apresentados) verificou-se que a pH 5,0 e temperatura entre 4 e 5 °C ela se mostrou estável por mais de 24 horas e que para valores de pH menor que 5 nessa faixa de temperatura a pepsina também mostrou-se estável.

Nos testes de precipitação de pepsina com quitosona não houve desnaturação e nem perda de atividade da proteína. A recuperação total de atividade (atividade recuperada com o precipitado e atividade remanescente no sobrenadante) foi praticamente de 100% (média de 96 % de recuperação com desvio padrão de 6% para um total de 60 testes computados).

A Figura 5.6 mostra resultados de estudos do efeito da concentração molar do tampão acetato na precipitação da pepsina com quitosona. A recuperação aumenta com a concentração do tampão acetato, isso se deve

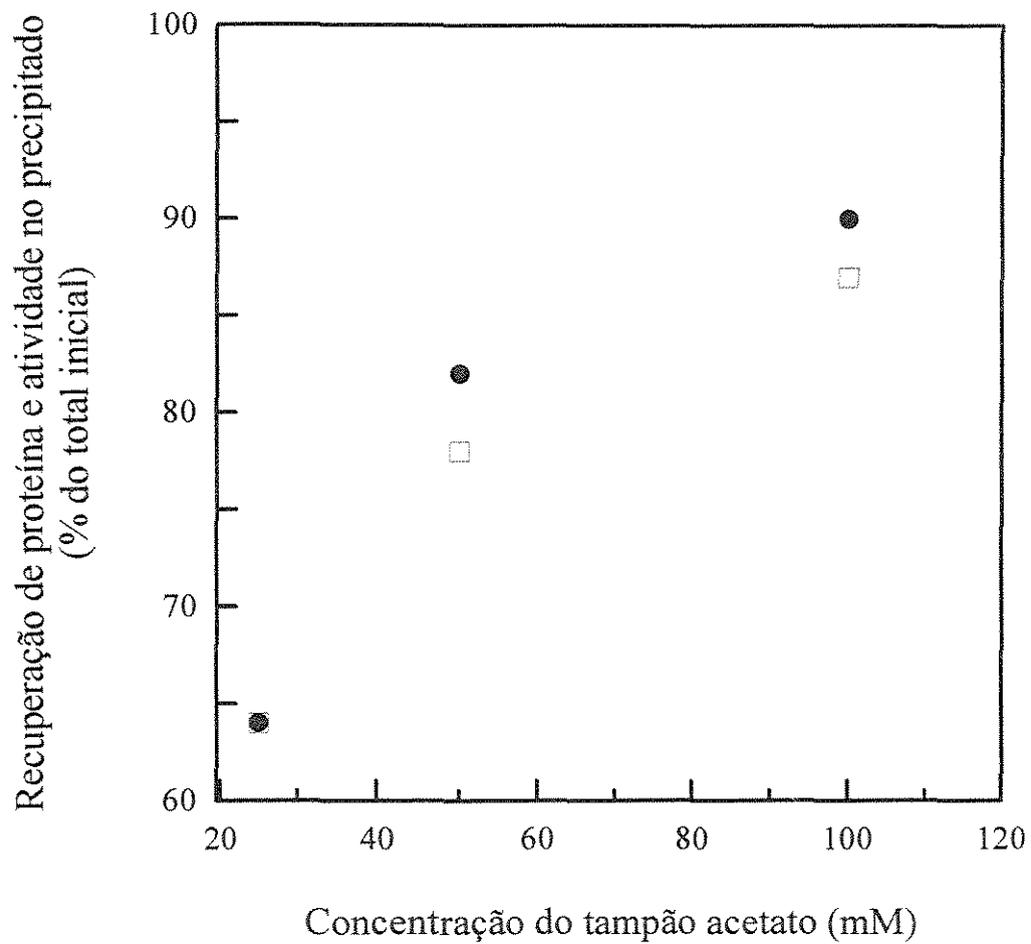


Figura 5.6 - Estudo do efeito da concentração molar do tampão acetato na precipitação da pepsina (● proteína; □ atividade) com quitosona a dosagem de 0,2 mg de quitosona por miligrama de pepsina à pH 5,0.

A recuperação aumenta com a concentração do tampão acetato, isso se deve ao fato do aumento da força iônica ter aumentado a interação eletrostática entre proteína e polieletrólito. A 25 mM os valores de recuperação de atividade e de proteína coincidem. A 50 e 100 mM existe uma diferença entre percentagem de recuperação de proteína e atividade de 5 por cento sendo que esses experimentos foram feitos em triplicatas com um desvio máximo de 2 %. O fato de não haver purificação, é devido a pepsina utilizada ser de grau analítico.

A Figura 5.7 mostra os efeitos da dosagem e do pH na recuperação da atividade do precipitado formado pela precipitação de pepsina e quitosona. A Figura 5.8 mostra os mesmos efeitos para a recuperação da proteína. Comparando-se as Figuras 5.7 e 5.8 verifica-se que a curva de atividade acompanha a curva correspondente de conteúdo de proteína na amostra e que a PH 3,4 a menor recuperação de proteína e atividade se deve a uma menor interação eletrostática entre a pepsina e a quitosona.

Nesse estudo optou-se pelo tampão acetato a 50 mM, pois a essa concentração pode-se verificar melhor o comportamento da recuperação da proteína e da atividade em função da dosagem, haja vista que a 100 mM essa recuperação foi próxima de 90%.

O objetivo dos testes não foi obter uma precipitação com um fator de purificação maior que 1, haja visto que a pepsina utilizada nos teste de purificação já era purificada e sim o de se verificar as melhores condições de precipitação. Os valores ótimos de pH e de dosagens foram os seguintes:

- para pH 3,4 : a dosagem de 0,05 mg de quitosona por miligrama de pepsina obteve-se 94% de recuperação de atividade e 86,5 % de proteína.

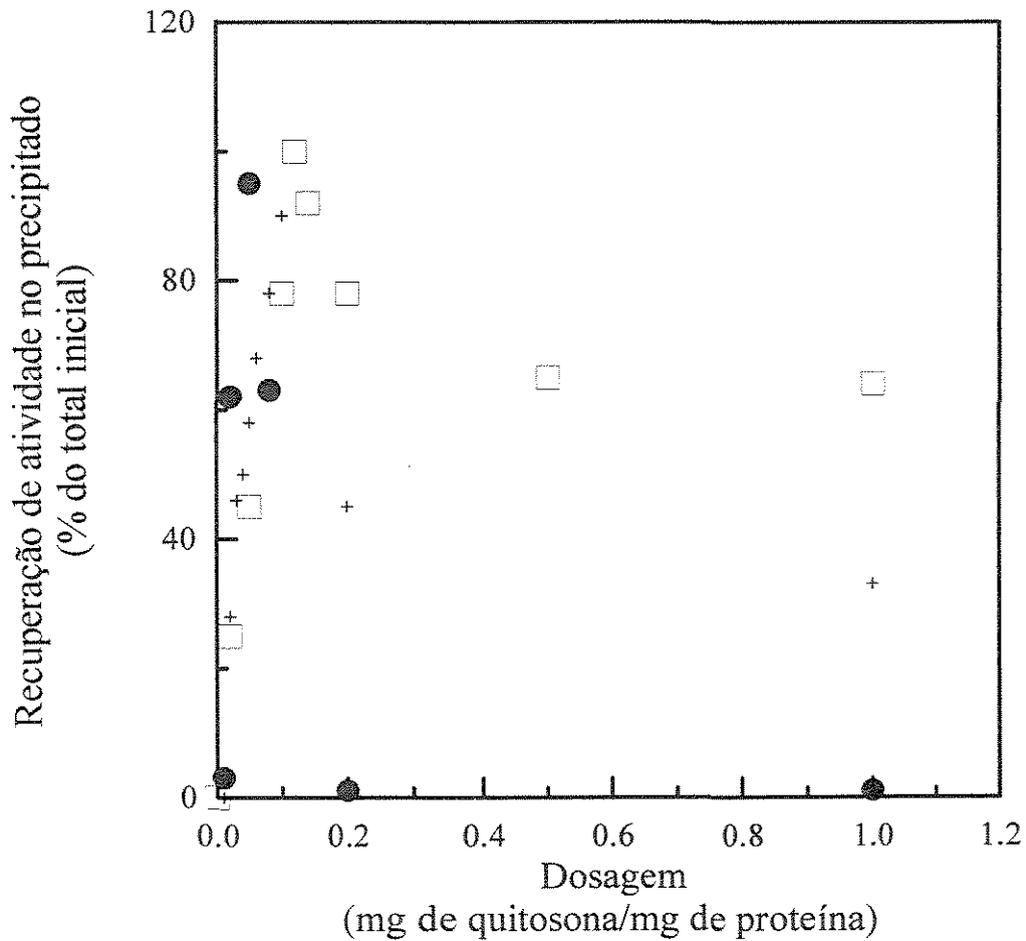
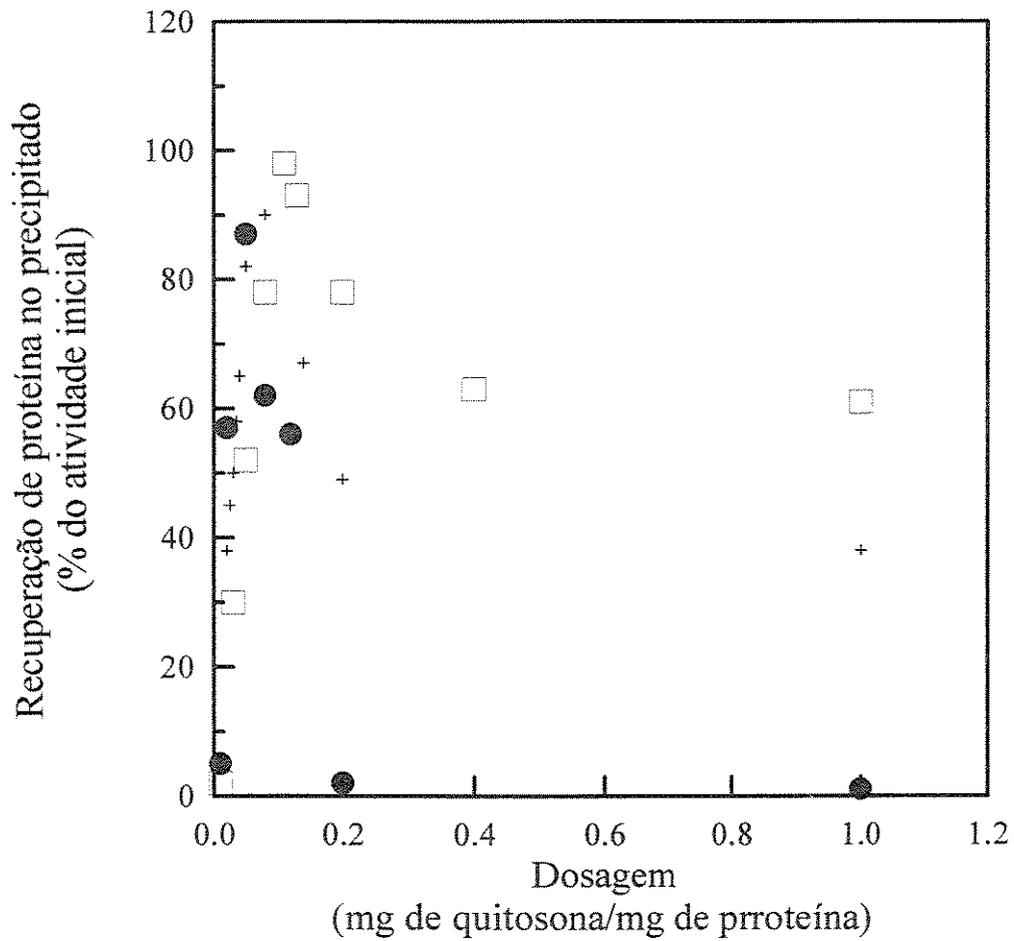


Figura 5.7 - Recuperação de atividade através da precipitação de pepsina suína com quitosona em tampão acetato de sódio a 50 mM a diferentes valores de pH(● pH 3,4; + pH 4,2 e □ pH 5,0).



- Figura 5.8 - Precipitação de pepsina suína com quitosona em tampão acetado de sódio 50 mM a diferentes valores de pH (● pH 3,4; + pH 4,2 e □ pH 5,0).

- para pH 4,2 : a dosagem de 0,08 mg de quitosona por miligrama de pepsina obteve-se uma recuperação de 95 % da atividade e 88,5 % de proteína.

Para pH 5,0 : a dosagem de 0,11 mg de quitosona por miligrama de pepsina obteve-se uma recuperação de 100 % da atividade e 97,2 % de proteína.

Essa variação inversamente proporcional do pH com a dosagem na faixa de pH de 3,4 a 5,0 pode ser explicada pelo fato de que próximo ao pI da pepsina (pI igual a 1,0) uma maior quantidade de proteína é necessário para neutralizar menores quantidades de quitosona (já que a sua carga negativa líquida próximo a esse ponto é pequena).

A medida que se aproxima do pKa do quitosona (pKa igual a 6,2) a carga negativa líquida da proteína aumenta, mas a carga desse polieletrólito diminui.

Na condição ótima de recuperação, ou seja, em dosagens próxima de 0,1 g de quitosona por grama de pepsina e de pH 5,0 a recuperação de atividade no precipitado foi praticamente total. A atividade específica da pepsina se situou em torno de valores de 13 U por miligrama de proteína para as condições ótimas de precipitação. A dosagem de 1 g de quitosona por grama de pepsina, os valores máximos de recuperação são bastantes reduzidos, chegando a 60 % para pH 5,0; 40% para pH 4,2 e praticamente a zero para pH 3,0.

5.4 - Precipitação de pepsina e BSA com quitosona

As Figuras 5.9 e 5.10 mostram os resultados da precipitação de proteína através do uso do quitosona como polieletrólito.

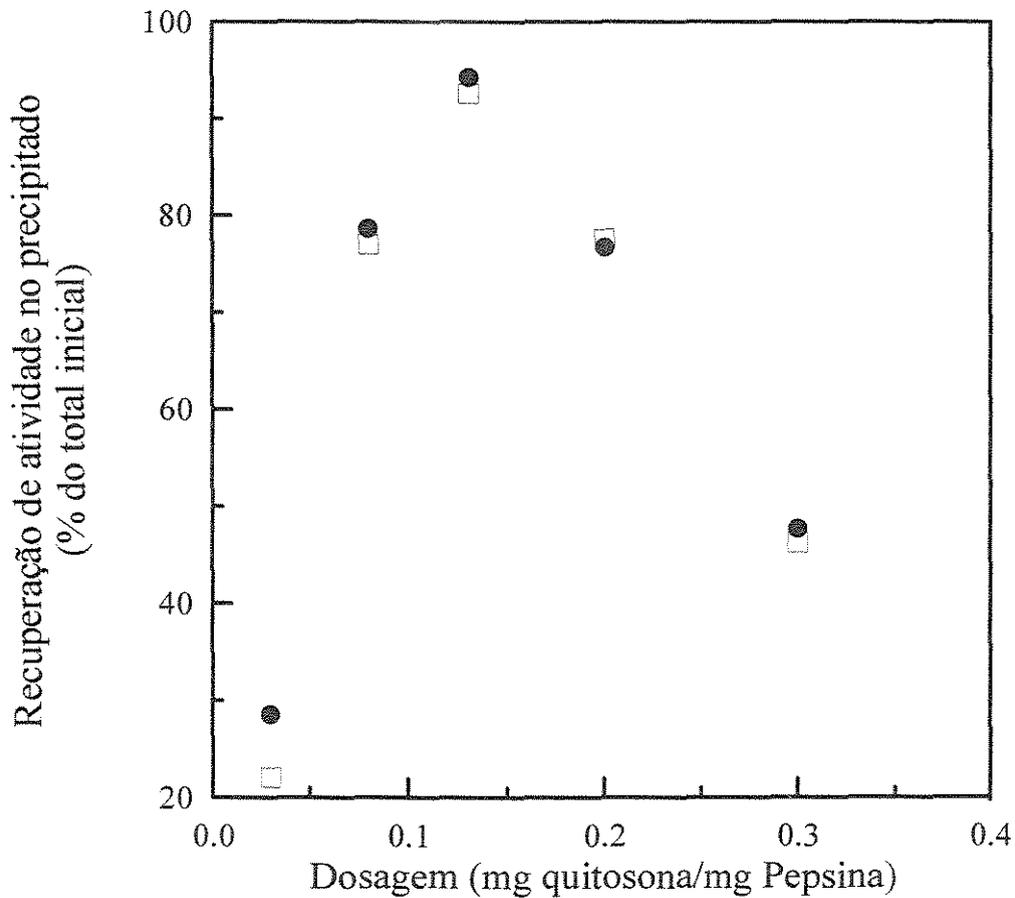


Figura 5.9. - Recuperação de atividade da pepsina no precipitado realizados nos testes de precipitação de uma mistura binária pepsina-BSA (□ razão mássica igual a 1 mg de BSA por miligrama de pepsina e ● razão mássica de 2,0 mg de BSA por miligrama de pepsina) através do uso de quitosona como agente precipitante em tampão acetato 50 mM pH 5,0 a diferentes dosagens.

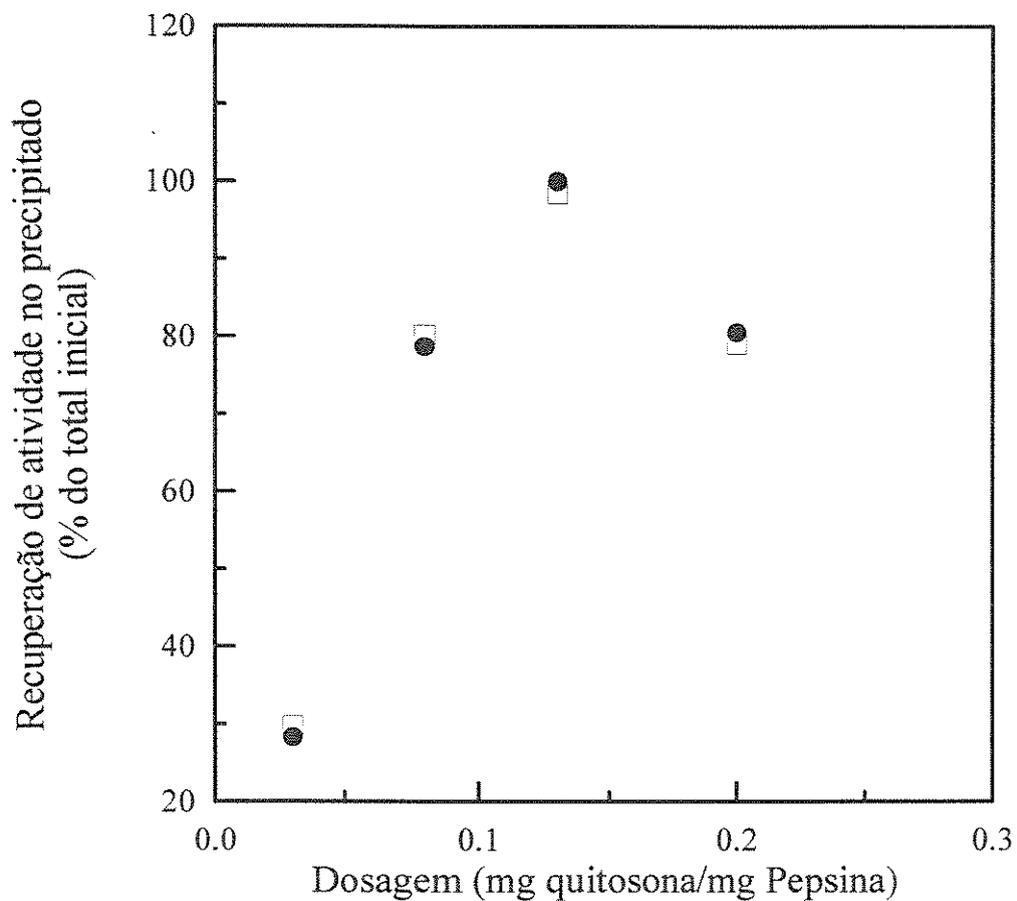


Figura 5.10. - Recuperação de pepsina no precipitado em testes de precipitação de mistura binária pepsina-BSA (□ Razão mássica de 0,5 mg de BSA por miligrama de pepsina e ● pepsina pura) através do uso de quitosona em tampão acetato 50 mM pH 5,0 a diferentes dosagens.

As melhores recuperações de pepsina em uma mistura binária (pepsina e albumina de soro bovina) através da quitosona em Tampão acetato 50 mM à pH 5,0 ocorreram a uma dosagem de 0,13 mg de quitosona por miligrama de pepsina, onde foram realizados experimentos utilizando pepsina pura e três razões mássica (0,5; 1,0 e 2,0 mg de BSA por miligrama de pepsina). Com pepsina pura e razão mássica igual a 0,5 foram possíveis recuperarem 100 % de atividade no precipitado. Com razões mássicas 1 e 2 foram possíveis recuperarem 95 % de atividade no precipitado conforme mostram as Figuras 5.9 e 5.10.

A escolha de pH 5,0 para a recuperação de pepsina na mistura binária acima, se deve ao fato de terem sido selecionado três pHs (3,4; 4,2 e 5,0) para recuperação de pepsina pura com quitosona e que em ambos pHs houve uma boa recuperação, no entanto em se tratando de mistura de pepsina com outras proteínas a pH menor que 5,0, as proteínas sofrem hidrólise e essa hidrólise é máxima se o pH for igual 2,0 e a temperatura igual a 37 °C que são as condições de temperatura e pH onde a pepsina possui atividade máxima e onde ela atua normalmente no seu ambiente natural (estômagos de mamíferos). Também foram feitos alguns testes exploratórios e notou-se que nos pH 3,4 e 4,2 havia uma precipitação devido a interação eletrostática entre pepsina (pI 1,0) e BSA (pI 4,9) mas logo em seguida esse precipitado dissolvia-se em função da pepsina digerir proteína em ambiente bem ácido.

A pH 5,0 não houve precipitação considerável de BSA juntamente com a pepsina o que proporcionou uma boa separação da pepsina do BSA, haja vista que o BSA estava muito próximo ao seu ponto isoelétrico.

A Tabela 5.1 mostra os valores dos fatores de separação e purificação das dosagens (mg de quitosona por miligrama de pepsina) 0,08; 0,13 e 0,2. A dosagem 0,13 e razão mássica igual 2 100 % da atividade é recuperada no precipitado no entanto o fator de separação é de 11,11. O melhor resultado de precipitação seletiva se deu com uma dosagem de 0,2 e razão mássica igual 0,5 cujo recuperação de pepsina foi de 72,07 % e o fator de separação foi de 360.

5.5 - Precipitação de proteína com sulfato de amônio e co-precipitantes

Visando a flotação de partículas, tentou-se precipitar proteínas (BSA e pepsina) usando quitosona como co-precipitante e sulfato de amônio. Inicialmente foi feito um estudo entre o percentual de quitosona precipitado em relação ao percentual de saturação de sulfato de amônio e observou-se que com apenas 4 % de saturação de sulfato de amônio todo quitosona precipitava-se como mostra a Figura 5. 11. Dentro dessa faixa de saturação não houve recuperação de proteína no precipitado formado.

Com a finalidade de se recuperar enzima utilizando menos quantidade de sulfato de amônio, utilizou-se co-precipitante hidroxipropilmetil celulose (HPMC) pois a valores superiores a 45% de saturação com sulfato de amônio haveria uma queda brusca de flotabilidade mesmo até para os precipitados formados com HPMC, haja vista que com esse valor de saturação a flotabilidade do HPMC cai bruscamente (Miranda, 1993). Nesses teste de precipitação utilizou-se um complexo de celulase de origem da *Trichoderma reesie* pois o mesmo tem uma pequena afinidade por éteres de celulose. Esse complexo é composto de vários componentes de

Tabela 5.1 - Precipitação da mistura binária (pepsina e BSA) com quitosona a pH 5,0.

Dosagem <u>mg quitosona</u> mg pepsina	Razão mássica <u>mg BSA</u> mg pepsina	% BSA	% Pepsina	Fator de separação	Fator de purificação
0,08	0,5	2,81	81,30	28,93	28,93
	1,0	2,67	77,20	28,91	28,91
	2,0	2,92	78,50	26,89	26,89
0,13	0,5	6,20	95,00	15,32	15,52
	1,0	7,50	98,00	13,07	13,07
	2,0	9,00	100,00	11,11	11,11
0,20	0,5	0,20	72,07	360,00	360,00
	1,0	10,91	82,23	7,54	7,54
	2,0	10,13	83,49	8,24	8,24

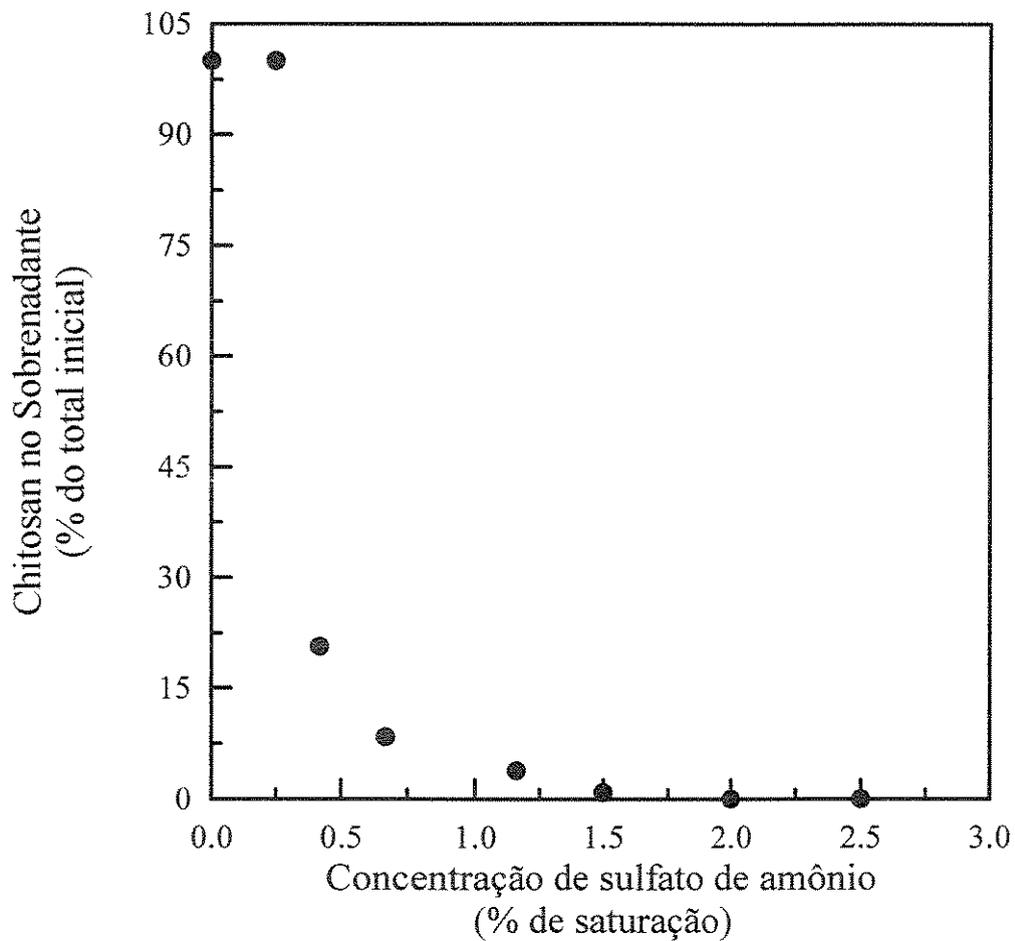


Figura 5. 11. - Precipitação de quitosona com sulfato de amônio. Fração solúvel do quitosona que permanece em solução. A concentração foi determinada pela quantidade de quitosona que permaneceu em solução medida e comparada com a concentração original.

enzima, incluindo endo- β ,1-4 glicanase; β ,1-4 glican glicohidrolase; β ,1-4 glicana celobiohidrolase e β -glicosidase. Os resultados desses experimentos foram divididos em duas etapas. Na primeira etapa constam os resultados de um estudo preliminar onde foram estudadas as variáveis razão mássica, concentração de sulfato de amônio sobre a precipitação e mantendo-se o tempo de envelhecimento, temperatura de incubação, concentração de celulase e pH constantes. Na segunda etapa foi efetuado um planejamento estatístico experimental onde foram estudados as variáveis temperatura de incubação, tempo de envelhecimento, agitação do shaker e velocidade da solução de sulfato de amônio com 80 % de saturação; manteve-se constantes as variáveis na primeira etapa.

5.5.1. Resultados dos experimentos preliminares.

A recuperação de celulase através da precipitação com HPMC e sulfato de amônio depende entre outros de dois fatores bastantes conhecidos em testes de precipitação, razão mássica e concentração de sulfato de amônio. Os primeiros testes de precipitação de celulase e HPMC com sulfato de amônio foram feitos a uma concentração de sulfato de amônio de 20 % da saturação, pois a partir dessa concentração quase todo HPMC está no precipitado (Miranda e Berglund, 1993). Em testes exploratório de precipitação de celulase sem HPMC observou-se que com essa concentração de sulfato de amônio não houve formação de precipitado.

A Figura 5.12 mostra que a 40% de saturação de sulfato de amônio, razão mássica de 1 mg de HPMC por miligrama de celulase, pH 5,0, tempo de envelhecimento de 1 hora e concentração de celulase de 1 mg/ml a recuperação de atividade de celulase por precipitação com sulfato de amônio

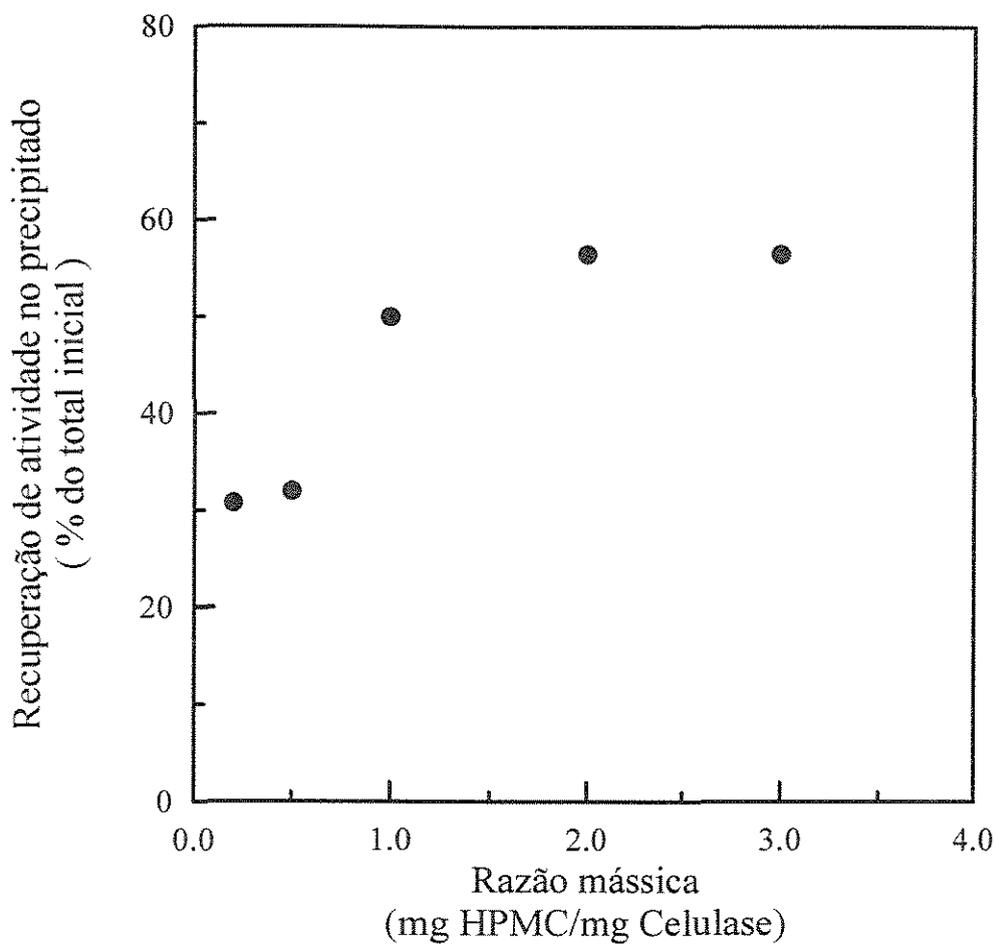


Figura 5.12 - Precipitação de celulase e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) com sulfato de amônio 40 % saturado a várias razões mássicas em tampão acetato pH 5,0.

e HPMC é de 50%. A uma razão mássica de 2 mg de HPMC por miligrama de celulase a recuperação de atividade é de 60%.

Com a finalidade de se estudar a influência da concentração de HPMC na precipitação da celulase foram realizados teste de precipitação de celulase e HPMC com sulfato de amônio com 40% de saturação, razão mássica igual a 1 a pH igual a 5,0.

Com a finalidade de se estudar a influência da concentração de sulfato de amônio e do HPMC na recuperação da atividade da celulase, usou-se a razão mássica igual a 1, pois esse valor foi possível observar melhor o comportamento da influência da concentração do sal.

A Figura 5.13 mostra que com 40% de saturação de sulfato de amônio a presença de HPMC em uma solução de celulase a pH igual a 5,0 faz com que a recuperação de celulase no precipitado passe de aproximadamente zero para 55% e que para recuperar essa mesma quantidade de celulase por precipitação de HPMC é necessário cerca de 55% de saturação de sulfato de amônio. Esse aumento na recuperação da celulase no precipitado é devido, possivelmente, a uma afinidade da proteína pelo polímero e interação hidrofóbica entre celulase e o HPMC. A Figura 5.13 também mostra que com 60 % de saturação a influência desse éter de celulose é menor do que a uma saturação de 70%.

A Figura 5.14 mostra que o comportamento da recuperação da proteína é semelhante ao da recuperação da atividade, no entanto, os valores de recuperação de proteínas superiores aos da atividades pode ser devido a impureza que precipitam juntamente com a celulase causando um aumento na absorvância haja vista que o método Bradford determina a quantidade total de proteína. Com base nesses resultados resolveu-se então escolher a

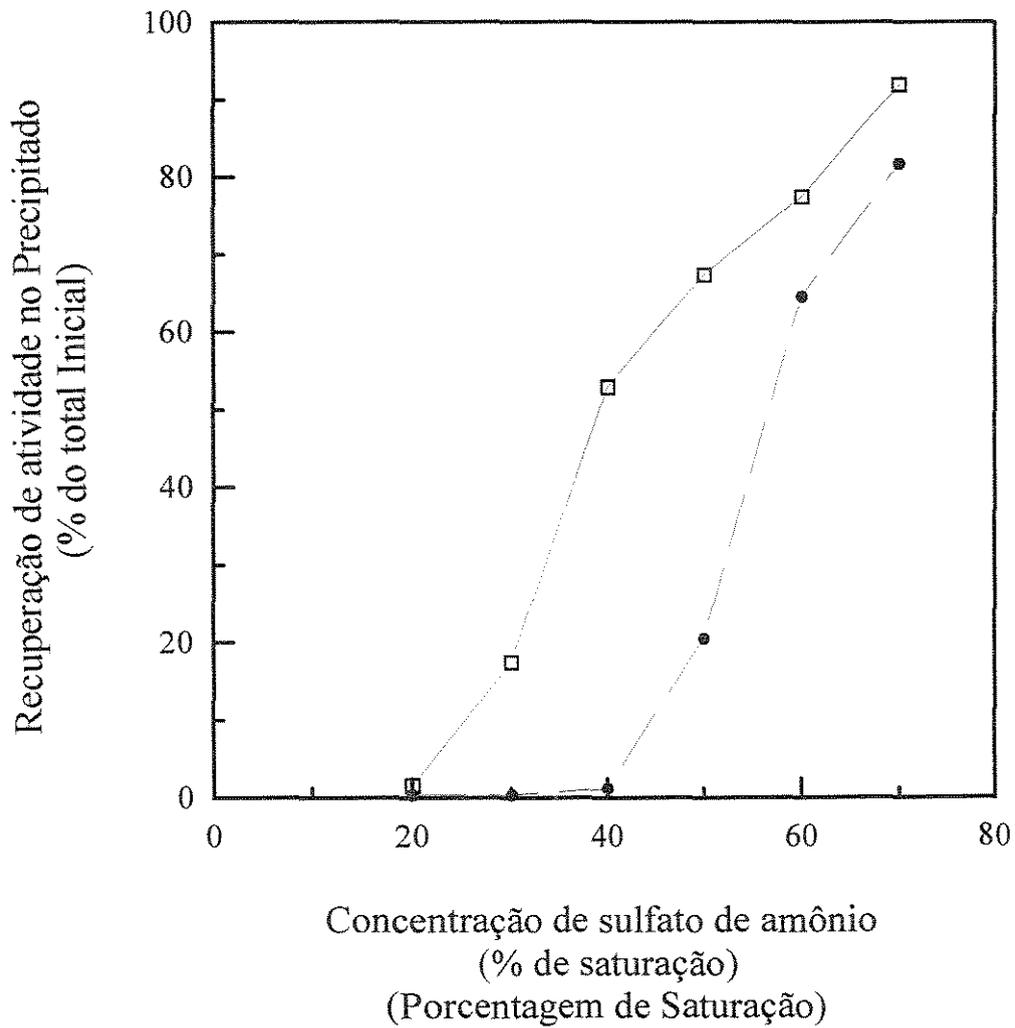


Figura 5.13 - Recuperação de atividade através da precipitação de celulase (□ com HPMC e ● sem polímero) com solução de sulfato de amônio a diferentes porcentagens de saturação; razão mássica (mg HPMC/mg Celulase) igual a 1. Tampão acetato 50 mM à pH 5,0.

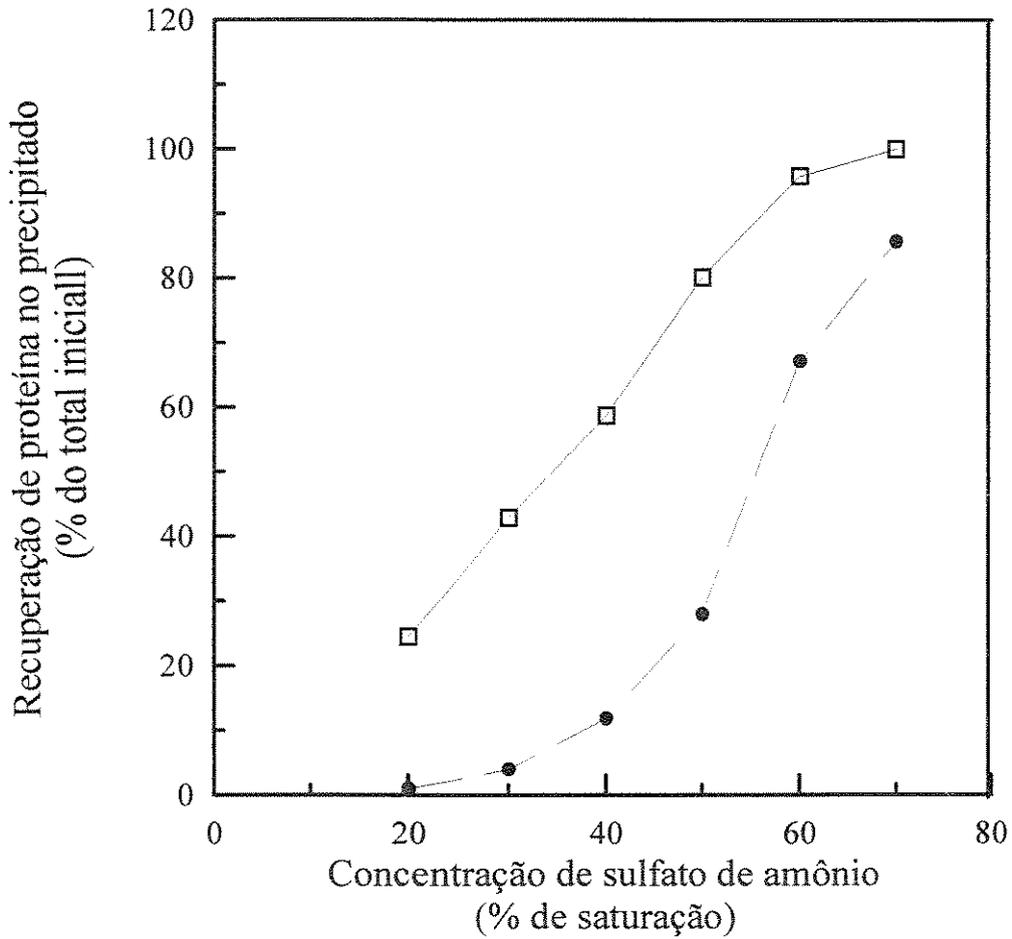


Figura 5.14 - Precipitação de celulase (□ com HPMC e ● sem polímero) com solução de sulfato de amônio a diferentes porcentagens de saturação; razão mássica (mg HPMC/mg Celulase) igual a 1. Tampão acetato 50 mM à pH 5,0.

razão mássica igual a 1 mg de HPMC por miligrama de celulase e concentração de sulfato de amônio com 40% de saturação como parâmetros fixos para a otimização dos testes de precipitação da celulase.

A Figura 5.14 também mostra que os valores de recuperação de proteína e atividade enzimática a 20 e 30 % de saturação são bastante diferentes dos demais valores, isso ocorre devido a seqüência de precipitação das proteínas no complexo celulásico ou seja as proteínas que precipitam primeiro têm menor atividade do que as que precipitam por último.

5.5.2 - Análise dos resultados do planejamento estatístico experimental

O planejamento estatístico experimental utilizado neste estudo foi o planejamento fatorial 2^4 . As variáveis usadas foram temperatura de incubação, tempo de envelhecimento, agitação e velocidade de adição da solução de sulfato de amônio com 80% de saturação. Essas variáveis foram escolhidas em função da sua influência em alguns trabalhos de precipitação, como por exemplo, precipitação com polieletrólito (Berg, 1992) e tendo como respostas as recuperações de atividade e de proteína nos precipitados. Como foram efetuados uma análise baseada em regressão linear foram utilizados cinco níveis a seguir -2, -1, 0 +1, e +2, sendo que o valor absoluto dos dois níveis extremos foi calculado a partir da raiz quadrada do número de variáveis. Cada intervalo da variável foi calculado a partir dos valores médios das variáveis entre os níveis -1 e +1, sendo que o intervalo entre o ponto centra e o nível -1 foi utilizados para dois níveis consecutivos. O intervalo de temperatura é justificado pela instabilidade térmica da proteína e pela solubilidade do HPMC, o intervalo da agitação do sheker

pela quebra dos flocos formados, o intervalo de adição de sal pela capacidade da bomba doadora que permitia uma adição de até de 30 ml/min.

Foram efetuados também cinco ensaios no ponto central e mais oitos ensaios utilizando o planejamento estrela. Os 16 ensaios do planejamento fatorial mais os 8 do planejamento estrela foram efetuados em triplicatas. Utilizou-se o modelo matemático da regressão quadrática para analisar as respostas.

5.5.2.1. Massa protéica

As Tabelas 5.2 e 5.4 mostram as médias da triplicatas dos resultados da recuperação de massa protéica e atividade enzimática nos ensaios de precipitação de celulase com HPMC e sulfato de amônio segundo o planejamento estatístico. As Tabela 5.3 e 5.5 mostram os dados referente a análise estatística. Os resultados de percentagens de recuperação estimada, resíduos e de análise estatística foram obtidos pelo programa modereg. Os resultados do planejamento estatístico experimental foram analisado pelo programa statistic, cujos valores dos fatores, regressão linear e erro padrão são dados na Tabela 5.6.

Os dados estatísticos referente a proteína mostrado na Tabela 5.3 apresentou uma percentagem de variância explicada de 82,55 e o teste F (definido como sendo a razão entre a média quadrática de regressão e a média quadrática do resíduo) igual a 4,73 enquanto que os dados referentes a atividade no precipitado mostrado na Tabela 5.5 apresentou apenas uma percentagem de variável explicada de 55,477 e um fator F igual a 1,25.

Tabela 5.2 - Resultados da modelagem de precipitação celulase (variável de resposta: porcentagem de recuperação da proteína total).

Ensaio	Recuperação observada (%)	Recuperação prevista (%)	Resíduo
1	54,30	54,20	0,93
2	56,98	56,56	0,42
3	60,33	62,90	-2,57
4	64,57	61,56	3,01
5	55,85	56,76	-0,91
6	58,08	59,87	-1,78
7	60,05	61,73	-1,68
8	60,72	61,14	-0,42
9	49,24	49,84	-0,60
10	57,43	56,76	0,67
11	53,52	52,74	0,77
12	55,86	55,97	-0,11
13	52,27	56,28	-4,02
14	65,50	63,95	1,55
15	54,03	55,47	-1,44
16	58,34	59,44	-1,10
17	56,82	56,34	0,48
18	56,14	56,34	-0,20
19	56,71	56,34	0,36
20	55,98	56,34	-0,36
21	56,07	56,34	-0,27
22	55,26	51,10	4,16

Tabela 5.2 - continuação

Ensaio	Recuperação observada (%)*	Recuperação prevista (%)*	Resíduo
23	55,31	57,43	-2,12
24	57,79	56,51	1,28
25	61,45	60,69	0,75
26	59,22	61,08	-1,86
27	70,99	67,10	3,89
28	58,28	57,37	0,91
29	52,42	51,30	1,12

* Porcentagem do total inicial.

Tabela 5.3 - Análise da variância dos teste de precipitação (variável de resposta: proteína total).

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	teste F
Regressão	431,99	14	30,86	4,73
Resíduos	91,30	14	6,52	
Falta de ajuste	90,69	10	9,06	
Erro puro	0,61	4	0,15	59,50
Total	523,30	28		

Porcentagem de variância explicada = 82,55

Porcentagem máxima de variância explicável = 99,88

Tabela 5.4 - Resultados da modelagem de precipitação de celulase (variável de resposta: porcentagem de recuperação da atividade total).

Ensaio	Recuperação observada*	Recuperação prevista*	Resíduo
1	58,85	59,51	-0,66
2	54,83	61,10	-6,28
3	74,89	76,48	-1,59
4	75,73	73,08	2,65
5	62,53	61,45	1,08
6	55,92	63,03	-7,11
7	66,58	71,63	-5,05
8	68,00	68,22	-0,22
9	53,79	58,66	-4,87
10	67,48	64,72	2,76
11	69,35	64,53	4,82
12	59,41	65,59	-6,17
13	63,11	68,05	-4,94
14	70,58	74,09	-3,51
15	68,31	67,13	1,18
16	66,55	68,18	-1,63
17	64,64	68,19	-3,55
18	70,35	68,19	2,16
19	71,06	68,19	2,87
20	65,84	68,19	-2,35
21	69,04	68,19	0,86
22	63,5000	62,1746	1,32542

Tabela 5.4 - Continuação

Ensaio	Recuperação observada*	Recuperação prevista*	Resíduo
23	70,88	64,82	6,06
24	72,48	64,40	8,07
25	74,77	75,46	-0,69
26	68,21	67,23	0,97
27	78,18	71,77	6,41
28	68,79	63,89	4,90
29	65,48	62,99	2,49

* Porcentagem do total inicial.

Tabela 5.5 - Análise da variância dos teste de precipitação (variável de resposta: atividade total).

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	teste F
Regressão	583,95	14	41,71	1,24
Resíduos	486,65	14	33,47	
Falta de ajuste	436,90	10	43,69	
Erro puro	31,74	4	7,94	5,50
Total	1052,60	28		

Porcentagem de variância explicada = 55,48

Porcentagem máxima de variância explicável = 96,98

Tabela 5.6 - Coeficientes de regressão e desvios padrão da recuperação de celulase.

Fatores	Coeficiente de regressão	Erro padrão
Média/interação	56,34*	1,14*
(1) F_1 (L)	1,58*	0,52*
F_1 (Q)	-0,52	0,50
(2) F_2 (L)	1,05	0,52
F_2 (Q)	0,56	0,50
(3) F_3 (L)	1,50*	0,52*
F_3 (Q)	1,94*	0,50*
(4) F_4 (L)	-1,51*	0,52*
F_4 (Q)	-0,50	0,50
1L com 2L	-0,92	0,64
1L com 3L	0,19	0,64
1L com 4L	1,14	0,64
2L com 3L	-0,93	0,64
2L com 4L	-1,45	0,64
3L com 4L	0,97	0,64

* Valores mais significativos.

Com bases nos dados das Tabelas 5.3 e 5.5 efetuou-se a otimização da precipitação da celulase pelos dados referente a recuperação das proteínas nos precipitados referente a Tabela 5.3, pois os valores de porcentagem de variância dos dados de atividade nos precipitados é baixo, isso implica em resultados experimentais muito diferentes dos estimados.

5.5.2.2 - Otimização de recuperação de atividade e massa protéica

Os experimentos feitos para a obtenção da otimização da precipitação da celulase visando a sua separação da solução através de flotação foram feitos em triplicatas com exceção do ponto central que foi realizado em quintuplicata.

A otimização do processo de recuperação de atividade e massa protéica da celulase nos testes de precipitação com HPMC e sulfato de amônio foi realizada através das análises das Figuras 5.15 a 5.18, e da superfície de resposta mostrada na Figura 5.19.

As Figuras de 5.15 a 5.18 mostram as tendências das variáveis com relação ao ponto central e a Figura 5.19 mostra a tendência de recuperação na superfície de resposta.

A Figura 5.15 mostra que a recuperação de atividade é influenciada positivamente com o aumento de temperatura; o envelhecimento mostrado na Figura 5.16 mostra uma menor recuperação de proteína e atividade no ponto central; já no caso da adição de sal, quanto maior a vazão da solução de sulfato de amônio melhor é a recuperação de atividade como pode ser visto na Figura 5.17.

A Figura 5.18 indica que o aumento de agitação na faixa estudada diminui tanto a recuperação de atividade como da proteína.

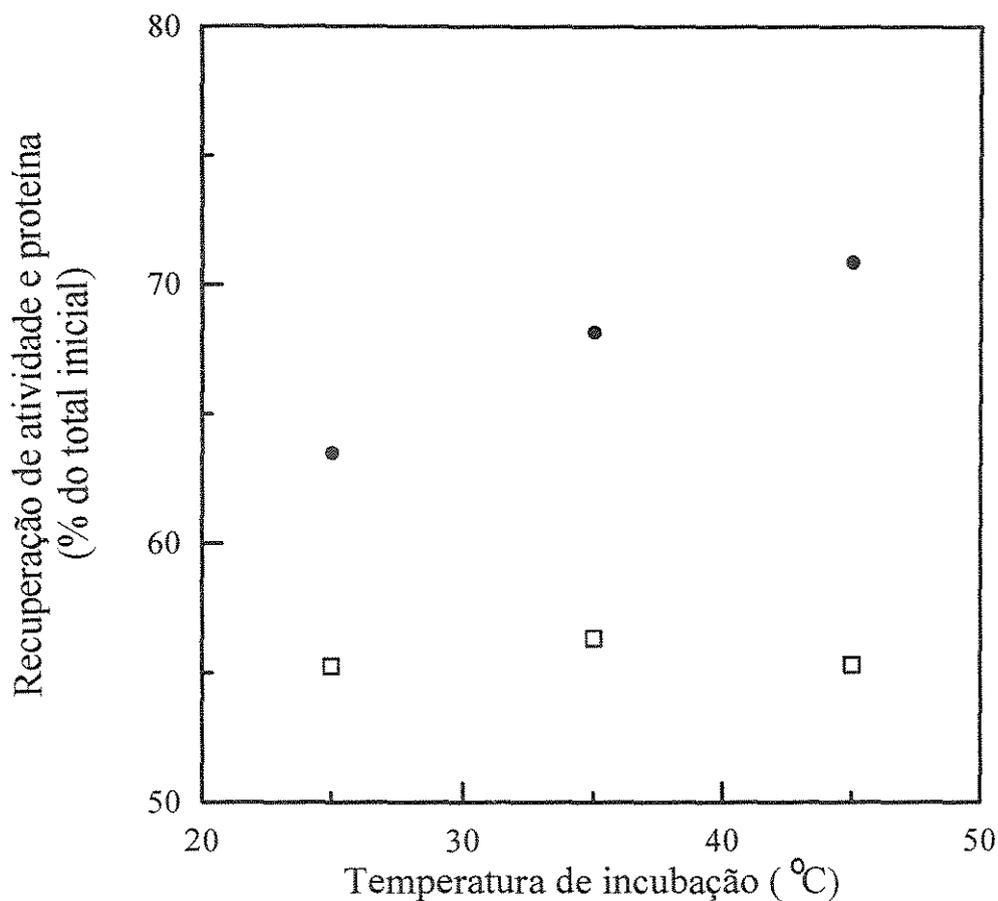


Figura 5.15 - Influência da temperatura na recuperação da atividade (●) e proteína (□) no precipitado na proximidade do ponto central. Vazão da adição de solução de sulfato de amônio 80 % de saturação igual a 15,1 ml/minuto; frequência de agitação do shaker igual a 165 rpm e tempo de envelhecimento de 11 horas.

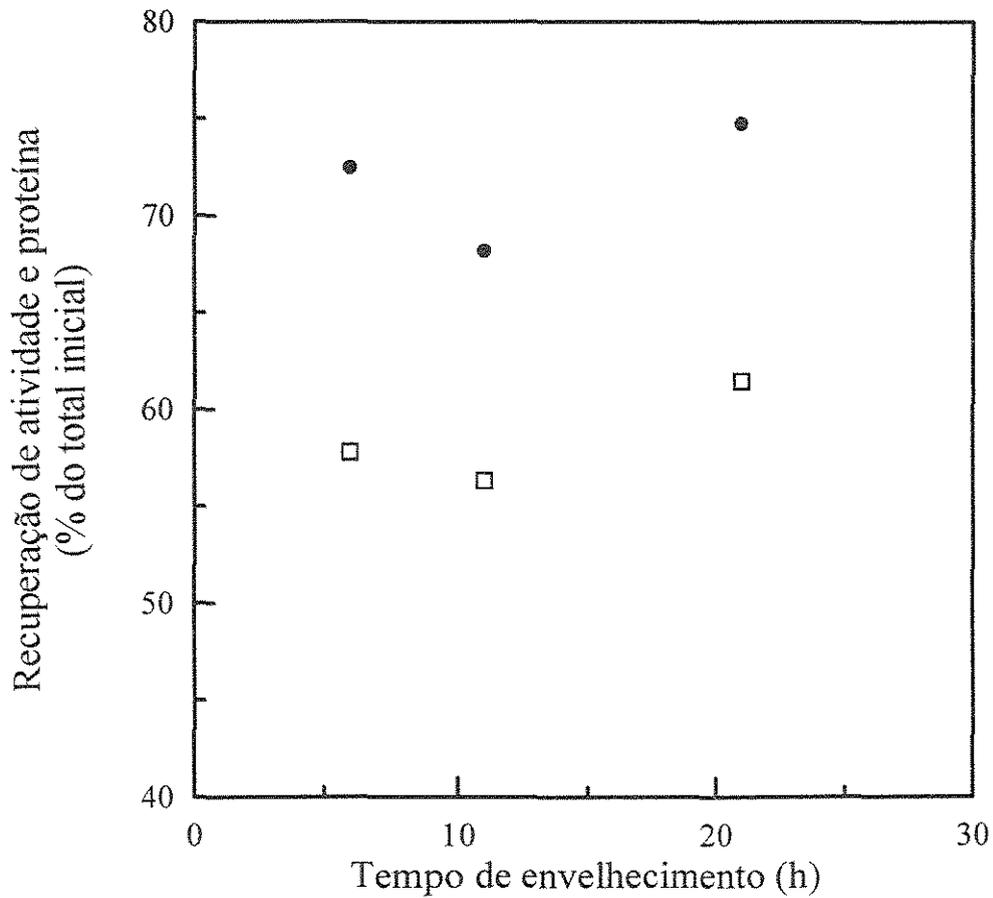


Figura 5.16 - Influência do envelhecimento na recuperação da atividade (●) e proteína (□) no precipitado na proximidade do ponto central. Vazão da adição de solução de sulfato de amônio 80 % de saturação igual a 15,1 ml/minuto; frequência de agitação do shaker igual a 165 rpm e temperatura de incubação de 35 °C.

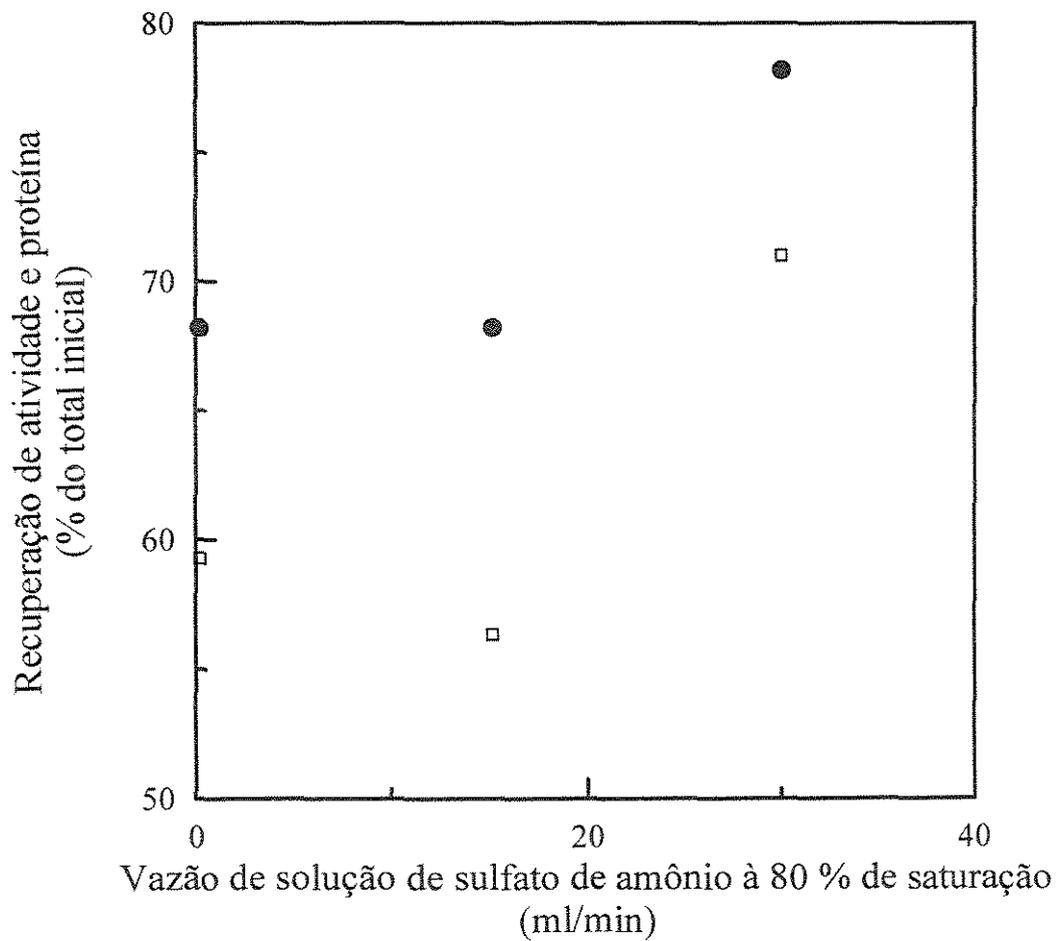


Figura 5.17 - Influência da vazão adição da solução de sulfato de amônio 80 % saturada na recuperação da atividade (●) e proteína (□) no precipitado na proximidade do ponto central. Tempo de envelhecimento igual a 11 horas; frequência de agitação do shaker igual a 165 rpm e temperatura de incubação de 35 °C.

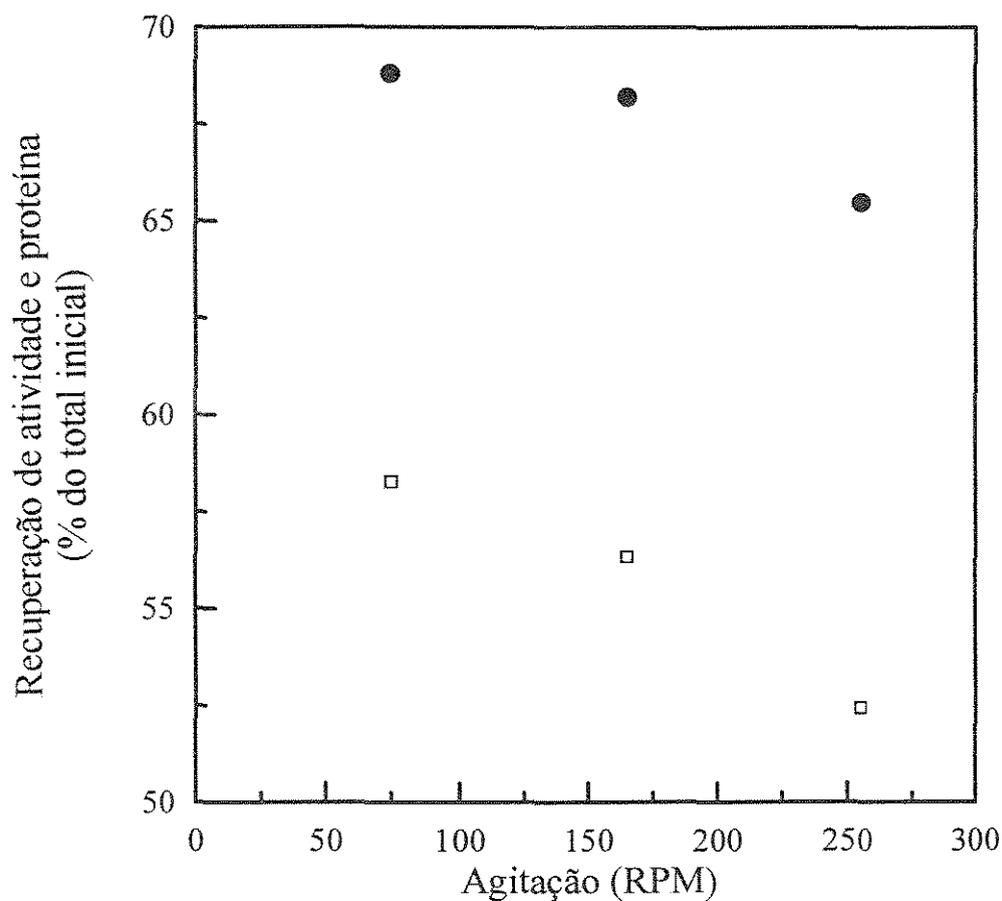


Figura 5.18 - Influência da agitação do shaker na recuperação da atividade (●) e proteína (□) no precipitado na proximidade do ponto central. Vazão da adição de solução de sulfato de amônio 80 % de saturação igual a 15,1 ml/minuto; tempo de envelhecimento igual a 11 horas e temperatura de incubação de 35 °C.

São as seguintes tendências mostradas pela análise de superfície de resposta mostradas na Figura 5.19 para a recuperação de proteínas:

- a) Altas temperaturas são melhores para baixos tempo de envelhecimento, enquanto que para altos tempos de envelhecimento, a temperatura parece influenciar pouco.
- b) Conjugada a qualquer das demais variáveis, a vazão de adição de sal intermediária tende a diminuir a recuperação. Uma maior recuperação é obtida através de uma alta vazão de adição de sal.

Em resumo, a resposta é maximizada quando utiliza-se: altas temperaturas, altas vazões de adição de sal, menores velocidades de agitação (principalmente em altos tempos de envelhecimento) e baixos tempos de envelhecimento.

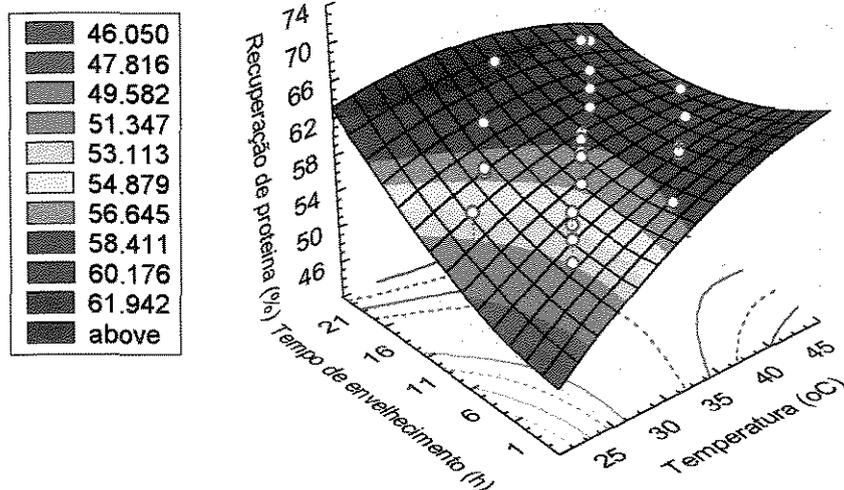
Os valores codificados para as variáveis temperatura (x_1) de incubação igual a 30 °C, envelhecimento (x_2) de 1 hora, vazão de adição de solução 80% saturada de sulfato de amônio sal (x_3) igual a 30 ml/min e frequência de agitação do shaker (x_4) de 120 rpm. são +1, -1, +2 e +1, respectivamente. Os valores -1 e +1 representam um valor codificado para o menor e maior nível respectivamente para cada variável no planejamento fatorial. O valor -2 e +2 representam os valores codificados extremos no planejamento estrela.

5.6 - Análise dos resultados experimentais e estimados com modelo quadrático.

Os programas modereg e statistic permitem obter os coeficientes de regressão do polinômio de segunda ordem a partir dos valores dos vinte e nove ensaios mostrado na Tabela 5.3.

Superfície de Resposta

Efeito da temperatura e tempo de envelhecimento sobre a recuperação de proteína no precipitado



Superfície de Resposta

Efeito da temperatura e vazão de adição de sal sobre a recuperação de proteína no precipitado

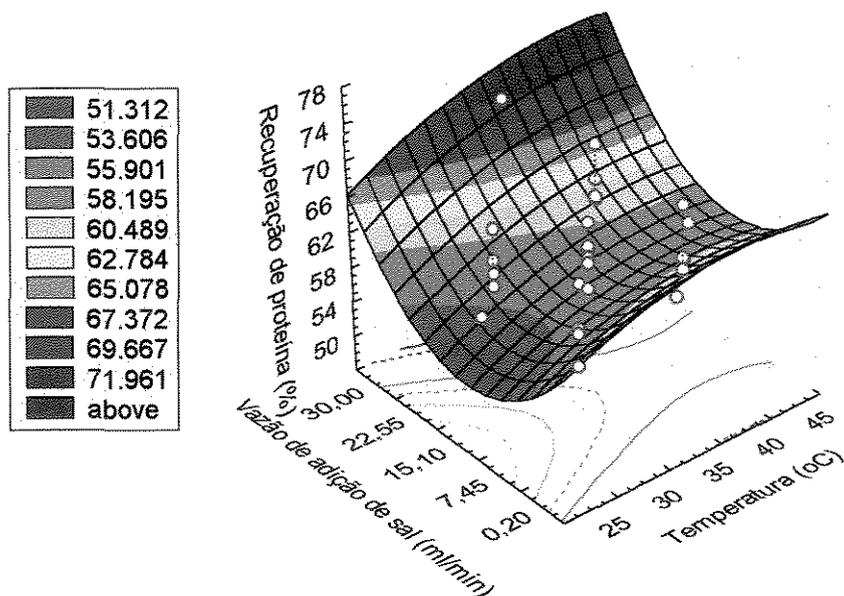


Figura 5.19 - Estudo do efeito da temperatura sobre a recuperação de proteína no precipitado através da superfície de resposta.

A modelagem dos experimentos é feita pela Equação 5.1 (modelo quadrático).

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i * x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} * x_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} * x_i * x_j \quad \text{Equação 5.1}$$

onde β_0 , β_i , β_{ij} são coeficientes de regressão e x_i e x_j são os valores codificados para cada variável. Para quatro variáveis a Equação 5.1 pode ser escrita como a seguir:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 * x_1 + \beta_2 * x_2 + \beta_3 * x_3 + \beta_4 * x_4 + \beta_{11} * (x_1)^2 + \beta_{22} * (x_2)^2 + \beta_{33} * (x_3)^2 + \beta_{44} * (x_4)^2 + \beta_{12} * x_1 * x_2 + \beta_{13} * x_1 * x_3 + \beta_{14} * x_1 * x_4 + \beta_{23} * x_2 * x_3 + \beta_{24} * x_2 * x_4 + \beta_{34} * x_3 * x_4 \quad \text{Equação 5.2}$$

onde os valores dos coeficientes (β_n) obtidos através dos programas modereg e statistic estão listados nas colunas I e II, respectivamente da Tabela 5.7. Os valores ótimos das variáveis estimados, ou seja x_1 igual a 30 °C, x_2 igual a 1 hora, x_3 igual a 30 ml/min e x_4 igual a 120 rpm, concentração de sulfato de amônio igual 40% saturação, razão mássica igual a 1 mg de HPMC por miligrama de celulase, concentração de celulase igual a 0,5 mg/ml e dos coeficientes de regressão (β) obtidos pelo uso dos software modereg.exe e statistic foram substituídos na equação de modelagem com a finalidade de comparar os resultados experimentais e matemático. Os dados experimentais propiciaram uma recuperação de 64,63% no ponto próximo de proteína no precipitado, os dados estimados pelos modelos matemático modereg e statistic forneceram uma recuperação de 66,31 e 69,43 %, respectivamente.

Tabela 5.7 - Coeficientes de regressão

Coluna I	Coluna II
$\beta_0 = 56,34$	$\beta_0 = 56,34$
$\beta_1 = 1,58$	$\beta_1 = 1,58$
$\beta_2 = 1,04$	$\beta_2 = 1,05$
$\beta_3 = 1,51$	$\beta_3 = 1,50$
$\beta_4 = -1,52$	$\beta_4 = -1,52$
$\beta_{11} = -0,52$	$\beta_{11} = -0,52$
$\beta_{22} = 0,57$	$\beta_{22} = 0,56$
$\beta_{33} = 1,94$	$\beta_{33} = 1,94$
$\beta_{44} = -0,50$	$\beta_{44} = -0,50$
$\beta_{12} = -0,92$	$\beta_{12} = -0,92$
$\beta_{13} = 0,19$	$\beta_{13} = 0,19$
$\beta_{14} = 1,14$	$\beta_{14} = 1,14$
$\beta_{23} = -0,93$	$\beta_{23} = -0,93$
$\beta_{24} = -1,45$	$\beta_{24} = -1,45$
$\beta_{34} = 0,97$	$\beta_{34} = 0,97$

Onde o numero 1 corresponde a variável temperatura, 2 a envelhecimento, 3 a vazão de adição da solução de sulfato de amônio com 80% de saturação e 4 a agitação do shaker.

O dado do resultado experimental mostra um desvio de 2,6% da recuperação real de proteína em relação ao estimado pelo software *modereg.exe* e de 7,4% em relação ao *statistic*. Nessas condições a recuperação de atividade no precipitado foi de 68%.

Embora o modelo matemático não tenha mostrado um bom fator de correlação, os valores experimentais foram compatíveis com os valores estimados mostrando que o modelo estatístico pode ser aplicado para planejar experimentos de recuperação de proteínas por precipitação.

5.7 - Resultados dos testes de precipitação utilizados na alimentação

As Figura 5.20 e 5.21 mostram as médias das duplicatas dos resultados dos experimentos de precipitação de celulase com HPMC a vários valores de pH (3,0; 3,5; 4,0 e 4,5) para serem realizados nos testes de flotação. Nesses experimentos os valores de utilizados são justificados pelo fato do pH influenciar na flotação dos precipitados formado na precipitação de celulase e HPMC com sulfato de amônio. A temperatura de 25 °C foi utilizada ao invés de 30 °C, por questões operacionais, haja vista que não foi possível a utilização dessa temperatura para conseguir uma solução de alimentação igual com um volume de 1 litro.

Esses experimentos foram realizados nas seguintes condições: vazão de adição da solução de sulfato de amônio com 80% de saturação igual a 100 ml/min, concentração final de celulase igual a 0,5 mg/ml, razão mássica igual a 1 mg de HPMC por miligrama de celulase, tempo de envelhecimento igual a 1 hora, agitação em pá mecânica à 50 rpm e temperatura de 25 °C e volume do reator (becker) igual a 1.000 ml.

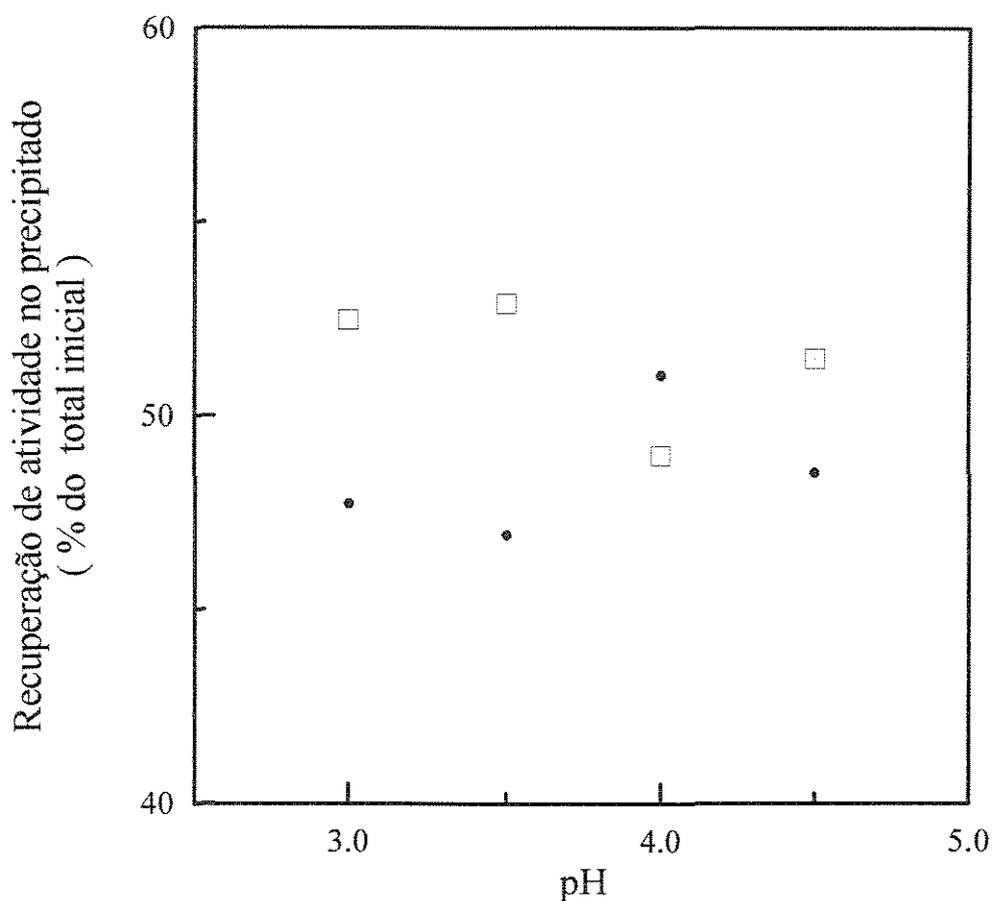


Figura 20 - Recuperação de atividade na precipitação de celulase com HPMC à vários pH para ser utilizado como alimentação nos experimentos de flotação (□ complexo formado por celulase-HPMC e ● sobrenadante). Vazão de adição da solução de sulfato de amônio a 80% de saturação igual a 100 ml/min; concentração final de celulase igual a 0,5 mg/ml; razão mássica igual a 1 mg de HPMC por miligrama de celulase; tempo de envelhecimento igual a 1 hora; agitação em pá mecânica à 50 rpm e temperatura de 25 °C.

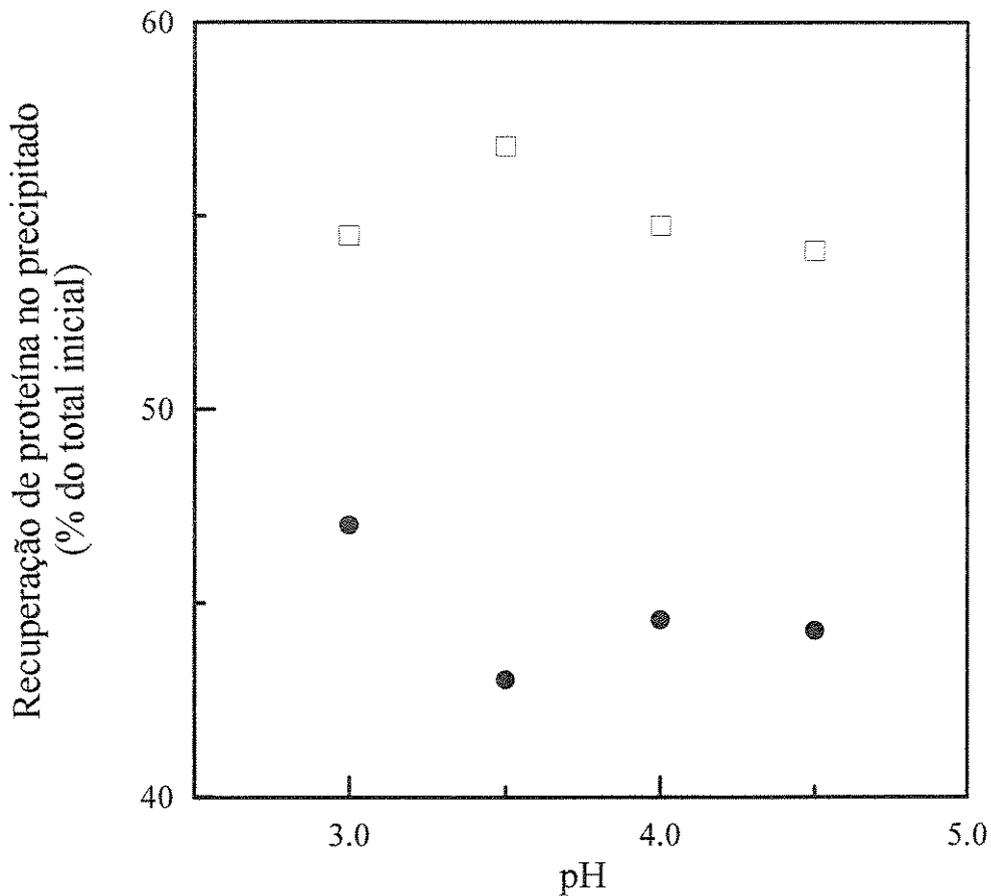


Figura 5.21 - Recuperação de proteína nos teste de precipitação de celulase com HPMC à vários pH para ser utilizado nos experimentos de flotação (□ complexo formado por celulase-HPMC, ● sobrenadante). Vazão de adição da solução de sulfato de amônio a 80 % de saturação igual a 100 ml/minuto; concentração final da celulase igual a 0,5 mg/ml; razão mássica igual a 1 mg de HPMC por miligrama de celulase; tempo de envelhecimento igual a 1 hora; agitação em pá mecânica à 50 rpm e temperatura de 25 °C.

Esses experimentos foram realizados nas seguintes condições: vazão de adição da solução de sulfato de amônio com 80% de saturação igual a 100 ml/min, concentração final de celulase igual a 0,5 mg/ml, razão mássica igual a 1 mg de HPMC por miligrama de celulase, tempo de envelhecimento igual a 1 hora, agitação em pá mecânica à 50 rpm e temperatura de 25 °C e volume do reator (becker) igual a 1.000 ml.

A Figura 5.20 mostra uma recuperação máxima de atividade de 53 % à pH 3,0; uma recuperação mínima de 49 % à pH 4,0 A Figura 5.20 também mostra que não há perda de atividade nesses teste, pois o balanço de atividade (soma de atividade no sobrenadante e precipitado) é de aproximadamente 100%.

A Figura 5.21 mostra uma recuperação máxima de proteína de 57 % e uma recuperação mínima de 54 % nas condições de pH de recuperação de atividade.

Os valores experimental e estimado para recuperação de proteína no precipitado pelo planejamento estatístico (64,63 % observado nos experimentos e 66,31 % e 69,43 % para os valores estimados através de modelo matemático), apresentaram resultados diferentes dos realizados nesses experimentos de precipitação, pois não foi possível manter as mesmas condições, já que nas condições estudadas no planejamento foram utilizada como recipiente de precipitação um erlenmeyer de 50 ml, como agitador um shaker com movimento circular a 120 rpm e temperatura de 30 °C.

5.8 - Resultados dos testes de flotação contínua da celulase

Os testes de flotação das partículas formadas pela precipitação de celulase e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) com sulfato de amônio foram realizados nas condições mostradas na Tabela 5.8.

A tabela 5.9 mostra que os balanços de atividade e proteína foram fechados em torno de 100 %, indicando que na flotação de partículas de celulase nessas condições à pH igual a 3,0 não houve perda de atividade enzimática.

As Figuras 5.22 e 5.23 mostram que a atividade e massa protéica no concentrado variaram com a mudança de pH e a melhor recuperação de atividade e proteína aconteceu no pH 3,0. A faixa de pH utilizada foi 3 até 4,5 pois a recuperação de atividade diminuiu com o aumento de pH, variando de 55 % a pH 3,0 para 27 % a pH 4,5. Na condição de pH 3,0 a atividade da enzima por ml no concentrador foi cinco vezes superior a da alimentação e apenas 3,7 % da atividade estava no rejeito. A figura 5.22 mostra também que houve um aumento de 53 para 55% na recuperação de atividade do complexo sólido formado por celulase e HPMC. A Figura 5.23 mostra que a recuperação máxima de proteína é de 52% à pH 3,5 e que nas condições de melhor recuperação de atividade (pH 3,0) a recuperação é de 50%, ou seja a pH 3,0 além de apresentar a melhor recuperação de atividade também apresenta a celulase com uma melhor atividade específica. Isso é explicado pelo fato de a presença de algumas proteínas contaminantes não serem adsorvidas às bolhas de ar nesse pH.

As Figuras 5.24 e 5.25 mostram que existem celulase tanto no complexo sólido formado por celulase-HPMC quanto dissolvida no sobrenadante do rejeito e que a pH 3,0 estão presentes as menores quantidades de atividade e

Tabela 5.8 - Condições dos testes de flotação dos complexos celulase-HPMC.

Variáveis	Valor
Concentração de sulfato de amônio *	40,0
Razão mássica (mg de HPMC/mg de Celulase)	1,0
Tempo de envelhecimento (h)	1,0
Vazão do gás (ml/min.)	16,2
Concentração de celulase (mg/ml)	0,5
Temperatura (°C)	25,0
Capacidade do reator (ml)	1000,0
Vazão de alimentação (ml/min)	8,4
Vazão do rejeito (ml/min)	6,0
Vazão do concentrado (ml/min)	2,0

* em porcentagem de saturação

Tabela 5.9 - Resultados da flotação contínua à pH 3,0.

Balança total								
Atividade								
Alimentação			Concentrado			Rejeito		
Sólido	Líquido	Total	Sólido	Líquido	Total	Sólido	líquido	Total
48,3	48,8	97,1	47,5	28,8	76,3	3,7	15,1	18,8

Proteína *								
Alimentação			Concentrado			Rejeito		
Sólido	Líquido	Total	Sólido	Líquido	Total	Sólido	Líquido	Total
53,2	47,0	100,2	46,8	28,5	75,3	6,0	15,9	24,9

Porcentagem do total inicial

Condições: ver Tabela 5.7.

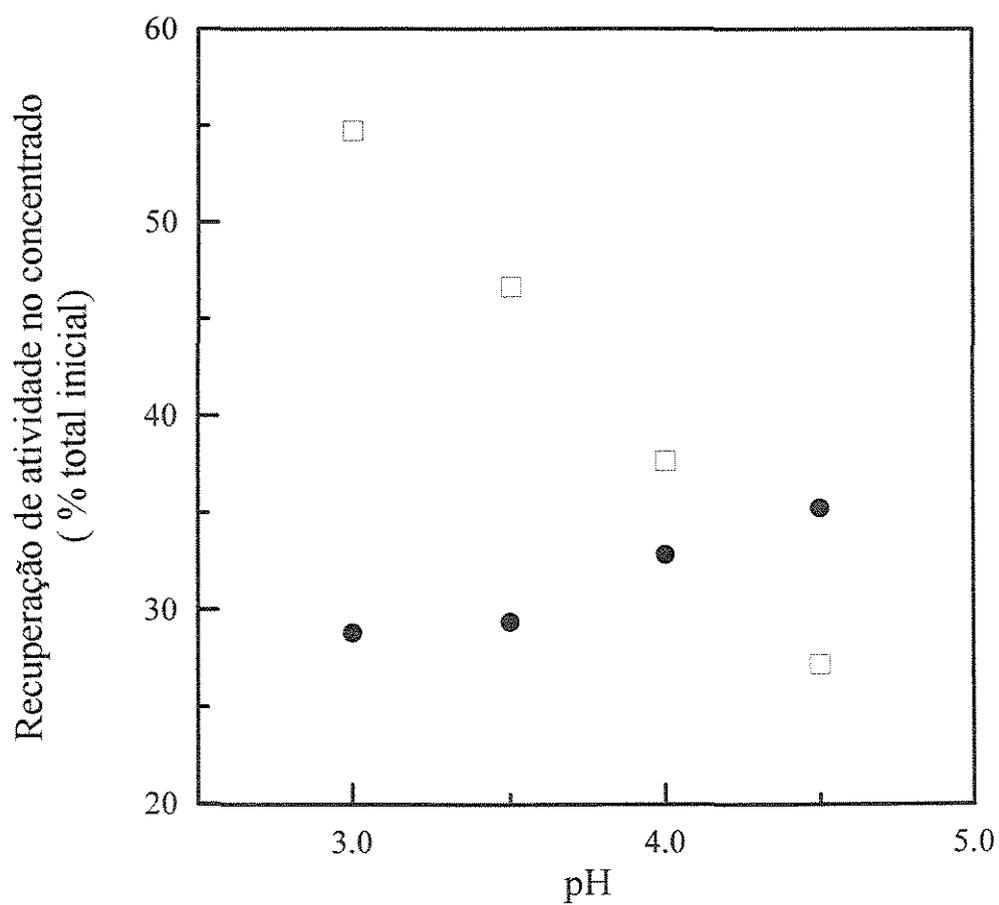


Figura 5.22 - Recuperação de atividade no concentrado dos testes de flotação de celulase (● sobrenadante e □ complexo sólido formado pela celulase e HPMC). Condições de flotação (Tabela 5.7).

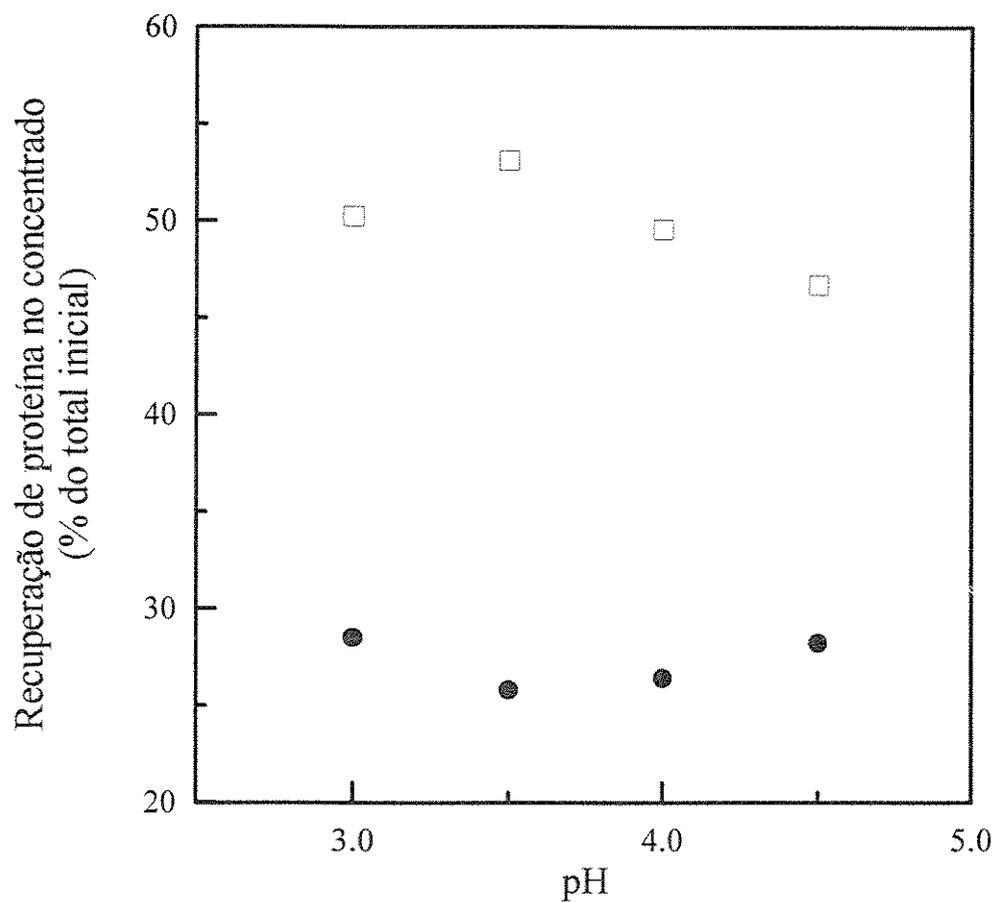


Figura 5.23 - Recuperação de proteína no concentrado dos testes de flotação de celulase (● sobrenadante e □ complexo sólido formado por celulase e HPMC) Condições de flotação (Tabela 5.7).

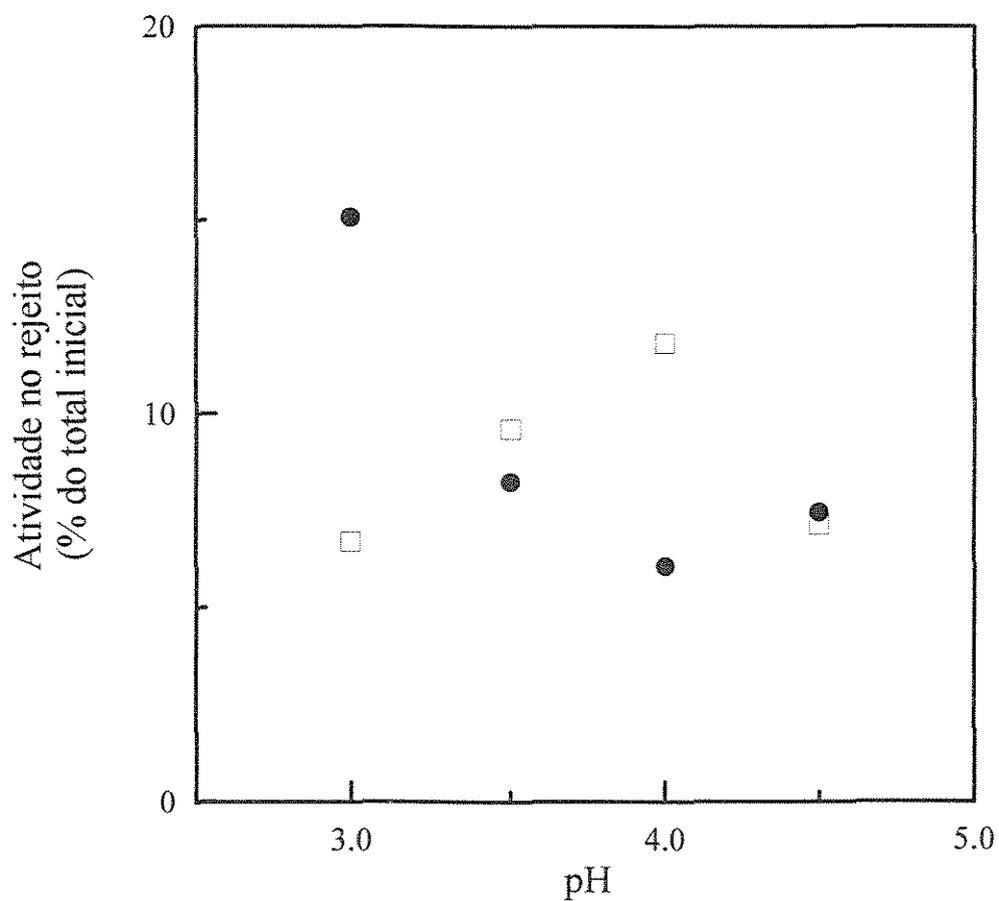


Figura 5.24 - Atividade no rejeito dos testes de flotação de celulase (● sobrenadante e □ complexo sólido formado por celulase e HPMC). Condições de flotação (Tabela 5.7).

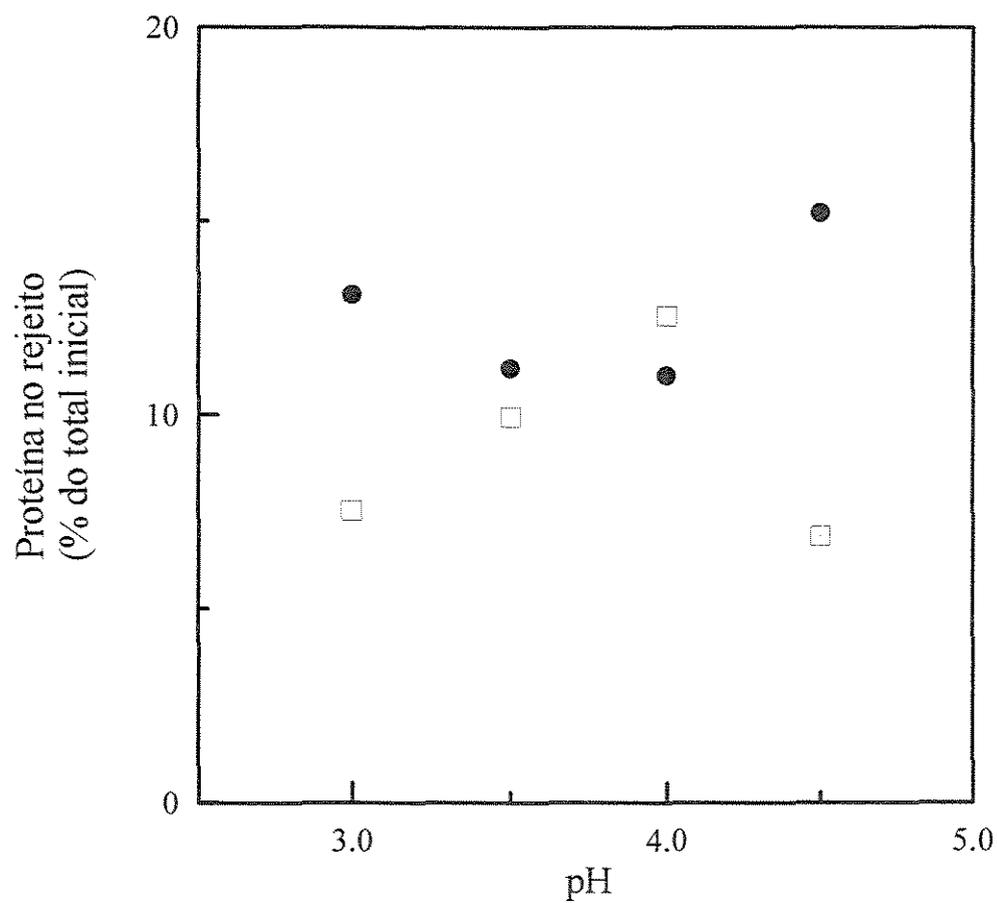


Figura 5.25 - Rejeito de celulase nos experimentos de flotação (● sobrenadante e □ complexo sólido formado por celulase e HPMC). Condições de flotação (Tabela 5.7).

Os testes de precipitação e flotação não mostraram um bom desempenho com relação aos fatores de separação e purificação para a celulase utilizada, isto pode ser explicado basicamente por dois motivos:

- I. O sulfato de amônio pode ser utilizado na etapa de purificação
- II. O processo utilizado na purificação da celulase ter a mesma seletividade do sulfato de amônio.

A precipitação de celulase com HPMC e sulfato de amônio seguida de flotação em um processo global de recuperação de celulase tem como grande vantagem a redução de volume, o que implica em gastos menores em etapas posteriores de purificação, pois normalmente essas etapas tem custos bem mais elevados.

Mesmo com relação a outras operações de separação tais como filtração e centrifugação a flotação tem como grande vantagem os custos operacionais, pois os gastos com energia no caso de flotação é bem menor.

Capítulo 6

Conclusão e Sugestões

Nesse trabalho estudou-se a precipitação de proteínas com polieletrólitos catiônico e aniônico e também com sulfato de amônio (precipitação “salting-out”) utilizando HPMC como co-precipitante.

Visando a recuperação de proteínas através de um processo com baixo custo de energia e operação utilizou-se também a flotação contínua dos precipitados de celulasas em uma coluna.

6.1 - Conclusões

O processo de precipitação de proteínas em solução utilizando polieletrólitos foi analisado para o seguinte conjunto de sistemas: PAA com massas moleculares de 90, 450 e 1000 kDa com mioglobina de massa molecular 18,8 kDa; quitosona com as proteínas BSA e pepsina; e quitosona com uma mistura binária (BSA e pepsina).

Como acontece em geral com precipitação com polieletrólito, a recuperação de mioglobina foi alta (98 %) e requereu uma baixa dosagem (200 mg de PAA por grama de mioglobina) com PAA de massa molecular 90 kDa.

No caso específico da pepsina foi estudada também a atividade enzimática do precipitado obtido com quitosona após dissolução em ácido acético, verificando-se a manutenção dessa atividade nas condições ótimas de precipitação (pH 5,0 e dosagem em torno de 0,1 g de quitosona por grama de pepsina).

A precipitação com quitosona mostrou-se mais seletiva na separação de pepsina da BSA a pH 5,0 e dosagem igual a 0,2 mg de quitosona por miligrama de pepsina e razão mássica de proteína de 0,5 mg de BSA por miligrama pepsina cujo fatores de separação e purificação foram iguais a 360 (pois a solução contendo proteínas foi formada por uma mistura binária) e a recuperação de proteína e atividade da pepsina no precipitado foram de 72 e 77 %, respectivamente.

O Processo de precipitação de proteína com a utilização de co-precipitantes e sulfato de amônio foi analisado para o sistema: celulase-hidroxipropilmetilcelulose (HPMC). Nesse sistema houve uma melhor recuperação de atividade do que na precipitação de celulase apenas com sulfato de amônio entre as proteínas e esse éter.

Os resultados dos dados estatísticos experimentais mostraram que através da interação entre variáveis temperatura, agitação do shaker, tempo de incubação pode-se recuperar até 75 % de atividade no precipitado com 40% de saturação de sulfato de amônio.

Em processos de precipitação e flotação de partículas, tanto a recuperação de proteína no precipitado quanto a flotabilidade dessa partículas são fundamentais no rendimento de flotação.

Nos experimentos utilizando-se a operação de flotação foram recuperados 100% da atividade precipitada. A redução de volume nesse caso foi de 80% do volume da alimentação.

6.2 -Sugestões

Para trabalhos futuros envolvendo precipitação e flotação de proteínas ou outros bioprodutos, sugere-se que antes da otimização de precipitação e da flotação contínua seja feito um estudo qualitativo e quantitativo dos seguintes fatores: hidrofobicidade, flotabilidade das partículas a serem recuperadas e rendimento de flotação das mesmas em colunas de flotação com capacidade volumétrica entre 50 e 100 ml.

- Sintetizar derivados do quitosana que sejam capaz de formarem precipitados hidrofóbicos com proteínas.

- Estudar a hidrofobicidade e flotabilidade de precipitados formados com a utilização de proteínas ou de outros bioprodutos com outros polímeros.

- Estudar a hidrofobicidade e flotabilidade de precipitados formados com outros polímeros.

Capítulo 7

Referências bibliográficas

- Adamson, A. W. Physical Chemistry of Surfaces, 4 ed., Wiley-Interscience, Cap. 2, 1990.
- Amory, D. E. e Rouxhet, P. G., "Surface Properties of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces carlsbergensis*: chemical composition, eletrostatic charge and hydrophobicity. Biochimistry. Biophysical. Acta., 938, 61-70, 1988.
- Askonas, B. A., The Use of Organic Solvents at Low Temperature for the Separation of Enzymes: Application to Aqueous Rabbit Muscle Extract. Biochemistry Journal. 48, 42-48, 1951.
- Anson, M., The Estimation of Pepsin, Trypsin, Papain and Cathepsin with Haemoglobin, Journal Genetical Physiological., 22, 79-89, 1939.
- Arakawa, T. e Timasheff, S. N., Preferential Interactions of Proteins with salts in concentrated solutions. Biochemistry Journal, 21, 6542-6552. 1982.

- Arakawa, T. e Timasheff, S. N., Mechanism of Protein Salting In and Salting Out by Divalent Cation Salts: Balance Between Hydration and Salt Binding, *Biochemistry*, 23, 5912-5923, 1984.
- Bahr, K. H., Weisser, H. e Scheger, K., Investigations on Proteins Excreted by the Yeast *Hansenula polymorpha* and Their Influence on Broth Foaminess and Cell Recovery by Flotation.”, *Enzyme Microbiological Technology.*, 13, 9, 747-54, 1991.
- Bailey, M. J., A Note on the Use of Dinitrosalicylic Acid for Determining the Products of Enzymatic Reactions, 29, 494-496, 1988.
- Bell, D. J., Moore, M. and Dunnill, P. The formation of Protein Precipitates and Centrifugal Recovery, in: *Downstream Processing*. Ed. Springer Verlag, New York, 1983.
- Belter, P. A., Cussler, E. L. e Hu, W. S., *Bioseparations*. Willey Interscience, 221-222, 1988.
- Bradford, M. M., A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding, *Analytical Biochemistry*, 72, 248-245, 1976.
- Bonnerjea, J., Oh, S., Hoare, Michael e Dunnill, P., Protein Purification: The Right Step at the Right Time, *Biotechnology*, 4, 954-958, 1986.
- Canevascini, G. E. e Gatten, C., A Comparative Investigation of Various Cellulase Assay Procedures, *Biotechnology. and Bioengineering*, 23, 1573-1590, 1981.

- Chavisit, V. E., Torres, J. A., Chitosan-Poly (acrylic acid): Mechanism of Complex Formation and Potential Industrial Applications, *Biotechnology. Progress*, 6 (1), 2-6, 1990.
- Chen, J. P., Novel Afinity-Bases Processes for Protein Purification, *Journal. Fermentation. Bioengineering*, 70, 199-209, 1990.
- Chen, W. e Berg, J. C., The Effect of Polyeletrolyte Dosage on Floc Formation in Protein Precipitation by Polyeletrolytes, *Chemical. Engineering. Science*, 48 (10), 1775-1784, 1993.
- Chen, W., Protein Precipitation by Polyeletrolytes PhD Dissertation, University of Washington, Seattle, 1992.
- Clark, K. M. e Glatz, C. E., Polymer Dosage Considerations in Polyeletrolyte Precipitation of Protein, *Journal Biotechnology Progress*, 3, (4), 241-247, 1987.
- Clark, K. M. e Glatz, C. E., Protein Fractionation by Precipitation with Carboxymethyl Cellulose, In: *Downstream Processing and Bioseparation: Recovery and Purification of Biological Products*, eds, Hamel, J. F., Hunter, J. B. And Sikdar, S., ACS Symposium. Series, 170-187, 1990.
- Clark, K. M. e Glatz, C. E., A Binding Model for the Precipitation of Protein by Carboxymethyl Cellulose, *Chemistry Engineering Science*, 47(1) 215-224, 1992.

- Cooper, T. G. *The Tools of Biochemistry*, John Wiley & Sons, New York, 1977.
- Couillard, D. e Gariépy, S., Treatment and Up-Grading of Agricultura and Food an Abattoir Effluent.,*The Canadian Journal of Chemistry Engineering*, 68, 6, 1083-1023, 1990.
- Curling, J. M., *Methods of Plasma Protein Fractionation*, Academic Press, New York, 1980.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. e Smith, F., Colorimetric Method for Determination of Sugar and Related Substances, *Analytical Chemistry*, 28 (3), 350 1956.
- Engler, C. R. e Smith, T. J., Extration of Ruber from Guayule., *Journal American Oil Chemical Society*; 61, 4, 693,1984.
- Evans, M. T.; Mitchell, J.; Mussellwhite, P. R.; Irons, L., The Efect of the Modification of Protein Struture on the Properties of Proteins Spread and Adsorbed at the Air-Water Interface. In *Surface Chemistry of Biological Systems*, Blank, M., Ed; Plenum, 1-22, 1970. (Apud Miranda, 1991).
- Farfán, J. A., *Química e Proteína Aplicada à Ciência e Tecnologia do Alimento*, editora UNICAMP, Campinas, . 87, 1994.
- Fisher, R.R. e Glatz, C. E., Polyelectrolyte Precipitation of Protein: I. The Effect of Reactor Conditions, *Biotechnology And Bioengineering*, 32, 777-785, 1987.

- Gaudin, A. M., Flotation, McGraw-Hill, New York 547-555, 1957.
- Gehle, R. D. e Schürigel, K., Protein Recovery by Continuous Flotation, Applied Microbiology and Biotechnology, 20, 133-138, 1984.
- Gehle, R. D.; Sie, T. L.; Kramer, T.; Schügerl, K., Continuous Cultivation of *Hansenula polymorpha* and *Saccharomyces cerevisiae* in an Integrated Pilot Reactor-Flotation Column-System, Journal of Biotechnology, 17, 147-154, 1991.
- Gekko, K e Noguchi, H., Effect of Ionic Dextran Derivates on Heat Precipitation of Protein, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 26 (6),. 1409-1414, 1978.
- Glatz, C. E. E Fisher, R. R., Modeling of Precipitation Phenomena in Protein Recovery In: Separation, Recovery and Purification in Biotechnology, Eds. J. A. Hong and Ansenjo, 109-120, ACS Symposium Series,314, 1986.
- Glatz, C. E.; Sims, W. B. e Cordes, R. M., Precipitation of Nucleic Acids with Polyethyleneimine. Journal Biotechnology Progress, 6 4 283-285, 1992.
- Gonzales, J. M., Lindamood, J. B. e Desai, N. Recovery of Protein from Potato Plant Waste Effluents by Complexation with Carboxymethyl Cellulose, Food Hydrocolloids, 4 (5), 355-363, 1991.

- Gregory, J., Kinetic Aspects of Polymer Adsorption and Flocculation - In Flocculation in Biotechnology and Separation Systems, ed. Y. A. Attia., Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, 31-45, 1987.
- Gregory, J., Polymer Adsorption and Flocculation in Sheared Suspensions, *Colloids and Surfaces*, 31, 231-253, 1988.
- Gregory, J., Flocculation in Laminar Tube Flow, *Chemical Engineering and Science*, 36 (11), 1789-1794, 1981.
- Gregory, J., Flocculation of Polystyrene Particles with Cationic Polyelectrolytes, 65, 22260-22268, 1969.
- Guzman, R. Z., Kilpatrick, P. K., Carbonell, R. G. Affinity of Avin using Ligand-Modifier Surfactants. *Downstream Processing and Bioseparation: Recovery and Purification of Biological Products*; Hamel, J. F., Hunter, J. B., Silkdar, S. K., Eds. American Chemical Society: ACS Symposium Series 419, 212-236, 1990.
- Harris, C. C., Flotation Machines in: ed. Fuerstenau, M. C., Flotation, A. M. Gaudin Memorial International Flotation Symposium. AIME, New York, 1, 753, 1976.
- Hiemenz, P. C., Principles of Colloid and Surfaces Chemistry, Marcel Dekker, New York, 1986.
- Hill, R. D. e Zadow, J. G., The Precipitation of Whey Protein by Carboxymethyl Cellulose of Differing Degree of Substitution, *Journal Dairy*, P. 41, 373-380, 1974.

- Holland, C. R., Recovery of Single Cell protein by Chitosan in a Batch Dissolved Air Flotation System., *Jl Chitin and Chitosan*, 1990.
- Jacob, W. B. Enzyme Purification and related techniques, *Methods Enzimological*, Academic Press, New York, 1984
- Kalischewski, K.; Bumbullis, W. e Schugerl, K., Foam Behavior of Biological Media, I. Protein Foams., *European Journal of Applied of Microbiology and Biotechnology.*, 7, 21-23, 1979. (Apud Miranda, 1991)
- Kasper, R., Theoretical and Experimental Investigation of the Flocculation of Charged Particles in Aqueous Solutions by Polyeletrolytes of Opposite Charge”, PhD Thesis, California Institute of Technology, Pasadena, CA, 1971.
- Kotsaridu, M.; Gehie, R., Schugerl, K., Foam Behavior of Biological Media, IX. PH and Salt Effects. , *European Journal of Applied of Microbiological and Biotechnology*, 18, 60-63, 1983. (Apud Miranda, 1991).
- Kroner, K. H. e Kula, M. R. *Process Biochemistry*, 13(4), p. 7, 1978.
- Larson, P. Q. e Mosback, K. Affinity Precipitation of Enzymes *FEBS Lett*, 98, 333- 338, 1979.
- Laurent, T. C. e Iverus, P. H., *Biochimistry Biophysics Acta*, 133, 371, 1967.
- Leja, J., *Surface Chemistry in Flotation*. Plemun, New York, 1982.

Lemlich, R., ed. Adsorptive Bubble Separation Techniques. Academic Press, New York, 331, 1972.

Mandels, M. , Sternberg, D. E., Andreotti, R. E., In Proceedings of the symposium on Enzymatic Hydrolysis of celluloso., Ernari, T. M. and Linko, M. Eds., Aulanko, 81, 1975.

Mandels, M. E Weber, Journal Advanced of Chemistry, 95, 391 1969.

Mattiasson, B. e Senstad, C. Purification of Wheat Germ Agglutinin Using Affinity Flocculation With Chitosan and a Subsequent Centrifugation or Flotation step, Biotechnology and Bioengineering, 34 387-393, 1989.

Miller, G. L., Analitical Chemistry, 31, 426 1959.

Miranda, E. A. e Berglund K. A., The Use of Column Flotation in the Downstream Processing of Fermentation Products: Recovery of a Genetically Engineered α -Amilase, Biotechnology Progress, 9, 4, 411-20, 1993.

Montero, A. G., Kirschner, T. F. e Tanner, R. D., Bubble and Foam Concentration of Cellulase, Applied Biochemistry and Biotechnology 39/40, 467-475, 1993.

Morris, J. E., Hoffman, A. S., Fisher, R. R., Affinity Precipitation of Proteins by Polyligands. Biotechnology and Bioengineering, 41, 991-997, 1993.

Mozes, N. E e Rouxhet, P. G., Methods for Measuring Hydrophobicity of Microorganims., Journal of Microbiological Methods, 6, 99-112, 1987.

- Muzzarelli, R. A. A., Chitin, Pergamon Press, Oxford, (1977).
- Nagasawa, M., Murase, T. e Kondo, K., Potentiometric Titration of Stereoregular Polyelectrolytes, *Journal Physical chemistry*, 69 (11), 4005-4012, 1965.
- Nagle, N. J.; Rivard, C. J. Anaerobic Bioconversion of Tuna Processing Wastes., *Abstr. Gen Meet. American Society Microbiological*, 92 Meet, 319, 1922.
- Ogston, A. G., *Journal of Biochemistry*, 117, 85, 1970.
- Ouchi, K. e Akiyama, H., Non-foaming Mutants of Sake Yeast. Selection by Cell Agglutination Method and by Froth Flotation Method., *Agricultural and Biological Chemistry* 35, 1024-1032, 1971.
- Palmer, M. C.; Greenhalf, W. e Laluece, C., Efficient Flotation of Yeast Cells Grown in Batch Culture, *Biotechnology and Bioengineering*, 50, 3 248-256, 1996.
- Powers, D. D., Willard, B. L., Carbonell, R. G. and Kilpatrick, P. K. Affinity Precipitation of Protein by Surfactant-Solubilized, Ligand-Modified Phospholipids, *Biotechnology Progress*. 8, 436-453, 1992.
- Priesing, C. P., A Theory of Coagulation Useful For Design, *Industrial and Engineering Chemistry*, 54, 1962.
- Radic, K. A., Dairy Waste., *Water-Environ. Residual*, 64, 4, 417-418, 1992.

- Righetti, P. G. e Tiziana, C., Isoelectric Points and Molecular Weights of Proteins a Table, *Journal of Chromatography*, 127, 1-28, 1976.
- Ruehrwein, R. A. e Ward, A., Mechanism of Clay Aggregation by Polyelectrolytes, *Soil Science*, 73, 485-492, 1952.
- Sander, L. S. E Luner, P., Flocculation of Microcrystalline Cellulose with Cationic Ionene Polymers, *Journal Applied of Polymer Science*, 18 2075-2083, 1974.
- Schuegerl. L, Kretzmer, G. Freitag, R. e Schepet, T., Integrated Biotechnological Production Process., *Chemical Ing. Technology*, 66, 12, 1585-1992, 1994.
- Schuhman, R., *Journaal of Physical Chemistry*, 46, 891, 1942
- Schulze, H. J., *Physico-Chemical Elementary Process in Flotation*, Elsevier, 1984.
- Scopes, R K., *Techniques for Protein Purification*, in *Techniques in the Life Sciences*, BS102 Supplement, Elsevier/North Holland, Amsterdam, 1-46, 1987.
- Scopes, R. K., *Protein Purification - Principles and Practice*, 2 ed. C.R. Cantor, Spring-Verlag, New York, 43, 1987.
- Senstad, C., Mattiasson, B., *Affinity Precipitation Using Chitosan as Ligand Carrier*, *Biotechnology and Bioengineering*, 33, 216, 1989a.

- Senstad, C., Mattiason, B., Purification of Wheat Germ Agglutinin Using Affinity Flocculation with Chitosan and Subsequent Centrifugation or Flotation Step. *Biotechnology and Bioengineering* 34, 387- 393, 1989b.
- Senstad, C., Mattiason, B., Precipitation of Soluble Affinity Complexes by a Second Affinity Interaction: A Model Study, *Biotechnology and Applied Biochemistry* 11, 41-48, 1989c.
- Shaw, J. D., *Introdução à Química dos Colóides e de Superfícies*; J. H. Edgard Blucher, Editora da Universidade de São Paulo, p 141, 1975.
- Shieh, J. Y. And Glatz, C. E., Precipitation of Proteins with Polyelectrolytes: Role of Polymer Molecular Weight, In: *Polymer soluble Complexes*, ed Dubin, Spring-Verlag, 1991.
- Snoeren, Th. H. M., Payens, T. A. J., e Both, P., “ Electrostatic Interaction between K-carraegeenan and K-casein”, *Milchwissenschaft*, 30 (7), 393-396, 1975.
- Somasundaran, P. e Ananthapadmannabhan, K. P., Bubble and Foam flotation, Ore Flotation, in: *Handbook of Separation Process Technology*, Rousseau, R. W., Ed.; Wiley-Interscience: New York, 775-776, 1987.
- Sternberg, M. e Hershberger, D., Separation of Proteins with Polyacrylic Acids, *Biochimica et Biophysica Acta*, 342, 195-206, 1974.

- Stoll, V. S. E Blanchard, J. S., Buffers : Principles and Practice. , In: Guide to Protein Purification, Ed. M.P. Deutscher, 24-38, Academic Press, San Diego, CA, 1990.
- Sutherland, K. L., J. Phys. Coll. Chem., 52, 394, 1948
- Tchobanoglous, G. e Burton, F. L., Wastewater Engineering, 3rd Ed. Chapters 6-7, McGraw Hill, 1991.
- Tybussek, R. , Linz, F., Schugerl, K., Mozes, N., Leonard, A. J. e Rouxhet, P. G., Comparison of the Continuous Flotation Performances of *Saccharomyces cerevisiae* LBG H620 and DSM2155 Strains, Applied Microbiology and Biotechnology, 41, 13-22, 1994.
- Vardar-Sucan, F., Efficiency of Natural Oils as Antifoaming Agents in Bioprocess., Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 43, 39-47,1988. (Apud Miranda, 1991).
- Virkar, P. D. et al. Biotech. Bioeng. 24, 871, 1982.
- Vogel,D. and Voet, Judith G., 1ª edi., John Wiley & Sons, New York, 1990.
- Wang, F. W., Kretzmer, G. E Schugerl, K., Compararison of the Morphologies of a Flotable and Non-flotable Strain of *Saccharomyces cerevisiae*, Applied Microbiology and Biotechnology, 41, 537-543, 1994.

- Wenzig, E., Lingg, S., Kerzel, P. Zeh, G. e Mersmann, A. Compararison of Selected Methods for Downstream Processing in the Production of Bacterial Lipase, *Chemical Engineering & Techology*, 16, 405-512, 1993.
- Wheelwright, S. M., *Protein Purification: Design and Scale up of Downstream*, 1 ed., Oxford Univ. Press, 90, 1991.
- Yianatos, J. B.; Finch, J.A. e Laplante, A. R., Holdup Profile and Bubble Size Distribution of Flotation Column froth. *Canadian Metallurgical Quarterly*, 25(1), 23-29, 1986.
- Yoon, R. H., Luttrell, G. H., The Effect of Bulbble Size on Fine Particle Flotation, *Mineral Processing and Extractive Metallurgy Review*, 5, 101-122, 1989.
- Zlokarnik, M., Tends and Needs in Bioprocess Engineering, *Chemical Engineering Progress*, April, 62-67, 1990.