

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO**

**Sistemas de de Processos Químicos e Informática**

**Otimização dos parâmetros de Extração Líquido- Líquido em Duas Fases  
Aquosas na Recuperação da Bromelina Presente no Abacaxi**

**Autor Ana Claudia Wabiszczewicz Cesar  
Orientador Prof. Dr. Elias Basile Tambougi**

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

**Campinas - São Paulo  
Dezembro - 2000**



**UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE**

L' CHAMADA: T/ UNICAMP  
 C 3390  
 Ex.  
 OMBO BC/ 44125  
 PROC. 16-39210.1  
 C  D   
 REC# R\$ 11,00  
 DATA 25/04/07  
 I' CPD

CM-00154671-4

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

~~C3390~~  
 C3370

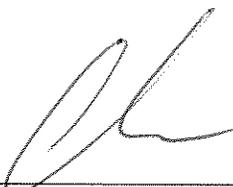
Cesar, Ana Claudia Wabiszczewicz

Otimização dos parâmetros de extração líquido-líquido em duas fases aquosas na recuperação da bromelina presente no abacaxi / Ana Claudia Wabiszczewicz Cesar.--Campinas, SP: [s.n.], 2000.

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

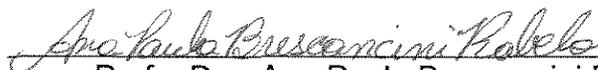
1. Extração (Química). 2. Otimização combinatória. 3. Bromelina. I. Tambourgi, Elias Basile. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Dissertação de Mestrado defendida por Ana Claudia Wabiszczewicz Cesar e aprovada em 12 de dezembro de 2000 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



---

Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi - Orientador



---

Profa. Dra. Ana Paula Brescancini Rabelo  
PUC/MG



---

Profa. Dra. Ana Maria Frattini Fileti  
FEQ/UNICAMP

20005992

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química.



---

Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi - Orientador

**A Minha Mãe Janina**  
**(*in memoriam*)**

**Ao meu marido Luiz  
Com todo amor do mundo**

## **Agradecimentos**

À Deus, por ter me dado oportunidade de merecer este caminho.

Ao Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi pela orientação, compreensão e amizade.

Ao Prof. Luis Fernando Novazzi e Prof. Douglas Alves Cassiano pela amizade, apoio e discussão de trabalhos e resultados.

Aos colegas, professores e funcionários da FEQ-UNICAMP.

À Profa. Dra. Rivana Marino, pela amizade e apoio.

À Profa. Adriana Célia Lucarini, minha “mãe científica”.

Às estagiárias de Iniciação Científica da Faculdade de Engenharia Industrial: Fernanda, Marina, Ciléia, Jordana, Sabrina e Vanessa, pelo incentivo e dedicação.

Aos professores, da Faculdade de Engenharia Industrial que me apoiaram e torceram pela minha vitória.

Ao meu marido, Prof. Luiz Carlos Bertevello, pelo amor, paciência e dedicação infinitas.

**Muito obrigada.**

## RESUMO

O desenvolvimento de novos processos de extração e purificação de proteínas é muito importante, uma vez que esta é uma etapa limitativa na produção de bioprodutos. A extração líquido-líquido vem sendo aplicada há muitos anos como uma valiosa técnica laboratorial de separação. A sua aplicação em larga escala começou a ocorrer no início do século , desde então ela teve um grande desenvolvimento na indústria nos mais diversos setores, desde a extração de metais nobres até a purificação de antibióticos.

A extração líquido - líquido pode ser usada como um passo da pré purificação usando um sistema de duas fases aquosas. Esses sistemas vem sendo testados com sucesso, são sistemas formados por duas fases aquosas imiscíveis ou parcialmente miscíveis entre si , obtidas pela adição de polímeros hidrofílicos ou um desses polímeros e um sal , como o sistema PEG ( polietileno glicol ) e o fosfato de potássio.

O presente trabalho estuda a recuperação da bromelina do caldo prensado do abacaxi, por extração líquido-líquido em duas fases aquosas, utilizando técnicas de planejamento fatorial para a otimização dos ensaios experimentais, reduzindo assim o número de experimentos a serem realizados, reduzindo o custo e o tempo de desenvolvimento do trabalho. Foram calculados os efeitos das variáveis em estudo, e as interações entre elas. Realizando ensaios em batelada, procurou-se delinear as melhores condições para a extração e recuperação da enzima, utilizando como indicador o coeficiente de partição.

## ABSTRACT

The development of new process in protein's extraction and purification is very important, since this is a limiting step in bio-products production. Liquid-liquid extraction has been applied for a long time as a valuable laboratory separation technique. Its application on a large scale started at the beginning of the century and since then it had a great industrial development in many fields, from noble metal's extraction to antibiotic's purification.

Liquid-liquid extraction can be used as a pre-step in purification utilizing a two-phase aqueous system. These systems have been successfully tested; they are formed by two aqueous non miscible or partially miscible systems, resulting from the addition of hydrophilic polymers or one of these polymers and a salt, like the system PEG (polyethylene glycol) and potassium phosphate.

The present work studies bromeline's recovery from pineapple's syrup, through liquid-liquid extraction in two-phase aqueous systems, employing factorial planning to optimize experiments, hence reducing their number and, consequently, reducing time and costs in the development of the work. The effects of the studied variables and their interaction were calculated. Through batch tests the best conditions for enzyme extraction and recovery were sought, using as indicator the partition coefficient.

## ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
NOMENCLATURA	iii
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	03
2.1. Proteínas	03
2.1.1. Bromelina	03
2.1.2. Enzimas	05
2.1.3. Desnaturação	06
2.1.4. Proteína Total , Atividade e Açúcares Redutores	07
2.2 . Abacaxi	08
2.2.1. Fruticultura Brasileira	08
2.2.2. Cultivo e Colheita	09
2.2.3. Caracterização da Fruta	11
2.2.4. Composição Química	12
2.2.5. Processamento da Fruta	12
2.2.6. Produtos e Subprodutos do Processamento	13
2.3. Consumo de Bromelina	14
2.4. Separação e Purificação de Proteínas	16
2.4.1 Extração Líquido-Líquido	17
2.4.1.1. Sistemas de Duas Fases Aquosas	18
2.4.1.2. Tipos de Sistemas de Duas Fases Aquosas	20
2.4.1.3. Sistema PEG/Sal	21
2.4.1.4. Polietileno Glicol	22
2.4.1.5. Recuperação de Sais e Polímeros	23
2.4.2. Teoria de Formação das Fases	24
2.4.2.1. Tempo de Separação das Fases	27
2.4.2.2. Fatores que Influenciam no Sistema de Fases	27
2.4.2.3. Diagrama de Fases	29
2.4.3. Fundamentos da Partição das Proteínas	30
2.4.3.1. Coeficiente de Partição	31
2.4.3.2. Influência do Peso Molecular do Polímero e da Proteína no Coeficiente de Partição	32
2.4.3.3. Influência do pH do Sistema no Coeficiente de Partição	33
2.4.3.4 Influência das Interações entre a Proteína e o Sistema de Fases no Coeficiente de Partição	33
2.4.3. 5. Influência da Concentração dos Componentes do Sistema no Coeficiente de Partição	34
2.4.3.6. Influência da Concentração de Proteínas no Coeficiente de Partição	34
2.4.3. 7. Modelagem Matemática do Coeficiente de Partição	35
2.5. Planejamento Fatorial	36
3. MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1. Preparo da Amostra	38
3.1.1. Preparo das Soluções Estoques	39
3.2. Extração	40

3.2. Métodos Analíticos	41
3.2.1. Determinação de Proteína Total	41
3.2.2. Determinação da Atividade Enzimática	41
3.3. Metodologia de Cálculo	42
3.3.1. Coeficiente de Partição	42
3.3.2. Atividade Específica	43
3.4. Planejamento Fatorial	43
3.4.1. Metodologia de Cálculo	43
3.4.2. Desvio Padrão	44
3.4.3. Desvio Padrão dos Efeitos	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1.1. Linha de amarração 17,5/17,5% p/p e 15/15 %p/p – VARIAÇÃO 1	47
4.1.2. Linha de amarração 15/17,5% p/p e 17,5/15 % p/p – Variação 2	48
4.2. Partição para Atividade Enzimática Específica	51
4.2.1. Linha de amarração 17,5/17,5%p/p e 15/15%p/p – VARIAÇÃO 1A	52
4.2.2. Linha de amarração 15/17,5 % p/p e 17,5/15 % p/p – Variação 2A	55
5. CONCLUSÕES E COMENTÁRIOS	58
6. SUGSTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

## NOTAÇÃO E NOMENCLATURA

A	Atividade Enzimática (U)
Ae	Atividade Específica (U/mg)
Ae <sub>fundo</sub>	Atividade específica da Fase Inferior
Ae <sub>topo</sub>	Atividade Específica da Fase Superior
ABIFARMA	Associação Brasileira da Indústrias Farmacêuticas
BSA	Albumina Bovina ( Bovine Serum Albumin)
C <sub>f</sub>	Concentração da Fase Inferior
C <sub>t</sub>	Concentração da Fase Superior
Da	daltons
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
K	Coefficiente de Partição
K <sub>bioesp</sub>	Fator de Afinidade Bioespecífica
K <sub>conf</sub>	Fator de Conformação
K <sub>eletro</sub>	Fator eletroquímico
K <sub>hfob</sub>	Fator de afinidade hidrofóbica
K <sub>tam</sub>	Fator Tamanho
MPEG	Massa Molecular do PEG
P	Proteína Total (mg/L)
PEG	Poliétileno Glicol
pI	Ponto Isoelétrico
P <sub>topo</sub>	Concentração de Proteínas na Fase Superior (mg/L)
P <sub>fundo</sub>	Concentração de Proteínas na Fase Inferior (mg/L)
p/p	Peso/peso
s	Desvio padrão
Sefeitpo	Desvio Padrão dos Efeitos
TCA	Ácido Tricloroacético
X <sub>m</sub>	Média dos resultados Obtidos
X <sub>i</sub>	Grandeza Medida

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

## 1. INTRODUÇÃO

O abacaxizeiro produz frutos de sabor e aroma aceitáveis no mundo todo. O Brasil é um grande produtor de abacaxi, sendo conhecidas cinco espécies de *Ananas* e uma de *Pseudoananas*. Dentro da espécie *Ananas comosus* estão incluídos todos os cultivos de interesse agrícola, onde os principais cultivados no Brasil são o Pérola e o Smooth Cayenne (SANTOS, 1995).

O abacaxi fruto é a parte comercializável da planta, porém, esta porção representa somente 63% do total da planta, enquanto que o restante, formado por caule, folha, casca, coroa e talos, é considerado resíduo agrícola, e não tem sido devidamente aproveitado, resultando em perdas econômicas. Trabalhos já realizados demonstram que estes resíduos apresentam teores representativos de carboidratos, proteínas e enzimas proteolíticas, que possibilitam a sua utilização industrial como matéria-prima para a obtenção de bromelina, amido, fibras, álcool etílico e rações animais (BALDINI et.al., 1993).

Bromelina é o nome genérico dado ao conjunto de enzimas proteolíticas encontradas nos vegetais da família *Bromeliaceae*, da qual o abacaxi é o mais conhecido. A bromelina tem diversos usos, todos baseados em sua atividade proteolítica, como nas indústrias alimentícias e farmacêuticas. Pode-se mencionar sua utilização no amaciamento de carnes, na clarificação de cervejas, na fabricação de queijos, no preparo de alimentos infantis e dietéticos, no pré-tratamento de soja, no tratamento do couro, na indústria têxtil, no tratamento da lã e da seda, no tratamento de distúrbios digestivos, feridas e inflamações, preparo de colágeno hidrolisado, etc.

Muitas técnicas têm sido utilizadas para a recuperação e purificação de proteínas e enzimas de origem animal, vegetal ou microbiana. Técnicas mais antigas como a precipitação, extração com solventes e filtração geralmente tem alto poder de concentração e baixa purificação e técnicas mais modernas como a cromatografia de afinidade, troca iônica ou gel-filtração, eletroforese, extração em duas fases aquosas, extração com micela reversa, recuperam e purificam, muitas vezes até a homogeneidade.

---

A extração líquido-líquido é uma operação unitária de transferência de massa, utilizada para separação de componentes presentes em uma mesma solução, distribuindo-se entre as duas fases líquidas e insolúveis entre si.

A extração em duas fases aquosas é uma técnica que vem sendo aplicada na indústria, principalmente em separação de enzimas, por se tratar de um processo de baixo custo, alta seletividade e com possibilidade de reciclagem dos reagentes. Além disso, as enzimas permanecem estáveis no sistema, devido à alta concentração de água e à utilização de reagentes não desnaturantes.

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

Os principais fatores que influenciam no sistema de fases e conseqüentemente alteram o diagrama de fases são: peso molecular do polímero, concentração dos componentes do sistema e temperatura.

Assim, este trabalho tem por objetivo encontrar a melhor condição de extração da Bromelina a partir do extrato de abacaxi realizando estudos em batelada (tubo de ensaio), em sistemas de duas fases aquosas, levando em conta a influência do peso molecular do polímero, a concentração entre as fases e o pH, tendo utilizado as técnicas de planejamento fatorial para delinear os experimentos.

---

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Proteínas

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

As proteínas são as moléculas orgânicas mais abundantes nas células e constituem 50% ou mais de seu peso seco. São encontradas em todas as partes de todas as células, uma vez que são fundamentais sob todos os aspectos da estrutura e função celular. Existem muitas espécies diferentes de proteínas, cada uma especializada em determinada função biológica diferente.

#### 2.1.1. Bromelina

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

A enzima não está presente nos primeiros estágios de desenvolvimento do fruto, porém, seu nível aumenta rapidamente, mantendo-se elevado até o amadurecimento, onde tem um pequeno decréscimo. Essa é uma das vantagens da utilização das proteases do abacaxi em comparação com outras proteases vegetais. Apesar da diminuição da atividade

---

proteolítica durante a maturação, o abacaxi é o único fruto que possui concentrações relativamente altas de proteases no estado maduro. No mamão e no figo, tanto a papaína como a ficina, somente são encontradas em altos níveis quando o fruto está verde; com o completo amadurecimento, a concentração de proteases praticamente desaparece. Diferentes partes da planta podem ser usadas como matéria-prima para a obtenção da bromelina: folhas, talos, polpa da fruta, cascas e resíduos industriais do processamento do fruto.

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

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

As preparações de bromelina são impuras, e geralmente as principais enzimas contaminantes são outras enzimas proteolíticas e enzimas não proteolíticas, tais como: fosfatases, peroxidases, celulasas e outras glicosidases (MURACHI, 1976). SUH *et. al.* (1992) purificou a bromelina do fruto e do talo até a homogeneidade (18 e 46 vezes de aumento de pureza respectivamente) por cromatografia de gel-filtração e determinou os pesos moleculares em 32.5 e 37 KDa respectivamente, com rendimento de 23% em atividade. MURACHI (1976) purificou a bromelina do talo de abacaxi por cromatografia

---

de gel-filtração, e determinou que o peso molecular da fração pura era de 28 KDa por SDS-PAGE. (ROWAN *et. al.* 1990) descreve a presença de quatro proteases principais presentes em abacaxis (*Ananas comosus*): bromelina do fruto, bromelina do talo, ananaina e comosaina.

### 2.1.2. Enzimas

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

A catálise enzimática das reações é essencial para os sistemas vivos. Sob condições biológicas relevantes, as reações não catalisadas tendem a ser lentas. A maioria das moléculas biológicas é muito estável no ambiente aquoso de pH neutro e temperatura moderada encontrado no interior das células. Muitas reações bioquímicas comuns envolvem eventos químicos que são muito improváveis nas condições do ambiente celular, como a formação transiente de intermediários eletricamente carregados e instáveis ou a colisão de duas ou mais moléculas com a orientação precisa e necessária para que ocorra a reação. (LEHNINGER, 1995).

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

Uma enzima contorna estes problemas fornecendo um ambiente específico dentro do qual uma reação dada é energeticamente mais favorável. A característica distintiva de uma reação catalisada enzimaticamente é que ela ocorre no interior dos limites de uma

---

cavidade, ou fenda, na estrutura molecular da enzima chamado sítio ativo. A molécula que se liga ao sítio ativo e que sofre a ação da enzima é chamado substrato. O complexo enzima-substrato tem papel central na reação enzimática, ele é o ponto de partida para os tratamentos matemáticos que definem o comportamento cinético das reações catalisadas enzimaticamente e para as descrições teóricas dos mecanismos enzimáticos.

### 2.1.3. Desnaturação

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

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

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

#### 2.1.4. Proteína Total , Atividade e Açúcares Redutores

CESAR ( 1999) realizou análises de proteína total, açúcares redutores e atividade enzimática de amostras preparadas da polpa do fruto, da casca e do talo para a caracterização do meio inicial. As concentrações e os resultados são mostrados nas tabelas 1 e 2. O fruto e o talo apresentam o mesmo teor de proteína total, porém o talo apresenta cerca de 60% menor quantidade de enzimas proteolíticas. O abacaxi utilizado para as análises foi o fruto maduro, por isso apresentou uma quantidade elevada de açúcares redutores expressos em glicose, 0,2 a 0,4 g/g de abacaxi. De qualquer forma, o talo e a casca do abacaxi maduro tem um teor de enzima considerável para recuperação, como é mostrado na tabela 2, ainda mais tratando-se de resíduo de muitas indústrias de conservas.

Tabela 1: Dados da concentração das amostras de polpa do fruto, casca e talo do abacaxi.

	massa (g)	V <sub>fruta</sub> (mL)	V <sub>total</sub> (mL)	Concentração
fruto	1734,11	600	3420	507 g polpa/L
casca	850,50	1000	1074	792 g casca/L
talo	413,54	400	980	422 g talo/L

Tabela 2: Dados de proteína total, atividade e açúcares redutores.

	Proteína Total (mg/L)	Atividade Enzimática (mg/g)	Açúcares Redutores (U/L)
fruto	1127	2,22	1428,5
casca	842,3	1,06	865
talo	893,7	2,12	431,5

## 2.2 . Abacaxi

### 2.2.1. Fruticultura Brasileira

A fruticultura brasileira no período de 1990-96 teve uma produção, de apenas quatorze espécies de frutas, da ordem de 30 milhões de toneladas em uma área colhida de 2,0 milhões de hectares. Da produção total destacam-se laranja (18,2 milhões de toneladas), banana (7,4 milhões de toneladas), abacaxi (1,7 milhões de toneladas), coco ( 1,5 milhão de toneladas) e uva (0,8 milhão de toneladas) ( Tabela 3).

TABELA 3 - Produção de Frutas, Brasil - 1990 -1996 (1000 toneladas)

FRUTA	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996
Abacaxi	1.158	1.246	1.295	1.3309	1.558	1.463	1.679
Banana	7.152	4.184	7.299	7.263	7.438	7.384	7.446
Coco	1.064	1.273	1.3118	1.235	1.353	1.424	1.474
Laranja	14.285	15.424	16.040	15.317	14.213	16.004	18.210
Maçã	356	331	403	518	456	432	425
Uva	805	648	799	786	807	825	724

Fonte: IBGE. Fatores de conversão : abacaxi: 1,6 kg/fruto; banana 13kg/cacho; coco 1,5kg ; maçã 130gramas/fruta ; laranja 250 frutos por caixa com 40,8 kg.

Dentre as principais frutas exportadas destacam-se melão, laranja, manga, maçã, uva, abacaxi e banana. Na Europa, devido às grandes e modernas facilidades do porto de Rotterdan as frutas geralmente chegam na Holanda, de onde são distribuídas para os demais países do continente.

No Estado de São Paulo, devido aos diferentes ciclos de maturação (desde muito precoces até tardias) e as diversas regiões de cultivo, pode-se dizer que a época de colheita das frutas se estende por nove meses até pelo ano todo. No caso das frutas de clima temperado e subtropical a colheita se inicia em setembro e se prolonga até junho, enquanto que para tropicais pode durar o ano todo.

Em razão de sua posição geográfica e do cultivo das variedades especialmente criadas ou adaptadas para as condições de inverno brando, com poucas horas de frio abaixo de  $7,2^{\circ}\text{C}$ , a produção paulista é mais precoce que as dos estados do Sul do Brasil, assim como de países produtores como Argentina, Uruguai e Chile, o que traz vantagens econômicas, devido a ausência de concorrentes no início da safra. Ao mesmo tempo, para várias espécies permite-se que sejam exportadas para países do hemisfério Norte quando não há produção regional tendo condições de adentrarem os mercados com redução ou ausência de tarifas aduaneiras de importação.

### 2.2.2. Cultivo e Colheita

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

Tabela 4 : Produção Mundial de abacaxi no ano 2000.

ABACAXI	PRODUÇÃO	PRODUÇÃO
	(t)	(t/há)
Mundial	13.387.351	19,303
PAÍSES	PRODUÇÃO	PRODUÇÃO
	(t)	(t/há)
Tailândia	2.353.037	24,316
Brasil	1.717.700	34,039
Filipinas	1.495.120	37,192
Índia	1.100.000	13,415

Fonte: FAO (2000). Atualizado em 01/03/2000

Os frutos colhidos durante o verão apresentam melhor qualidade do que os amadurecidos durante o inverno. Aqueles se apresentam mais aromáticos e mais ricos em sólidos solúveis, menos ácidos e com maior conteúdo de óleos voláteis.

O momento da colheita depende do fim a que se destinam os frutos. Se é para a fabricação de conservas, deve-se aguardar até que os frutos fiquem maduros, ou seja, o momento em que suas qualidades organolépticas sejam ótimas. Mas, se destina-se à exportação como fruta fresca, a colheita deve ser feita com antecipação para que sua maturação total não ocorra até o momento em que seja ofertado ao consumidor. É preciso, contudo, neste caso, não colher frutos demasiado verdes.

A coloração da casca é habitualmente tomada como indicação para julgar se um fruto está ou não maduro. A madureza da polpa e a coloração da casca ocorrem progressivamente, iniciando-se ambas pela base do fruto e se estendendo paulatinamente para o ápice. Tal avaliação, contudo, é muito mais difícil do que parece à primeira vista, pois há necessidade de se levar em conta o tamanho do fruto, as condições ecológicas, por ocasião da sua maturação e variedade do produto.

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

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

As colheitas das frutas de um abacaxizal não podem ser feitas por meios mecânicos, pois as frutas não amadurecem todas ao mesmo tempo. Todavia, no Havaí e em outras regiões onde a cultura do abacaxi é feita com alto nível técnico, os trabalhos de colheita são grandemente facilitados graças à utilização de uma esteira rolante, na qual as frutas são colocadas e transportadas para fora dos talhões tão logo sejam colhidas.

No Brasil, o trabalho de colheita geralmente é feito com auxílio de um facão, com o coletor tendo as mãos protegidas por luvas de lona grossa. Enquanto com a mão esquerda segura o fruto pela coroa, com a direita secciona, com o facão, a haste a 5-6 cm abaixo da fruta. As frutas colhidas vão sendo entregues a outro operário, que é encarregado de transportá-las em cestas até a margem do carreador. Necessita-se, em média, três carregadores para cada colhedor.

### 2.2.3. Caracterização da Fruta

Em vista da grande comercialização do abacaxi, tanto no mercado interno como internacional, e também para a indústria, e cuja produção agrícola vem aumentando de ano para ano, os produtores devem procurar manter um padrão de qualidade da fruta a fim de garantir sua comercialização.

Para isso, é necessário que sejam observadas as seguintes características:

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

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

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

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

---

#### **2.2.4. Composição Química**

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

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

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

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

#### **2.2.5. Processamento da Fruta**

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

As técnicas industriais de preparo de fatias e pedaços para enlatamento são conhecidas internacionalmente. Linhas completamente automatizadas encontram-se em

---

várias fábricas espalhadas pelo mundo tais como Havai, Formosa, Filipinas, Tailândia, Austrália, África do Sul e outros países, no mundo todo.

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

### **2.2.6. Produtos e Subprodutos do Processamento**

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

O processamento tem início com a lavagem das frutas, que chegam do campo em grandes recipientes ou carretas, já desprovidas da coroa que pode ser utilizada para o replantio da fruta. A seguir, as frutas são conduzidas por meio de transportadoras para uma seção superior onde a lavagem é completada. Um sistema de transportadores conduz as frutas lavadas para um segundo pavimento, no qual, é feito um corte em uma das extremidades da fruta. Essa operação tem por finalidade principal eliminar as partes restantes da coroa e talo, a fim de facilitar o trabalho posterior da máquina ginaca. Essas partes eliminadas, seguem, por meio de um transportador, para a linha de processamento de ração.

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

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

O processo tem por finalidade dar um fluxo contínuo às fases posteriores, reduzindo assim a capacidade ociosa da ginaca. Esta máquina cujo nome foi dado em homenagem a seu inventor o engenheiro havaiano de sobrenome Ginaca, é completamente

automatizada e de grande capacidade (80-120 frutas por minuto), executando uma série de operações sucessivas, e que são as seguintes: - corte das extremidades, descascamento da fruta e encaminhamento do cilindro à etapa seguinte do processamento. O equipamento também é dotado de um dispositivo raspador, que erradica a polpa da casca e das extremidades do fruto. A maior parte deste material erradicado (polpa erradicada) se destina à produção de “*crush*”( espécie de salada de frutas) e uma pequena parte à produção de suco .

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

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

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

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

### **2.3. Consumo de Bromelina**

Para a utilização de bromelina, a indústria alimentícia não se apresenta como um mercado atrativo pois, vem sendo largamente utilizada a papaína no amaciamento de carnes e a grande barreira seria romper o cartel de indústrias produtoras da enzima, pois

o consumidor só compra a carne amaciada ou o amaciante de carnes sem preocupar-se com o princípio ativo do produto. Também, atualmente a África do Sul vem produzindo e exportando papaína a preços sem concorrência à princípio.

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

A concentração principal está na indústria farmacêutica brasileira. Além de ser uma das indústrias que mais investe em tecnologias e novos produtos, tendo uma previsão de investimentos no período de 1997 – 2000 de US\$ 1.300 milhões (ABIFARMA). Reflexos do plano econômico que melhorou substancialmente o poder aquisitivo dos brasileiros que estão investindo em saúde e medicamentos, o que vem refletindo no aumento da expectativa de vida pois, segundo o IBGE, o número de idosos atualmente é o dobro do registrado em 1980. A bromelina também é largamente utilizada em procedimentos técnicos de análises clínico laboratoriais.

Até bem pouco tempo atrás um novo remédio que era lançado no mercado brasileiro não tinha a sua fórmula protegida por uma proteção legal, um concorrente logo aparecia. A indústria de farmacológicos pois chega-se a gastar 15 anos com pesquisas, o que gera um investimento de capital em torno de US\$ 700 milhões. Com esta proteção que dura 20 anos até a patente ser de conhecimento público.

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

## 2.4. Separação e Purificação de Proteínas

O processo de separação e purificação de bioprodutos, também chamado “ *downstream processing* “, é atualmente um segmento muito importante na indústria tecnológica, pois pode chegar a representar de 80 a 90% do custo de produção. Portanto, o desenvolvimento de um processo eficiente e de baixo custo é de extrema importância ( BELTER et al, 1998).

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

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

A purificação e separação de proteínas baseadas nos princípios de partição em sistemas de duas fases aquosas tem sido muito desenvolvido nos últimos anos. Esta técnica de extração parece ser especialmente adequada para as primeiras etapas dos procedimentos

---

de separação, mas pode substituir etapas cromatográficas ou ser aplicada antes da cromatografia. ( HUSTEDT et al, 1985).

### **2.4.1 Extração Líquido-Líquido**

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

A extração líquido-líquido, que é um dos principais métodos adotados industrialmente, é um processo que envolve a transferência de massa entre dois líquidos imiscíveis. Na extração líquido- líquido , a separação de um componente de uma solução líquida homogênea ocorre pela adição de um constituinte líquido, insolúvel ou parcialmente solúvel, o solvente, no qual o componente a ser extraído da solução, o soluto, é preferencialmente solúvel. O soluto difunde-se no solvente com uma velocidade característica até atingir as concentrações de equilíbrio em cada uma das fases formadas. Este processo de separação é baseado na distribuição do soluto entre as fases e a miscibilidade parcial dos líquidos.( RABELO, 1999).

#### **2.4.1.1. Sistemas de Duas Fases Aquosas**

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

- O meio não deve ser tóxico ao sistema biológico nem ao homem;
- A recuperação do bioproduto a partir do meio extrator deve ser fácil;
- Deve ter baixo custo e estar disponível comercialmente em grande quantidade;
- Ser possível de esterilizar;

- 
- Ser imiscível ou parcialmente miscível com soluções aquosas;
  - Não deve apresentar tendências de formação de emulsões estáveis com materiais biológicos;
  - Não ser inflamável.

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

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

O uso de solventes orgânicos é, normalmente, limitado pelas características hidrofílicas dos produtos de fermentação, levando à necessidade de utilização de elevadas razões entre as fases orgânica e aquosa, devido aos baixos coeficientes de partição dos produtos em relação ao solvente orgânico. Além disso, os solventes orgânicos são geralmente tóxicos para as proteínas e, também, provocam desnaturação das mesmas.

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

---

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

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

Albertsson reconheceu a possibilidade de utilizar-se sistemas de duas fases aquosas como um método de separação aplicado a materiais biológicos sob condições que preservam a sua atividade biológica. Além disso, os sistemas de duas fases aquosas são usados também na determinação de propriedades superficiais de biomoléculas, tais como, carga e hidrofobicidade. Assim, ao lado de trabalhos no campo tecnológico existe também o interesse na utilização da partição como meio de preparação de amostras para uso em técnicas analíticas. Para tanto, são aplicados os diferentes tipos de sistemas de duas fases aquosas existentes.

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

ALBERTSSON (1971) comparou sistemas de duas fases aquosas com os solventes mais convencionais, de acordo com a natureza hidrofóbica, hidrofílica. A fase rica em sal é mais hidrofílica e a fase rica em PEG( polietilenoglicol) é mais hidrofóbica.

---

Considera-se que a separação de moléculas, incluindo proteínas, em sistemas de duas fases aquosas é dependente das características da superfície molecular dos compostos a serem particionados tais como: carga, tamanho e propriedades hidrofóbicas.

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

#### **2.4.1.2. Tipos de Sistemas de Duas Fases Aquosas**

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

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

a) dois polímeros não iônicos

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

b) um polieletrólito e um polímero não iônico

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

c) dois polieletrólitos

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

d) um polímero não iônico e um composto de baixo peso molecular

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

Há ainda novos sistemas formados por PEG/FeSO<sub>4</sub> e PEG/Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> que apresentam algumas vantagens em relação aos sistemas com sais de fosfato e citrato, como, por exemplo, o baixo nível de PEG na fase salina, que reduz as perdas do PEG e facilita a purificação das biomoléculas e a reciclagem do PEG. Nesse tipo de sistema foi observado que a concentração de sal na fase PEG e a concentração na fase salina tendem a diminuir com o aumento da temperatura (PATHAK et al, 1991).

Apesar da grande variedade de sistemas de duas fases aquosas, a quantidade de sistemas realmente aplicáveis para extração líquido-líquido fica reduzida basicamente aos formados por PEG/sal (fosfato/citrato/sulfato) e PEG/dextrana, quando se levam em consideração fatores importantes do ponto de vista industrial, como custo e possibilidade de reciclagem dos reagentes, tempo de separação das fases, possibilidade de esterilização, atoxicidade e faixa de aplicação. Devido a tais fatores, os estudos mais recentes tendem a concentrar-se mais nesses dois sistemas, sendo o sistema PEG/sal o mais estudado devido ao seu baixo custo e menor tempo de separação das fases em relação ao sistema PEG/dextrana ( COIMBRA, 1995).

#### **2.4.1.3. Sistema PEG/Sal**

A formação de sistemas PEG/sal foi primeiro observada por Albertsson nos anos 50, mas os fundamentos teóricos ainda não são bem explicados.

Eles foram introduzidos para a aplicação prática da separação de proteínas em larga escala devido à maior diferença de densidade entre as fases, menor viscosidade e menores custos; levando a uma separação mais rápida que para os sistemas PEG/dextrana. A aplicação industrial de sistemas PEG/sal foi incentivada e desenvolvida pela disponibilidade de separadores comerciais que permitam separações de proteínas continuamente e de forma mais rápida. (KULA, 1990 e FRANCO,1992).

Para sistemas PEG/sal, os efeitos de “salting out” parecem atuar aumentando o comprimento da linha de amarração, retirando as proteínas da fase salina para a fase rica em PEG, ou, se a solubilidade da proteína na fase rica em PEG não for suficiente, elas tendem a precipitar na interface. Os limites de solubilidade e “salting out” são dependentes das proteínas, portanto uma resposta diferencial é esperada quando uma mistura de proteínas é manipulada (KULA, 1982).

#### 2.4.1.4. Polietileno Glicol

O polietileno glicol,  $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ , é um poliéster sintético neutro, linear ou de cadeia ramificada, disponível numa grande variedade de pesos moleculares, de poucas centenas à milhares de daltons. Solubiliza-se em água e em diferentes solventes orgânicos. A sua solubilização em água é atribuída à ligação das moléculas de água a muitas ou todas as moléculas em torno da cadeia de polietileno. Essa ligação ocorre pelo mecanismo de pontes de hidrogênio. Ligações deste tipo são relativamente fracas e podem ser quebradas de várias maneiras.

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

Sendo não antigênico nem imunogênico foi aprovado pelo FDA, “Food and Drug Administration”. Devido à sua capacidade de formação de uma camada protetora, o PEG pode diminuir a taxa de rejeição de materiais em sistemas biológicos em humanos. Devido às suas propriedades, o PEG tem uma série de aplicações farmacêuticas, biológicas e bioquímicas. Ele pode formar um composto ativado PEG-proteína que mantém a proteína ativa e diminui consideravelmente a reação imune, além de aumentar o tempo de vida de soros sanguíneos. Ele pode ser ligado também a superfícies, formando uma camada

protetora e biocompatível, para ser empregado em aparelhos de diagnósticos, substituição de artérias e dispositivos relacionados a sangue. O “PEG protetor” pode ser usado também para evitar a adsorção de proteínas em análises bioquímicas de eletroforese por zona capilar, que é uma importante técnica analítica empregada em bioquímica. Além disso, o PEG pode ser usado com lipossomas para a liberação controlada e distribuição seletiva de medicamentos, pois os lipossomas sem o PEG podem ser rapidamente atacados e eliminados do corpo humano, sem cumprir a sua função. Por ser solúvel em muitos solventes orgânicos, o PEG pode ser utilizado para solubilizar enzimas neste meio sem desnaturá-las através da formação de uma camada protetora. Além disso, compostos insolúveis em água podem tornar-se solúveis quando ligados ao PEG, como por exemplo substratos de enzimas, cofatores, corantes, etc. (HARRIS, 1992).

#### **2.4.1.5. Recuperação de Sais e Polímeros**

A possibilidade de reutilização dos constituintes das fases deve ser considerada ao se efetuar o “scale up” pois os custos dos componentes das fases aumentam linearmente com a escala de produção (KRONER et al., 1982).

A reciclagem de PEG pode ser facilmente integrada ao processo, chegando a níveis de recuperação em torno de 90 a 95% (HUSTEDT et al., 1988). As técnicas de recuperação de PEG mais usadas são a ultrafiltração e a extração com solvente orgânico seguida de evaporação (COIMBRA, 1995).

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

GREVE & KULA (1991) recentemente estudaram maneiras de reciclar a fase fosfato desses sistemas para minimizar a poluição ambiental. A reciclagem da fase fosfato

foi obtida pela sua separação através do uso de álcoois. O PEG da fase do topo rica em PEG pode também ser reciclado, como pode ser visto em alguns trabalhos de Kula e Hustedt, principalmente.

#### **2.4.2. Teoria de Formação das Fases**

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

A grande maioria dos modelos está contida em dois grupos básicos: um grupo baseado na teoria da solução de polímeros, e outro grupo com teorias adaptadas dos tratamentos termodinâmicos do equilíbrio de fase líquida. Dentro desses dois grupos, a modelagem de formação das fases pode ser dividida em quatro tipos: modelos baseados em expansão virial osmótica; modelos baseados na extensão da teoria de Flory-Huggins; modelos incorporando a teoria da equação integral como principal elemento; modelos que não se encaixam em nenhuma destas categorias, como o modelo de volume excluído. Existe ainda, o modelo Pitzer que é o mais aplicável para os sistemas polímero-sal. No caso dos sistemas polímero-sal, ainda não existem muitas teorias que se apliquem bem a este tipo de sistema, pois a maioria não considera o efeito dos eletrólitos nas soluções, levando a um erro na modelagem da formação das fases. Além disso, o estudo de tais sistemas ainda é muito recente (CABEZAS Jr, 1996, WU et al, 1996, WALTER et al. 1991).

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

O modelo de expansão virial osmótico ficou mais conhecido com o desenvolvimento do trabalho de Edmond e Ogston. O equacionamento matemático e a interpretação física dos parâmetros do modelo não são complicados. Existem dois tipos diferentes de expansão virial osmótica, uma é a teoria de McMillan- Mayer e a outra é a

teoria de Hill. Na teoria de McMillan- Mayer, o solvente é tratado como uma substância sem características especiais, e portanto considera-se somente a interação entre as moléculas do soluto, simplificando muito os mecanismos estatísticos do problema. Porém, aqui existe a necessidade de correção da pressão pois como o solvente não é importante, o seu potencial químico deve ser constante e independente do soluto e portanto a pressão não pode ser constante. Logo, para se utilizar esse modelo em condição de pressão constante, deve-se acrescentar a pressão osmótica da solução. Já a teoria de Hill não considera o solvente como uma substância secundária e por isso os potenciais químicos dos componentes podem ser determinados em temperatura e pressão constantes ( CABEZAS Jr, 1996).

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

Outra teoria muito utilizada nos sistemas polímero-polímero, para modelar a curva binodal, é a do volume excluído, baseada em argumentos estatísticos e geométricos: as duas fases estão saturadas com cada polímero, ou seja, todo o volume está ocupado pelas moléculas dos dois polímeros e da água de hidratação; a concentração de cada polímero em cada fase é determinada pela quantidade de moléculas de cada polímero ajustado no volume da fase.

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

A teoria de Debye-Huckel é a mais adequada para os sistemas que contém soluções com cargas, como é o caso dos sistemas polímero-sal ou sistemas polímero-polímero com sais. Essa teoria leva em consideração a distribuição dos íons na solução para o cálculo de potencial químico e é mais utilizada em soluções com concentração iônica até 0,1 M, de onde se obtém ótimos resultados. À medida que a concentração iônica aumenta, o desvio entre os resultados teóricos e experimentais aumenta. Isso ocorre porque a teoria é precisa apenas para soluções diluídas, onde o comportamento eletrostático domina. Em soluções concentradas, o comportamento eletrostático é reduzido devido à presença de muitos íons que tendem a isolar as cargas eletrostáticas entre si (CABEZAS Jr, 1996).

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

### **2.4.2.1. Tempo de Separação das Fases**

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

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

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

### **2.4.2.2. Fatores que Influenciam no Sistema de Fases**

Os principais fatores que influenciam no sistema de fases e conseqüentemente alteram o diagrama de fases são: peso molecular do polímero, concentração dos componentes do sistema e temperatura.

Quanto maior o peso molecular do polímero, menor a concentração necessária para a formação de duas fases. Isso significa que a curva binodal desloca-se no sentido da região monofásica à medida que o peso molecular do polímero aumenta. Para um sistema polímero-polímero ( PEG/dextrana, por exemplo) a curva binodal torna-se cada vez mais assimétrica a medida que a diferença entre os pesos moleculares dos polímeros aumenta. O peso molecular do polímero afeta também o tempo de separação das fases, mas tal problema pode ser minimizado pela centrifugação do sistema após a mistura das fases (

ALBERTSSON, 1986, ALBERTSSON et al., 1994). Ele afeta também o comprimento da linha de amarração, que tende a aumentar com o aumento da concentração dos polímeros (FORCINTI et al., 1991).

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

A temperatura causa influência no diagrama de fases pois altera a composição das fases no equilíbrio, deslocando a curva binodal, e modificando também o comprimento da linha de amarração. Em geral, o comprimento da linha de amarração diminui com o aumento de temperatura. O seu efeito varia de acordo com o tipo de sistema. No caso de sistemas PEG/dextrana, a formação das fases é facilitada em temperaturas baixas (menores que a ambiente) e para os sistemas PEG/fosfato, a situação é oposta, pois temperaturas mais altas e próximas do ambiente facilitam a separação entre as fases. Quando o sistema está próximo ao ponto crítico, ele é mais instável devido ao deslocamento da curva binodal, podendo atingir mais facilmente a região monofásica. O aumento da temperatura do sistema causa ainda, em um sistema PEG/sal, aumento na concentração de PEG na fase polimérica e redução da sua concentração na fase salina. Esse efeito é uma das razões de se trabalhar com a temperatura do sistema fixa.

O pH e o tipo de cátion também são variáveis que podem influenciar no diagrama de fases. Diminuindo o valor do pH, as concentrações necessárias de polímero e sal de um sistema PEG/sal aumenta, deslocando a curva binodal para a direita. Esse fato pode ser explicado pelo aumento da razão  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ , para o caso do fosfato, com a diminuição do pH, pois como o ânion monovalente é menos efetivo no “salting out” do PEG (fenômeno de expulsão devido ao tamanho do PEG), será necessária uma concentração maior dos componentes para formar o sistema bifásico. No caso do tipo de cátion, a substituição de fosfato de potássio desloca a curva binodal para a direita, e portanto a concentração dos componentes necessária para a formação do sistema de duas fases aumenta, sugerindo que o cátion sódio é mais eficiente que o cátion potássio para o efeito do “salting out” do PEG.

### 2.4.2. 3. Diagrama de Fases

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

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

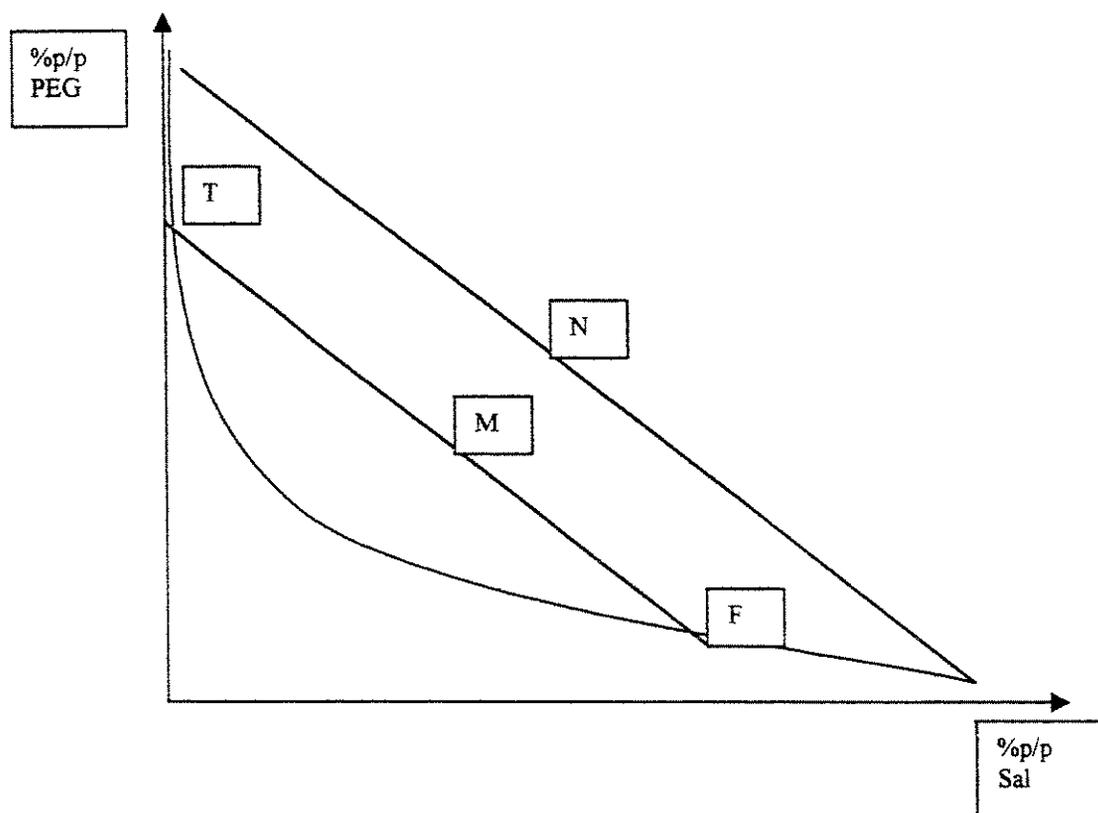


Figura 1: Exemplo de um Diagrama de Fases Genérico

A figura 1 mostra um exemplo genérico de um diagrama de fases. A composição inicial do sistema é dado pelo ponto M e a composição final de cada fase após atingir o equilíbrio é dadas pelos pontos T ( fase superior ou de topo) e F ( fase inferior ou de fundo). O segmento TMF é chamado de *tie-line* ou linha de amarração, e todos os sistemas cuja composição inicial está contida nessa linha possuem a mesma composição de fases após o

---

equilíbrio, porém com diferentes razões de volumes entre as fases superior e inferior. Já a linha de amarração determinada pelo ponto N define uma nova linha de amarração que aumentou proporcionalmente a concentração entre as fases em relação à linha de amarração determinada por M.

Como poderemos observar o fato de mudarmos da linha de amarração, definida pelo ponto M, para a linha de amarração definida pelo ponto N, variando proporcionalmente a concentração dos componentes das fases, não obteremos uma melhora significativa na recuperação e purificação da proteína em estudo.

### **2.4.3. Fundamentos da partição das proteínas**

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

A tendência de separação de fases apresentada por dois polímeros quando adicionados num solvente comum, ocorre porque a baixa concentração molar dos polímeros na solução (tipicamente menos que 0,05 M) leva a um pequeno ganho de entropia durante a mistura. Por outro lado, cadeias poliméricas têm uma área superficial por molécula maior do que compostos de baixo peso molecular, tanto que as energias de interação entre dois polímeros se sobrepõem à energia de Gibbs do sistema. Estes fatores levam à formação de duas fases em sistemas ternários polímero-polímero-água, em baixas concentrações de polímeros.

A modelagem quantitativa da partição de proteínas em sistemas de duas fases aquosas representa um complexo problema pelo fato do comportamento do sistema depender de vários fatores tais quais, tamanho da molécula, conformação, estrutura da superfície, interações de polímeros com as cadeias de proteínas e com diferentes sais, interações polímero-polímero, sal-proteína, proteína-proteína e, quando usados, as interações dos ligantes com os outros componentes presentes. Estudos empíricos com

---

sistemas de duas fases aquosas mostraram que a distribuição da proteína é função de diversos fatores, como ( BASKIR et al. , 1989):

- tipo dos polímeros que formam as fases: peso molecular médio, distribuição do peso molecular, modificações químicas poliméricas.
- composição das fases: comprimento da linha de amarração, tipos de íons presentes ou adicionados ao sistema, força iônica.
- biomolécula: tamanho, carga, propriedades superficiais, concentração.
- pH e temperatura.

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

#### 2.4.3.1. Coeficiente de Partição

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

$$K = C_T / C_F \quad \text{equação 1}$$

Onde:

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

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

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

substâncias de interesse são produtos biotecnológicos, principalmente proteínas e enzimas, às quais normalmente o K está associado.

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

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

#### **2.4.3.2. Influência do Peso Molecular do Polímero e da Proteína no Coeficiente de Partição**

O peso molecular do polímero influencia o valor de K. Em um sistema PEG/sal, se o peso molecular do PEG for elevado, a partição da proteína será mais favorável à fase salina. Caso o peso molecular do PEG seja baixo, ocorrerá o oposto, sendo a partição favorável à fase polimérica. O mesmo ocorre nos sistemas PEG/dextrana: se o peso molecular do PEG for elevado e o da dextrana for baixo, a partição será favorável à fase contendo dextrana. Isso ocorre provavelmente devido ao aumento do efeito do volume excluído que ocorre na fase PEG. Esse efeito é menor para substâncias de baixo peso molecular.

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

O K depende também do peso molecular da proteína. Ele diminui com aumento do peso molecular e a magnitude dessa diminuição é maior para PEG com baixo peso molecular e tende a ficar estável para PEG com alto peso molecular (BAMBERGER et al., 1985, ALBERTSSON, 1986, FORCINITI et al., 1991). O tipo de proteína também influi no valor de K, porque as proteínas são macromoléculas polieletrólitas que carregam cargas

quando estão em soluções aquosas. As cargas dependem da composição, da sequência de aminoácidos, e também das propriedades da solução aquosa, como o pH e a concentração dos solutos (SCHLUCK et al., 1995).

#### **2.4.3. 3. Influência do pH do Sistema no Coeficiente de Partição**

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

Na partição da cutinase o K aumenta com o aumento do pH devido ao deslocamento da curva binodal. Além disso, aumentando o pH, a concentração do ânion  $\text{HPO}_4^{2-}$  aumenta em relação ao ânion  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , o que aumenta o efeito do 'salting out' fazendo com que a cutinase migre para a fase PEG (SEBASTIÃO et al., 1994)

#### **2.4.3.4 Influência das Interações entre a Proteína e o Sistema de Fases no Coeficiente de Partição**

Para o entendimento da influência de alguns fatores em K, é importante compreender o que é solubilidade de proteínas. Uma proteína apresenta uma superfície formada por regiões carregadas positivamente e negativamente, além de possuir regiões hidrofílicas e hidrofóbicas. A distribuição dessas regiões depende do tipo de proteína. A solubilidade da proteína é determinada pelas interações entre tais regiões e o solvente que está presente no meio onde ela está contida. A solubilidade depende, portanto, de fatores termodinâmicos que favorecem ou não a sua solubilidade no solvente. O aumento da proporção de zonas hidrófobas na superfície da proteína resulta no aumento da afinidade a solventes apolares, como é o caso do PEG, fazendo com que esta permaneça na fase superior.

A solubilidade das proteínas nas soluções de PEG depende da interação hidrofóbica entre a proteína e o grupo etileno do PEG. Isso pode explicar a alta tendência das proteínas

hidrófobas de se deslocarem para a fase superior rica em PEG. Neste caso, o PEG tende a interagir fortemente com as regiões apolares da proteína ( SCHMIDT et al., 1996).

#### **2.4.3.5. Influência da Concentração dos Componentes do Sistema no Coeficiente de Partição**

A concentração dos componentes do sistema e portanto, o comprimento da linha de amarração , também afetam o K. Em sistemas próximos ao ponto crítico, as proteínas em geral apresentam uma partição igual entre as duas fases, portanto o valor de K é igual a 1. Com o aumento da concentração dos componentes, que corresponde a um aumento no comprimento da linha de amarração, o valor de K será maior ou menor que 1 dependendo do tipo de proteína. Existem exceções a essa regra, podendo ocorrer valores de K diferentes de 1 para sistemas próximos ao ponto crítico, ou K pode aumentar com o aumento da concentração dos componentes até um máximo e depois diminuir. Para o caso de células ou particulados, o K é maior para os sistemas próximos ao ponto crítico. O efeito do comprimento da linha de amarração em K é maior em proteínas com alto peso molecular. Além disso, para um sistema PEG/sal, um aumento no comprimento da linha de amarração leva a um aumento da concentração de sal na fase inferior e a um valor praticamente constante na fase superior, favorecendo o efeito do “salting out” da fase rica em sal para a fase rica em PEG ( BAMBERGER et al., 1985, ALBERTSSON, 1986, MINAMI, 1997).

#### **2.4.3.6. Influência da Concentração de Proteínas no Coeficiente de Partição**

O K depende também da concentração da proteína presente na amostra. Para determinar seu valor é importante trabalhar com concentrações não muito altas de proteínas ( de preferência menores que 1g/L), pois essas concentrações podem provocar a precipitação da proteína devido a presença de PEG(SCHMIDT et al, 1996).

A concentração de proteínas também é importante perto do ponto crítico, pois ao se adicionar uma pequena quantidade de proteína em um sistema próximo ao ponto crítico, o diagrama de fases pode modificar-se deslocando a curva binodal, como ocorre quando adicionamos uma pequena quantidade de água. Com isso, o valor de K poderá mudar ( MINAMI, 1997). Quando o sistema está afastado do ponto crítico, não ocorre deslocamento da curva binodal para concentrações muito baixas de proteína, pois a composição das fases praticamente não se modifica com a adição de proteína. Porém, para

altas concentrações pode haver influência na formação das fases que provoca redistribuição dos componentes do sistema, modificando o diagrama de fases e, conseqüentemente, o valor de K ( GUAN et al, 1994).

#### 2.4.3. 7. Modelagem Matemática do Coeficiente de Partição

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

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

- Fator do tamanho, que existe quando a partição depende do tamanho da molécula ou da área superficial das partículas;
- Fator eletroquímico, que surge quando o potencial elétrico existente entre as fases do sistema é usado para separar as moléculas de acordo com a sua carga elétrica;
- Fator de afinidade hidrofóbica, que é a utilização das propriedades hidrofóbicas do sistema de fase para separar as moléculas em função da sua hidrofobicidade;
- Fator de afinidade bioespecífica, que utiliza a afinidade entre os locais da molécula como ligantes do polímero para a separação;
- Fator de conformação, que é considerado quando a conformação da molécula é o fator predominante.

Esses fatores podem ser agrupados na seguinte equação:

$$\ln K = \ln K^0 + \ln K_{eletro} + \ln K_{bioesp} + \ln K_{tam} + \ln K_{conf}$$

Onde:

---

$K_{\text{eletro}}$  é o fator eletroquímico;

$K_{\text{hidrof.}}$  é o fator de afinidade hidrofóbica;

$K_{\text{bioesp}}$  é o fator de afinidade bioespecífica;

$K_{\text{tam}}$  é o fato do tamanho;

$K_{\text{conf}}$  é o fator de conformação;

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

## 2.5. Planejamento Fatorial

O planejamento fatorial é uma ferramenta estatística que vem sendo utilizada com muita frequência em trabalhos experimentais. Consiste na realização de um estudo sobre um fenômeno, que possua muitas variáveis que precisem ser analisadas de maneira organizada, a fim de delinear um caminho que conduza ao objetivo planejado utilizando-se de um número mínimo de experimentos.

Por esta técnica é possível constatar quais são as variáveis de maior importância para os resultados esperados no processo, a influência individual de cada uma delas e as interações que estas variáveis possuem entre si, concernente a resposta global do fenômeno. Quando rigorosamente aplicado, o método gera a possibilidade de avaliar os erros experimentais e de regressão e a modelagem matemática empírica dos resultados em função das variáveis escolhidas, caracterizando o fenômeno. BRUNS et al ( 1996), faz uma descrição detalhada do método.

A construção de um planejamento fatorial começa pela escolha do número de níveis em que se deseja estudar cada uma das variáveis do sistema, e assim efetuar as possíveis combinações. Um estudo em dois níveis de “n” variáveis resultaria em  $2^n$  experimentos mínimos a serem realizados. O número de níveis e variáveis a serem estudados aumentam proporcionalmente o número de ensaios a serem realizados.

A segunda etapa do método é a escolha de um ponto de ensaio com valores definidos pela média intermediária entre dois níveis escolhidos de cada variável e a realização de ensaios em triplicata neste ponto. Assim, após a obtenção destes dados pode-

---

se calcular os efeitos individuais e de interação sobre a resposta, estimar os erros experimentais e determinar quais são os efeitos mais significativos.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho experimental foi conduzido no Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Engenharia Industrial - FEI. Foram utilizados abacaxis de variadas espécies adquiridos no mercado. Os demais reagentes utilizados foram grau analítico.

#### 3.1. Preparo da Amostra

As amostras foram preparadas com abacaxi de diversos tipos, encontrados em mercados e , exceto a coroa, foram triturados e filtrados eliminando as fibras, e armazenados , à temperatura de  $-18^{\circ}\text{C}$ . Para os ensaios as amostras foram descongeladas e utilizadas no mesmo dia. Caso a quantidade de amostra descongelada não fosse utilizada, era novamente congelada.

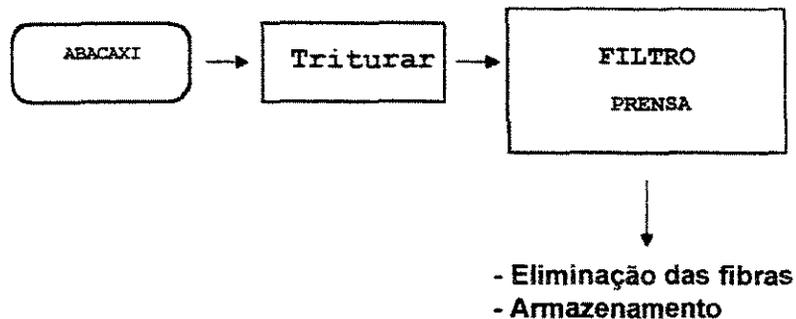


Figura 2: Preparo da amostra

### 3.1.1. Preparo das Soluções Estoques

Os ensaios foram realizados a partir de soluções estoques concentradas de PEG e tampão fosfato para facilitar a preparação dos sistemas bifásicos.

a) Solução estoque de tampão fosfato pH 7, com concentração de 40 % p/p.

Pesaram-se 14 g de fosfato de potássio monobásico e 26 g de fosfato de potássio dibásico que foram dissolvidos em 60 g de água deionizada. Em seguida verificou-se o pH da solução.

b) Solução estoque de tampão fosfato pH 9, com concentração de 40 % p/p.

Pesaram-se 1,67 g de fosfato de potássio monobásico e 38,33 g de fosfato de potássio dibásico que foram dissolvidos em 60 g de água destilada. Em seguida verificou-se o pH da solução.

c) Solução estoque de PEG, com concentração 50% p/p para PEG de peso molecular 1500 e 4000.

Pesaram-se 50 g de PEG (1500, 4000) que foram dissolvidos em 50 g de água deionizada.

### 3.2. Extração

Os sistemas foram preparados a partir de soluções estoque de PEG e fosfato. Esses sistemas foram preparados, pesando-se em tubo de centrífuga graduado de 15 mL, a quantidade de solução estoque de cada componente necessária para a obtenção da composição desejada. Em seguida foram adicionados 1g de caldo de abacaxi e , por fim, a quantidade de água para atingir 5g de sistema.

Depois de preparados, os sistemas foram agitados em vórtice por 45 s e em seguida, centrifugados a 1000g por 5 minutos, para atingir a separação das fases mais rapidamente.

Posteriormente, foram retiradas aliquotas das fases superior e inferior, com o auxílio de uma pipeta automática, para a determinação da atividade enzimática e proteína total.

A figura 3 mostra a rotina dos ensaios.

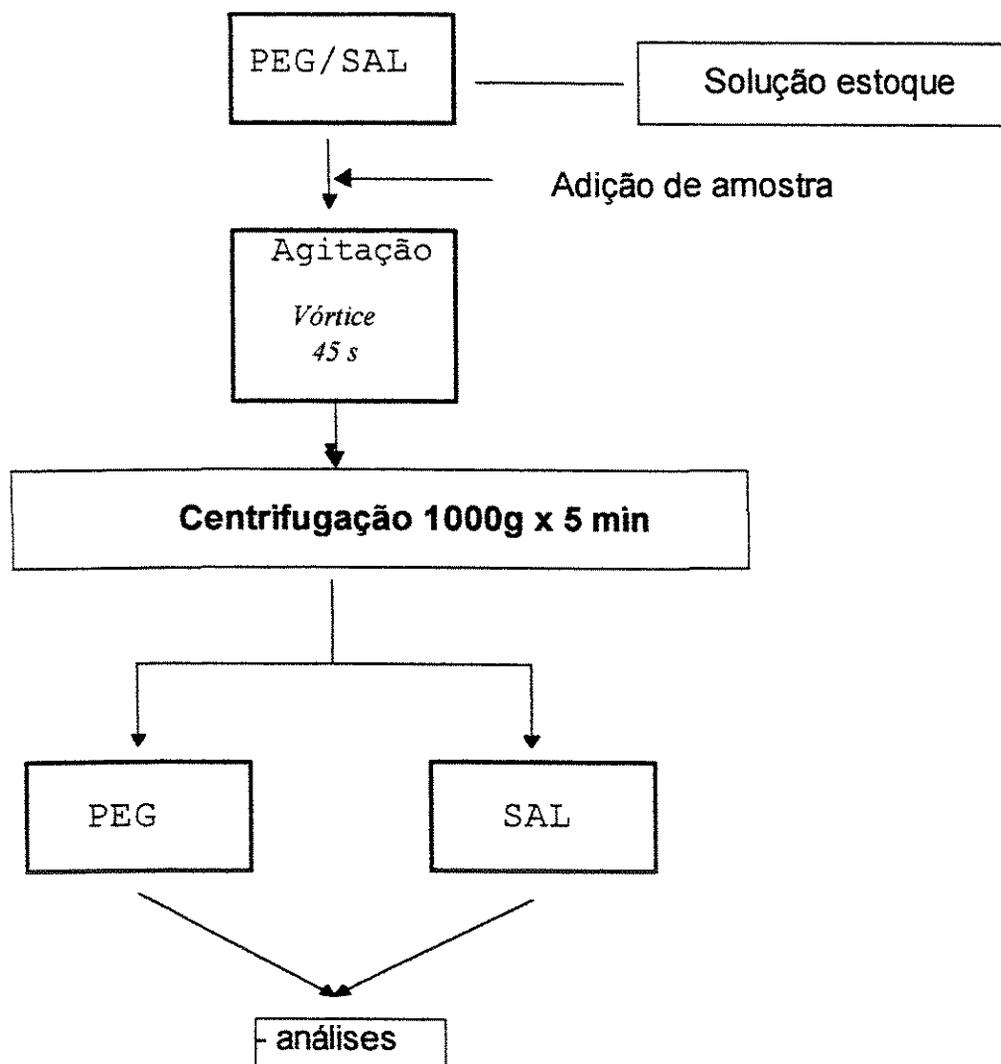


Figura 3: Esquema da extração

## **3.2. Métodos Analíticos**

### **3.2.1. Determinação de Proteína Total**

O método de BRADFORD (1976) foi utilizado para determinar a concentração de proteínas totais presentes nas duas fases. Este método baseia-se na ligação da substância Coomassie Brilliant Blue G-250 com a proteína, formando um complexo colorido que possui máxima absorção de cor na faixa de 465 a 595 nm.

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

#### **Procedimento:**

Em um tubo de ensaio colocam-se 100  $\mu$ L da amostra e 5 mL do reativo. Agita-se o tubo em vórtice e deixa-se em repouso por 5 minutos. Em seguida, lê-se a absorbância das amostras a 595 nm. O branco foi preparado com água destilada. Para os cálculos da concentração de proteína, fez-se uma curva de calibração utilizando soluções de albumina bovina (BSA) com concentrações variando de 100 a 1000mg/L.

### **3.2.2. Determinação da Atividade Enzimática**

A atividade proteolítica foi determinada pelo método descrito por MURACHI (1976) e BALDINI *et. al.* (1993) através da hidrólise enzimática da caseína a 1,2% (p/v) pH 6,0 a 35°C durante 10 minutos, seguindo-se de precipitação do substrato não hidrolisado com solução de ácido tricloroacético (TCA). No branco, a adição de solução de TCA foi feita antes da adição da enzima. A quantidade de produtos hidrolíticos não precipitados, ou seja, de peptídeos solúveis em TCA foi determinada a 280 nm contra um branco.

Uma unidade de atividade enzimática corresponde a quantidade de enzima capaz de variar em uma unidade a leitura de absorbância a 280 nm, durante 10 min a 35°C.

A atividade específica foi expressa como unidades de enzima por mg de proteínas.

### 3.3. Metodologia de Cálculo

#### 3.3.1. Coeficiente de Partição

$$K = \frac{[fasesuperior]}{[faseinferior]} \quad \text{Equação 3}$$

$$K_p = \frac{P_{topo}}{P_{fundo}} \quad \text{Equação 4}$$

Então:

$$K_a = \frac{A_{topo}}{A_{fundo}} \quad \text{Equação 5}$$

Onde:

$A_{topo}$  é a atividade enzimática da fase superior (U/mg de proteína)

$A_{fundo}$  é a atividade enzimática da fase inferior (U/mg de proteína)

$P_{topo}$  é a concentração de proteínas totais na fase superior (mg/L)

$P_{fundo}$  é a concentração de proteínas totais na fase inferior (mg/L)

### 3.3.2. Atividade Específica

A atividade específica foi calculada pela equação 6:

$$A_e = \frac{A}{P} \quad \text{Equação 6}$$

Onde: A é atividade enzimática (mg/L)

P é a concentração de proteínas totais ( mg/L)

### 3.4. Planejamento Fatorial

Como estão sendo levadas em consideração, três variáveis: concentração das fases, pH e peso molecular do PEG, utilizou-se o planejamento denominado  $2^3$ , onde três variáveis são analisadas em dois níveis.

#### 3.4.1. Metodologia de Cálculo

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

Os ensaios forma feitos, em seu número mínimo e num ponto em triplicata a fim de a média dos valores obtidos, e o desvio padrão para a média e para os efeitos.

A figura 4 demonstra a matriz de planejamento feita para ambos planejamentos utilizados:

Concentração	pH	M PEG
-	-	-
+	-	-
-	+	-
+	+	-
-	-	+
+	-	+
-	+	+
+	+	+

Figura 4: Matriz de Planejamento Fatorial  $2^3$

Fatores	Nível (-)	Nível (+)
Concentração	15/15	17,5/17,5
pH	7	9
M PEG	1500	4000

Tabela 5: Discriminação dos efeitos e níveis

Como o planejamento é  $2^3 = 8$  ensaios, no mínimo.

### 3.4.2. Desvio Padrão

O desvio padrão (s) foi calculado através da equação 7, e representa o desvio padrão da média no ensaio realizado em triplicata:

---

$$s = \left\{ \frac{1}{(N-1)} \left[ \sum (x - x_m)^2 \right] \right\}^{1/2} \quad \text{Equação 7}$$

Onde: xi é a grandeza medida

$X_m$  é a média ente os resultados obtidos.

### 3.4.3. Desvio Padrão dos Efeitos

O desvio padrão para os efeitos, que leva em consideração o erro experimental é calculado por:

$$S_{\text{efeito}} = (s^2/2)^{1/2} \quad \text{Equação 8}$$

---

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A extração com sistemas de duas fases aquosas vem sendo estudada como uma promissora técnica para separação de proteínas e enzimas.

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

Este capítulo apresentará os resultados obtidos experimentalmente e as tendências observadas no comportamento do sistema.

Como o processo utilizado é de extração em descontínuo, avalia-se o coeficiente de partição da proteína e da atividade específica indicando quais são as melhores condições de partição para as proteínas do sistema e para a enzima em estudo.

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

### 4.1. Partição das Proteínas

A extração é estudada a fim de encontrar-se as condições relativas ao sistema de duas fases aquosas, que permitem a obtenção dos melhores resultados de extração. As condições analisadas são: comprimento da linha de amarração (concentração de PEG e sais – fosfatos de potássio), massa molecular do polímero (PEG – polietileno glicol), e pH.

O material estudado é o caldo do abacaxi, que contém bromelina e outras proteínas e enzimas. O objetivo é a obtenção do sistema ideal para obter-se a bromelina com maior grau de purificação.

Foram definidas quatro linhas de amarração, dois níveis de pH e dois valores de massa molecular do polímero. As linhas de amarração utilizadas foram escolhidas por critérios econômicos.

As linhas de amarração foram estudadas duas a duas, variando juntamente com os dois níveis do pH e da massa molecular do polímero.

#### 4.1.1. Linha de amarração 17,5/17,5% p/p e 15/15 %p/p – VARIAÇÃO 1

Primeiramente foram analisadas as linhas de amarração de 17,5/17,5%p/p e 15/15%p/p, onde a concentração global de componentes são iguais, ou seja variam proporcionalmente, aumentando apenas o comprimento da linha de amarração, e variando-se todos estes fatores foram calculados os efeitos, a partir do coeficiente de partição da proteína.

Tabela 5: Discriminação dos efeitos e níveis para Variação 1

Efeito		(-)	(+)
1	Linha de amarração	15/15	17.5/17.5
2	pH	7	9
3	M PEG	1500	4000

Tabela 6: Valores dos efeitos mais significativos para Variação 1

Efeito	Interação – Eq. 8
1	-1,813± 1,86
2	0,037± 1,86
3	1,7095± 1,86
12	-0,742± 1,86
13	-0,0535± 1,86
23	2,676 ± 1,86
123	- 3,243 ± 1,86

Os valores indicam que a linha de amarração não é um efeito significativo, pois a concentração de PEG e sal é a mesma no sistema, porém verifica-se que a massa molecular do polímero combinada com a variação de pH produzem um efeito significativo. Além da interação entre os três fatores que gera o melhor resultado.

Conforme podemos observar na figura 3, aumentando-se o pH consequentemente deve-se aumentar o peso molecular do PEG afim de obter-se a melhor partição. O aumento do coeficiente de partição com o aumento da linha de amarração pode ser atribuído a mudança na composição das fases (RABELO, 1999) Apresentamos uma comparação das linhas de amarração e os melhores resultados de partição de proteínas praticamente coincidiram nas linhas de amarração estudadas, mostrando que não houve mudança significativa na partição das proteínas com o aumento da linha de amarração. Isso pode ser atribuído a não ter havido mudança na composição relativa entre as fases .

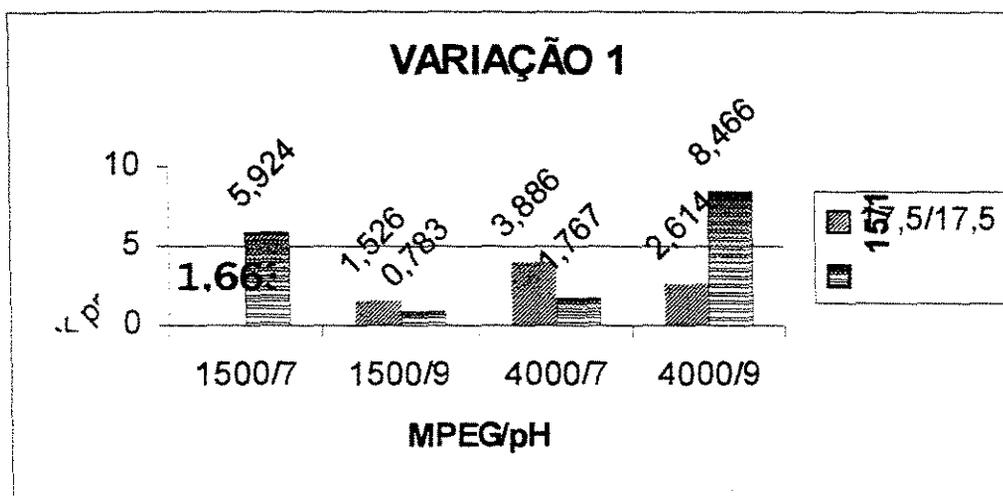


Figura 5 : Comportamento do coeficiente de partição para variação 1

#### 4.1.2. Linha de amarração 15/17,5 % p/p e 17,5/15 % p/p – Variação 2

Neste item foram analisadas as linhas de amarração de 15/17,5 p/p e 17,5/15p/p, onde a concentração global de componentes varia aumentando, em uma linha de amarração a fase PEG, e na outra a fase sal. O comprimento da linha de amarração também é alterado, e variando-se todos estes fatores foram calculados os efeitos, a partir do coeficiente de partição da proteína.

Tabela 7: Descrição dos níveis e efeitos para variação 2

Efeito		(-)	(+)
1	Linha de amarração	15/17,5	17.5/15
2	pH	7	9
3	M PEG	1500	4000

Tabela 8: Valores dos efeitos mais significativos para Variação 2

Efeito	Interação ± Eq. 8
1	-1.116± 0,698
2	-0.86± 0,698
3	0.758± 0,698
12	0.771± 0,698
13	-0.013± 0,698
23	-0.29± 0,698
123	0.3148± 0,698

Neste caso, o efeito que apresenta-se como o mais significativo é a linha de amarração. Pode-se dizer que para que haja variação significativa no comprimento da linha de amarração, deve ocorrer uma mudança significativa na concentração entre as fases.

O aumento da massa molecular do polímero aumenta a seletividade do sistema porém diminui o valor do coeficiente de partição da proteína, favorecendo a fase sal. Na figura 4, podemos perceber que aumentando-se o peso molecular do polímero, a linha de amarração que apresenta um melhor valor para K é a menos concentrada na fase salina.

Com o aumento do pH, ocorrem mudanças na distribuição de cargas da proteína. Em baixos valores de pH ocorre aumento da carga positiva e em altos valores de pH, da carga negativa. Além disso, aumentando o pH, a concentração do ânion  $\text{HPO}_4^{2-}$  aumenta em relação ao ânion  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , aumentando o efeito do “salting out”.

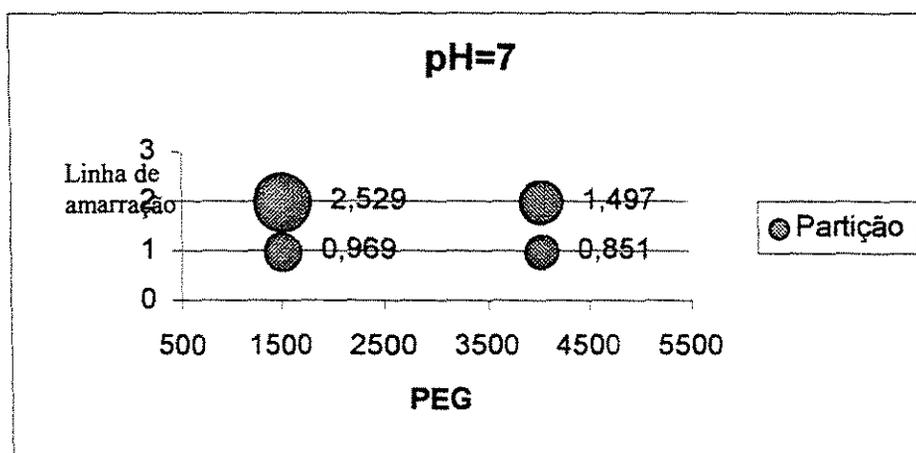


Figura 6: Comportamento do coeficiente de partição para variação 2 em pH 7

O aumento do coeficiente de partição com o aumento do comprimento da linha de amarração pode ser atribuído a mudança na composição relativa entre as fases. Um aumento do comprimento da linha de amarração promove o aumento de concentração de fosfato na fase inferior enquanto que na fase superior ela permanece relativamente constante e igual à sua solubilidade limite no PEG. Isso provoca um “salting out” de proteínas da fase rica em sal (fosfato de potássio) para a fase rica em PEG, mediada pelos efeitos do volume excluído do PEG. (RABELO, 1998)

A solubilidade das proteínas em soluções de PEG não tem sido interpretada por vários autores em termos do efeito do volume excluído do polímero (POLSON et al, 1964). Segundo a teoria desenvolvida, as proteínas são solubilizadas pelo estericarmente de regiões do polímero ocupadas pelo polímero, sendo que as solubilidades são proporcionais ao volume disponível (solvente sem PEG). Portanto, quanto maior é o volume excluído, menor é o volume de solvente disponível e a solubilidade é significativamente menor (minuição do coeficiente de partição) (PORTO, 1998).

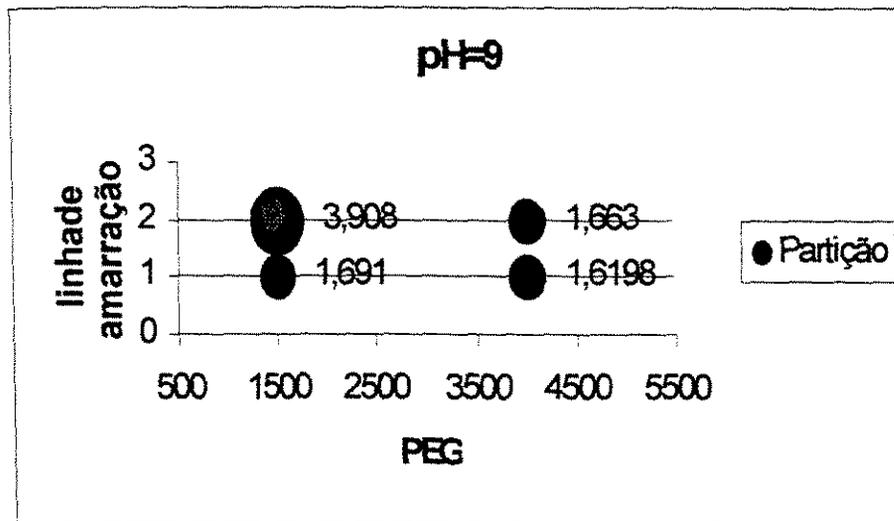


Figura 7 : Comportamento do coeficiente de partição para variação 2 em pH 9

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

A alteração da massa molecular do PEG pode provocar variações na composição das duas fases em equilíbrio, como alterações no diagrama de fases, influenciando a partição de biomateriais

## 2. Partição para Atividade Enzimática Específica

A extração é estudada a fim de encontrar as condições ótimas relativas ao sistema de duas fases aquosas, que permitam a obtenção dos melhores resultados de extração. As condições analisadas são as mesmas que para a partição de proteínas.

Estudou-se o comportamento desta variável pois é um indicador do grau de purificação obtido na partição da atividade enzimática em relação às proteínas totais no sistema, indicando possivelmente a concentração de bromelina em cada uma das fases.

As linhas de amarração, variáveis e níveis foram estudados como no item anterior.

#### 4.2.1. Linha de amarração 17,5/17,5%p/p e 15/15%p/p – VARIAÇÃO 1A

Primeiramente foram analisadas as linhas de amarração de 17,5/17,5 p/p e 15/15p/p, onde a concentração global de componentes não varia, apenas o comprimento da linha de amarração, e variando-se todos estes fatores foram calculados os efeitos, a partir do coeficiente de partição para a atividade específica da proteína.

Tabela 9: Discriminação dos efeitos e níveis para Variação 1A

Efeito		(-)	(+)
1	Linha de amarração	15/15	17.5/17.5
2	pH	7	9
3	M PEG	1500	4000

Na análise da partição da atividade enzimática específica foram obtidos os resultados apresentados na tabela 10.

Tabela 10: Efeitos e interações para a Variação 1A.

Efeito	Interação	Eq. 6
1	-0,2808± 0,2068	
2	-0,1628± 0,2068	
3	0,1574± 0,2068	
12	0,1144± 0,2068	
13	-0,2039± 0,2068	
23	-0,2244± 0,2068	
123	0,2536± 0,2068	

A interação entre todos os efeitos estudados é o melhor resultado que podemos obter. Os efeitos isolados podem ser desprezados, porém a interação entre eles influencia significativamente na partição para a atividade específica. A figura 6, ilustra a influência destes parâmetros.

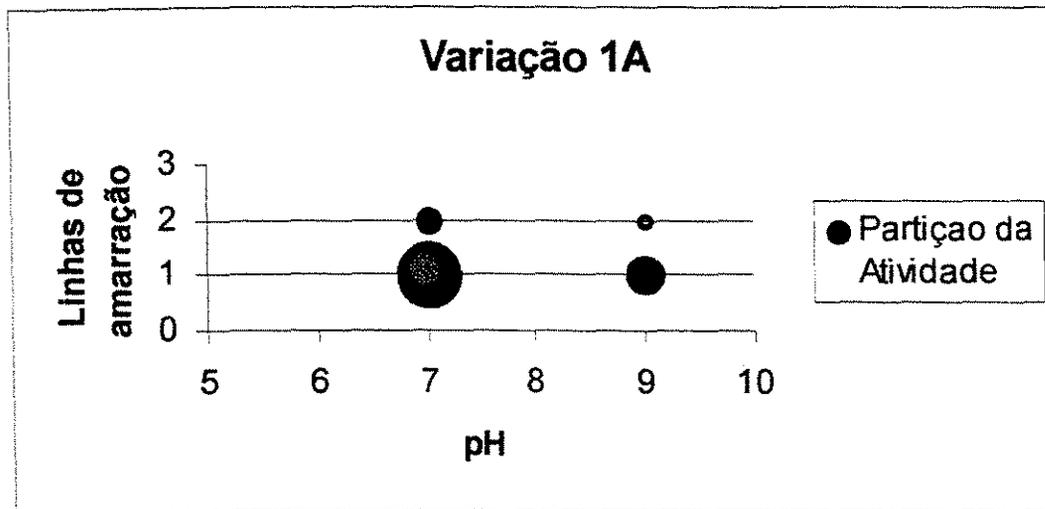


Figura 8: Influência do pH e da linha de amarração na variação 1A

Na mesma linha de amarração o aumento do pH, diminui para a fase a partição, efeito esse que pode ser explicado pelo aumento da proporção  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ . Segundo SARUBBO (2000), o ânion monovalente é menos efetivo no “salting out” do PEG.

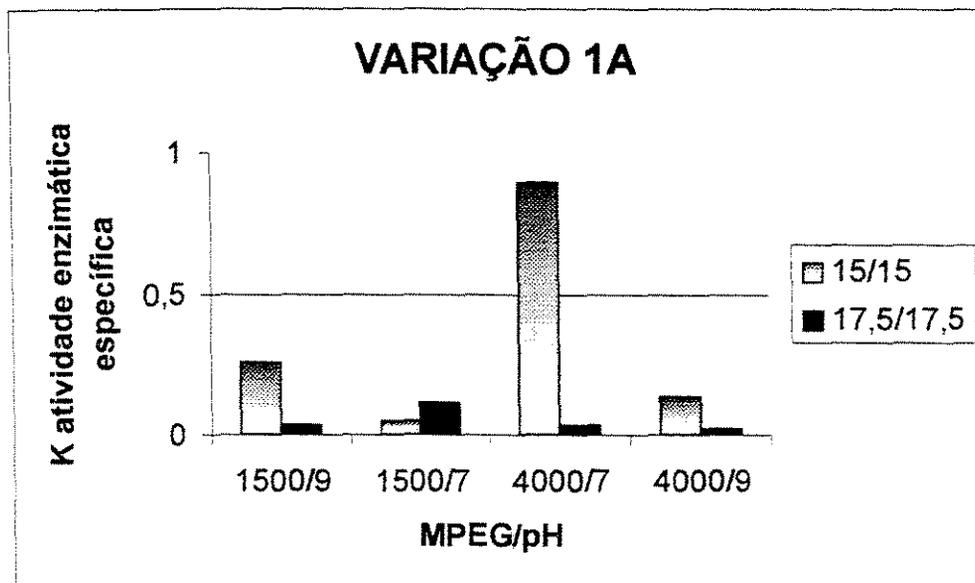


Figura 9: Comparação das linhas de amarração na Variação 1A

O efeito da massa molecular polímero pode ser atribuído ao maior número de grupos hidrofílicos terminais nas cadeias de PEG mais curtas, o que reduz a hidrofobicidade global e aos efeitos de volume excluído, que aumentam com o aumento da massa molecular do polímero(SARMENTO, 1994; HUDDLESTON, 1991).

Apresentamos uma comparação das linhas de amarração e os melhores resultados de partição de proteínas praticamente coincidiram nas linhas de amarração estudadas, mostrando que não houve mudança significativa na partição da atividade enzimática, exceto na situação de pH mais baixo e mais alto peso onde nitidamente vemos que a linha de amarração menos concentrada é a favorecida.

O PEG de maior massa molecular tende a ser mais seletivo que é interessante ao estudarmos a purificação de uma enzima que tem em seu substrato como principais contaminantes proteínas e outras enzimas.

#### 4.2.2. Linha de amarração 15/17,5 % p/p e 17,5/15 % p/p – Variação 2A

Neste item foram analisadas as linhas de amarração de 15/17,5 % p/p e 17,5/15 % p/p, onde a concentração global de componentes varia concentrando, em uma linha de amarração a fase PEG, e na outra a fase sal. O comprimento da linha de amarração também é alterado, e variando-se todos estes fatores foram calculados os efeitos, a partir do coeficiente de partição da atividade enzimática da mesma forma que anteriormente para a proteína.

Tabela 11: Descrição dos níveis e feitos para variação 2A

Fator		(-)	(+)
1	Linha de amarração	15/17,5	17.5/15
2	pH	7	9
3	M PEG	1500	4000

Tabela 12: Valores dos efeitos para Variação 2A

Efeito	Valor
1	$-0,3062 \pm 0,2916$
2	$0,448 \pm 0,2916$
3	$-0,1557 \pm 0,2916$
12	$-0,5139 \pm 0,2916$
13	$-0,0431 \pm 0,2916$
23	$0,0049 \pm 0,2916$
123	$0,1034 \pm 0,2916$

O aumento da linha de amarração aliada à variação no pH denota um maior grau de purificação. Na figura 8, podemos perceber que aumentando-se o peso molecular do polímero, a linha de amarração que apresenta um melhor valor para K é a mais concentrada na fase salina, pois esta deve ser rapidamente saturada pelos materiais solúveis que estão contidos no caldo do abacaxi facilitando o efeito do “salting out” da enzima.

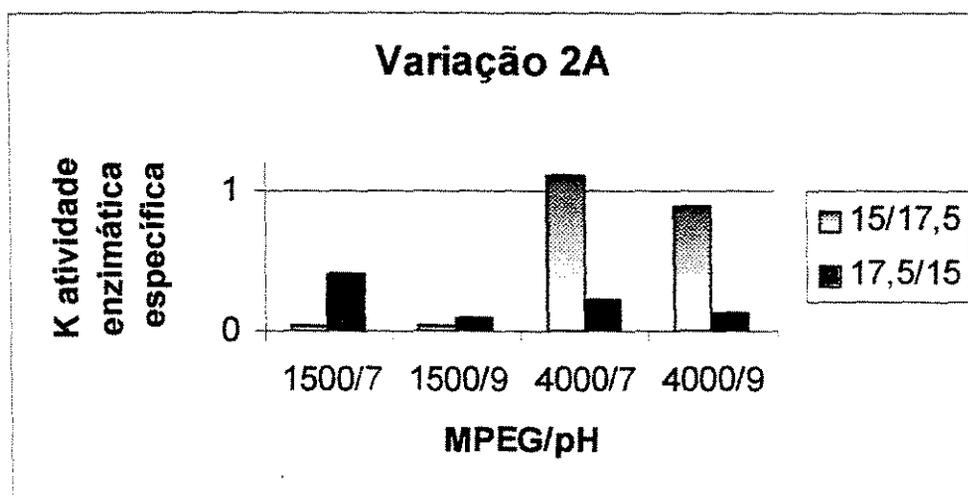


Figura 10: Influência do pH e da linha de amarração na variação 2A

A solubilidade das proteínas em soluções de PEG tem sido interpretada por vários autores em termos do efeito do volume excluído do polímero (POLSON et al, 1964). Podemos perceber que em relação à partição para a atividade específica da bromelina a fase PEG é favorecida, aumentando então o valor do seu coeficiente de partição.

## 5. CONCLUSÕES E COMENTÁRIOS

Com os resultados obtidos pudemos observar que:

- Uma mudança no comprimento da linha de amarração só será significativa se variarmos a concentração entre as fases, ou seja, a composição relativa entre as fases.
- A partição para a proteína total do caldo, é favorecida com o aumento do pH e da linha de amarração mas, variando-se o peso molecular do PEG, observamos uma tendência ao favorecimento da fase salina devido a seletividade atribuída ao PEG de maior peso molecular
- Como nos utilizamos de caldo prensado de abacaxi, a partição das proteínas pode ser influenciada pelas substâncias contaminantes da amostra. Porém isso denota que o coeficiente de partição em sistemas de duas fases aquosas, é muito bom para a extração de proteínas do abacaxi.
- Para a partição da atividade enzimática específica observamos que ,esta é favorecida com o aumento do peso molecular do PEG., devido à seletividade.
- Ao observarmos as linhas de amarração, percebe-se que aumentando a concentração do sal, e o peso molecular do PEG, obtemos o melhor resultado de recuperação enzimática, demonstrando claramente o efeito do volume excluído.

## 6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Uma vez que é difícil a obtenção de um trabalho totalmente completo e abrangente, torna-se importante a apresentação de algumas sugestões que possam contribuir para aprofundar os conhecimentos no processo de recuperação proposto. Assim, como continuação do trabalho efetuado, propõe-se:

- A avaliação de outros parâmetros tais como : concentração da proteína, temperatura e sua influência no sistema;
- Um estudo da influência na purificação da enzima utilizando pré-processos de concentração tais como: precipitação e diálise;
- Desenvolvimento do processo em contínuo;
- Realizar um aumento de escala do processo a fim de verificar se as condições mantêm-se constantes;
- Realizar uma análise da viabilidade econômica da recuperação da bromelina do abacaxi, no processo batelada e no processo contínuo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIRES-BARROS, MR., Extração líquido-líquido de produtos biológicos: recuperação de produtos de fermentação(ácidos carboxílicos) e proteínas. Lisboa, 1990.184 p. Tese de Doutorado. Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior Técnico
- ALBERTSSON, P.A., Partition of Cell Particles and Macromolecules, John Wiley, 2<sup>rd</sup>., 1971.
- ALBERTSSON, P.A., Partition of Cell Particles and Macromolecules, John Wiley, 3<sup>rd</sup>., 1986.
- ALBERTSSON, P.A.; TJERNELD, F., Phase Diagrams. Methods in Enzymology, v.228, p.3-13, 1994
- ALLINGER, KN.L.; CAVA, M.P.; DE JONGH, D.C.; JOHNSON, C.R.; LEBEL, N.<sup>a</sup>; STEVENS, C.L.Química Orgânica, 2 ed. Rio de Janeiro, ed Guanabara Koogan, 1978
- ASENJO, J.A., Aqueous two-phase for: I. Systems, principles and manipulation of selectivity.II.Processes and models. São Paulo, 1994. Apostila Instituto de Pesquisas Tecnológicas.
- ASENJO, J.A., Industrial prospects of aqueous two-phase processes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, V. 59, P.109, 1994
- ASENJO, J.A., Separation processes in biotechnology. New York, Marcel, Dekker, 1990

- 
- BALDINI, V.L.S.; IADEROZA, M.; FERREIRA, E.A.H.; SALES, A.M.; DRAETTA, I.S. e GIACOMELLI, E.J. Ocorrência da Bromelina e cultivares de abacaxizeiro. **Colet. ITAL**, v.23, n.1, p.44-55, Campinas, 1993.
- BAMBERGER, S.; SEAMAN, G.V., BROWN, J.A., BROOKS, D.E., *The partition of sodium phosphate and sodium chloride in aqueous dextran-polyethyleneglycol two phase systems*, J. Coll. And Interf. Sci., v.99, n.1, p. 187-193, 1984.
- BAMBERGER, S.; BROOKS, D.E.; SHARP, K.A.; VAN ALSTINE, J.M.; WEBWE, T.J., Preparation of phase system and measurement of their physicochemical properties.IN: BROOKS, D.E.; WALTER, H.; FISHER, D. Partitioning in aqueous two phase systems. Orlando, Academic Press, 1985.
- BELTER P.A., CUSSLER, E.L.; HU, W.S.Bioseparotions: downstream processing for biotechnology. Minneapolis, Jhn Wiley & Sons, 1988.
- BRADFORD, M. M., *A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities for protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry, v. 72, 1976.
- BASKIR, J.N., HATTON,T.A., SUTTER, U.W.*Protein partitioning in two-phase aqueous polymer systems*, Biotechnology Bioeng., v.34, p.541-558, 1989.
- BROOKS, D.SHARP, K. FISHER, D. *Theoretical Aspects of partitioning*.IN: Partitioning in aqueous two-phase systems, H. Walter, D.E. BROOKS, D.FISHER, academic Press, Orlando, 1985.
- BRUNS, R.E.; SCARMÍNIO, I.S.; BARROS NETO, B., Planejamento e Otimização de Experimentos, 2ª edição, Editora UNICAMP, São Paulo, 1996. 299p
- BROOKS, D.E.; NORRIS-JONES, R., *Preparation and analysis fo two-fases systems*. Methods in Enzymology, v. 228, p. 14-27, 1994.
- CABEZAS Jr, H. *Theory of phase formation in aqueous two-phase systems* Journal of Chromatography B, V. 680, p. 3-30, 1996.

- CASCONE, O; ANDREWS, B.A.; ANSEJA, J.A., *Partitioning and purification of thaumatin in aqueous two-phase systems*. *Enzyme Microbiology and Technology*, v.13, p. 629-635, 1991.
- CESAR, A.C.W., SILVA, R. e LUCARINI, A.C., *Recuperação das Enzimas Proteolíticas Presentes na Casca e Talo do Abacaxi*, R I C, 01, 47-54 , São Carlos, 1999.
- CAVALCANTE, P.B.; *Frutas comestíveis da Amazônia* ; Publicações avulsas 17, 1972
- COIMBRA, J.S.R., *Desempenho de um extrator tipo Grasser na separação de proteínas do soro de queijo usando sistemas aquosos bifásicos*. Tese de doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 1995.
- DIAMOND, A.D., HSU, J.T., *Aqueous Two-phase Systems for Biomolecule Separation*, IN: *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology, Managing* (ed), Springer- Verlag Berling Heidelberg, v.47, p. 90-134, 1992
- EITEMAN, M.A., *Temperature-dependent phase inversion and its effect on partitioning in the poly(ethylene glycol) ammonium sulphate aqueous two-phase system*. *Journal of Chromatography A*, v. 668, p. 13-19, 1994
- EITEMAN, M.A.; GAINER, J., *Predicting partition coefficients in polyethylene glycol-potassium phosphate aqueous two-phase system*. *Journal Of Chromatography A*, v. 586, p. 341-346, 1991.
- FRANCO, T.T. *Use of modified proteins in aqueous two-phase systems. Effect of surface hydrophobicity and charge*. Tese de doutorado. Faculty of Agriculture and Food, University of Reading, 1992
- FORCINITI, D.; HALL, C.K.; KULA, M.R. *Influence of polymer molecular weight and temperature on phase composition in ATPS*. *Fluid Phase Equilibria*, v. 61, p. 243-262, 1991.

- 
- FORCINITI, D.; HALL, C.K.; KULA, M.R. *Protein partition at the isoelectric point: influence of polymer molecular weight and concentration and protein size.* Biotechnology and Bioengineering, v. 38, p. 986-994, 1991.
- GREVE, A.; KULA, M.R., *Recycling of salts in partition protein extraction processes.* Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v. 50, p. 27-42, 1991.
- GUAN, Y. e KULA, M-R, *Recycling of Salt from the Primary Bottom Phase of a Protein Extration Process.* J.Chem.Tech. Biotechnol. , 50 (1991), 27-42
- GUAN, Y. LILLEY, T. e TREFFRY, T. , *A New Excluded Volume Theory and Its Application to the Coexistence Curves of Aqueous Two-Phase Systems,* Macromolecules, 26 ( 1993), 3971-3979
- GUAN, Y.; TREFRY, T.E., LILLEY, T.H. *Application of a statistical geometrical theory to aqueous two-phase systems.* Journal of Chromatography A, 668, p-31-45, 1994.
- HARRIS, J.M. *Poly(ethylene glycol) chemistry: biotechnical and biomedical applications.* Ed Plenum, NY, 1992
- HUDDLESTON, J.G., OTTOMAR, K.W., NGONYANI, D.M., LYDDIATT, A., *Influence of system and molecular parameters upon fractionation of intracellular proteins from Saccharomyces by aqueous two-phase partition.* Enzyme Microb. Technol., v.13, p.24-32, 1991.
- HUDDLESTON, J.G.; WANG, R.; FLANAGAN, J.A., O' BRIEN, S; LYDDIATT, A., *Variation of protein partition coefficients with volume ratio in poly(ethylene glycol) salt aqueous systems.* Journal of Chromatography A, v.668, p.3-11, 1994.
- HUSTEDT, H. KRONER, K.H. e PAPAMICHAEL, N. , *Continuous CrosCurrent aqueous TWO Phase Extration from Biomass-Automated Recovery in Production Scale,* Process Biochemistry, 23 ( 1988), 129-137

- 
- HUSTEDT, H; KRONER, K.H.; KULA, M.R. Applications of phase partitioning in the biotechnology. In: BROOKS, D.E.; WALTER, H.; FISHER, D. Partitioning in aqueous two-phase systems. Orlando, Academic Press, 1985.
- JOHANSSON, G. Partitioning of proteins. In: BROOKS, D.E.; WALTER, H.; FISHER, D. Partitioning in aqueous two phase systems. Orlando, Academic Press, 1985.
- JOHANSSON, G. Partitioning procedures and techniques: cells, organelles and membranes. Methods in Enzymology, v.228, p. 42-63, 1994.
- KRONER, K.H., HUSTEDT, H. e KULA, M-R, Extractive Enzyme Recovery: Economic Considerations, Proc. Biochem. Eng. , Fiechter A., Berlin, vol 24. (1982), 73-118
- KULA, M.R., Purification of enzymes by liquid-liquid extration, IN: Advances in Biochemical Bioengineering, A.Fiechter (ed), Springer-Verlag, 1982.
- KULA, M-R, Trends and Future Prospects of Aqueous Two-Phase Extration, Biosep., 1 ( 1990 )
- LAHORE, H.M.F., MIRANDA, M.V., FRAILE, E.R., BONINO, M.J.B.J.; CASCONI, O. Partition behaviour and purification of a Mucor bacilliformis acid proteases in aqueous two-phase systems. Process Biochemistry, v.30, p. 615-621, 1995
- LEHNINGER, A.L., Princípios de Bioquímica, Savier, 1995.
- MATIASSON, B.LING, T.G.I., Extraction in aqueous systems for biotechology. IN: VENAL, N.S., HUDSON, M.J., Biochemistry and Biotechnology, p. 270-292, 1987.
- MEDINA, J.C., BLEINTROTH, W.E., HASHIZUME, T.; ABACAXI - da cultura ao processamento e comercialização ITAL, 1978

- 
- MINAMI, N.M., Extração Líquido-Líquido aplicada à separação e purificação da amiloglicosidase, São Paulo, 1997, 190p., Universidade de São Paulo, Dissertação de Mestrado.
- MOLYNEAUX, P. Water Soluble Synthetic Polymers: Properties and Behavior, CRC, Boca Raton, vol1, 1984.
- MURACHI, T. Bromelain enzymes. In: LORAND, L. Methods in Enzymology, v.XLV, p.475-85, New York, Academic Press, 1976.
- PAPAMICHAEL, N. BOERNER, B. e HUSTED, H. Continuous Aqueous Phase Extration of Proteins: Automated and Recycling of Process Chemicals, J. Chem. Tech. Biotechnol., 54 (1992)
- PATHAK, S.P.; SUDSHA.; SAWANT, S.B.; JOSHI, J.B. New salt polyethylene glycol systems for two phase aqueous extration. The Chemical Engineering Journal, v. 46, p. B31-B34, 1991
- POLSON, A., POTGIETE, G.M., LARGIER, J.F., MEARS, G.E.F., JOUBERT, F.J., Biochemical and Biophysical Acta, v. 82, p.463, 1964.
- PORTO, A.L.F., Extração líquido-líquido de proteínas utilizando sistemas de duas fases aquosas em coluna de discos perfurados rotativos. Campinas, 1998, 98 p. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, 1998.
- RABELO, A.P.B., Estudo e Desenvolvimento de uma Micro-Coluna de Câmpanulas Pulsantes para Purificação de Proteínas, Campinas, 1999, 188p., Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas.
- ROWAN, A.D.; BUTTLE, D.J. and BARRETT, A.J. The cysteine proteinases of the pineapple plant. Biochemical Journal, v.266, n.3, p.869-75, 1990.
- SANTOS, S.A. Efeito do tempo na composição físico-química, química e na atividade da bromelina do caule do abacaxizeiro Ananas comosus (L.) Merr. CV. Pérola armazenado em condições com e sem refrigeração. Lavras: ESAL, 1995. 47 p. (Dissertação - Mestrado em Ciência dos Alimentos).

- 
- SARUBBO, L.A., Caracterização de um novo sistema bifásico aquoso e aplicação em extração de proteínas com coluna de discos perfurados rotativos, Campinas, 2000. Tese de Doutorado, 174p.Universidade Estadual de Campinas, SP, 2000.
- SARMENTO, M.J., PIRES, M.J., CABRAL, J.M.S., Liquid-liquid extraction of a recombinant protein, cytochrome b5, with aqueous two-phase systems of polyethylene glycol and potassium phosphate salts. Journal of Chromatography A, v.668, p. 117-120, 1994.
- SCHMIDT, A.S.; ANDREWS, B.A.; ASENJO, J.A., Correlations for the partition behavior of proteins in aqueous two-phase systems: effect of overall protein concentration. Biotechnology and Bioengineering, v. 50, p. 617-626, 1996.
- SCOPES, R.K. Protein Purification: principles and practice, 2. ed. New York, Springer Verlag, 1994, 329 p.
- SCHLUCK, A., MAURER, G., KULA, M.R., Influence of eletrostatic interactions on partitioning in aqueous polyethylene glycol/dextran biphasic systems. Biotechnology and Bioengineering, v.46, p.443-451, 1995.
- SEBASTIÃO, M. J. , CABRAL, M.S., AIRES-BARROS, R., Patitionning of recombinant FUSARIUM SOLANI PISI cutinase in polyethylene glycol-aqueous salt solution two-phase systems. Journal of Chromatography A, v. 668, p. 139-144, 1994.
- SUH, H.J.; LEE, H.; CHO, H.Y. and YANG, H.C. Purification and characterization of bromelain isolated from pineapple. Journal of the Korean Agricultural Chemical Society, v.35, n.4, p.300-7, 1992
- VIDEIRA, M. ; AIRES-BARROS, M.R. Liquid-liquid extraction of clavulanic acid using na aqueous two-phase system of polvethylene glycol and potassim phosphate.Journal of Chromatography A, v.668, p.237-240, 1994.
- WALTER, H., JOHANSSON, G., BROOKS, D.E., Partitioning in aqueous two-phase systems: recent results.Analytical Biochemistry, v.197, p.1-18, 1991.

---

WU, Y.T., LIN, D.Q., ZHU, Z.Q., MEI, L.H. , *Prediction of liquid-liquid equilibria of polymer-salt aqueous two-phase systems by a modified Pitzer's virial equation.* Fluid Phase Equilibria, v. 124, p.67-79, 1996

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