





Tese de Doutorado , defendida em 31 de março de 2000 , e aprovada pela banca constituída pelos Professores Doutores:



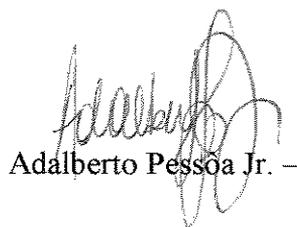
Elias Basile Tambourgi- UNICAMP



Ana Lúcia Figueiredo Porto- Univ. Federal Rural de Pernambuco



Ana Lúcia Barretto Penna- UNESP



Adálberto Pessoa Jr. – USP



José Luiz de Lima Filho – LIKA-UFPe

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

Esta redação corresponde a versão final da Tese de Doutorado defendida por Leonie Asfora Sarubbo em 31 de março de 2000.



Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi-orientador

**À ANTONIO SARUBBO, VÂNIA  
ASFORA SARUBBO e GIUSEPPE  
ASFORA SARUBBO, minha família**

**À NESTOR DIÓGENES DA  
SILVA E MELO NETO, meu  
esposo**

# SUMÁRIO

	página
<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	08
<b>LISTA DE SÍMBOLOS.....</b>	10
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	11
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	12
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	17
<b>RESUMO.....</b>	18
<b>ABSTRACT.....</b>	20
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	22
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	28
<b>2.1. SISTEMAS BIFÁSICOS AQUOSOS.....</b>	28
<b>2.1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....</b>	28
<b>2.1.2. CARACTERIZAÇÃO DOS DIAGRAMAS DE FASES.....</b>	30
<b>2.1.2.1. Termodinâmica do diagrama de fases.....</b>	32
<b>2.1.2.2. Fatores que influenciam o comportamento do diagrama de fases.....</b>	33
<b>2.1.2.3. Propriedades físicas das fases.....</b>	35
<b>2.1.2.4. Fatores que influenciam a partição de biomoléculas em sistemas bifásicos aquosos.....</b>	36
<b>2.1.2.5. Termodinâmica da partição.....</b>	42
<b>2.1.3. APLICAÇÕES EM LARGA ESCALA.....</b>	43
<b>2.1.4. SISTEMAS BIFÁSICOS AQUOSOS MAIS ESTUDADOS.....</b>	45
<b>2.1.5. SISTEMAS BIFÁSICOS ALTERNATIVOS.....</b>	47
<b>2.1.6. POLISSACARÍDEO DO CAJUEIRO (POLICAJU) .....</b>	49
<b>2.1.7. POLIETILENO GLICOL.....</b>	53
<b>2.1.8. EQUIPAMENTOS UTILIZADOS NA EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO....</b>	54
<b>2.1.9. PROCESSAMENTO CONTÍNUO.....</b>	59

<b>2.1.10. EXTRAÇÃO CONTÍNUA EM COLUNA DE DISCOS PERFURADOS ROTATIVOS.....</b>	<b>61</b>
<b>2.1.11. TRANSFERÊNCIA DE MASSA EM SISTEMAS BIFÁSICOS AQUOSOS..</b>	<b>64</b>
<b>2.1.12. RECUPERAÇÃO DOS PRODUTOS.....</b>	<b>67</b>
<b>2.1.13. RECICLAGEM DE POLÍMEROS.....</b>	<b>68</b>
<b>2.1.14. ASPECTOS ECONÔMICOS.....</b>	<b>69</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>71</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>72</b>
<b>4.1. MATERIAIS.....</b>	<b>72</b>
<b>4.1.1. Reagentes.....</b>	<b>72</b>
<b>4.1.1.1. Polímeros constituintes dos sistemas bifásicos aquosos.....</b>	<b>72</b>
<b>4.1.1.2. Proteína.....</b>	<b>72</b>
<b>4.1.1.3. Outros reagentes.....</b>	<b>72</b>
<b>4.1.2. Coluna de extração PRDC.....</b>	<b>73</b>
<b>4.1.3. Equipamentos.....</b>	<b>75</b>
<b>4.2. MÉTODOS.....</b>	<b>75</b>
<b>4.2.1. ISOLAMENTO DO POLISSACARÍDEO DO CAJUEIRO (POLICAJU).....</b>	<b>75</b>
<b>4.2.2. PREPARAÇÃO DOS SISTEMAS BIFÁSICOS AQUOSOS.....</b>	<b>78</b>
<b>4.2.3. DETERMINAÇÃO DOS DIAGRAMAS DE FASES.....</b>	<b>79</b>
<b>4.2.3.1. Análise do polissacarídeo do cajueiro.....</b>	<b>81</b>
<b>4.2.3.1.1. Hidrólise do polissacarídeo.....</b>	<b>81</b>
<b>4.2.3.1.2. Dosagem de açúcares redutores pelo método de MILLER (DNSA).....</b>	<b>82</b>
<b>4.2.3.1.3. Preparação do reagente DNSA.....</b>	<b>82</b>
<b>4.2.3.2. Análise do Polietileno Glicol.....</b>	<b>82</b>
<b>4.2.4. CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS BIFÁSICOS AQUOSOS.....</b>	<b>83</b>
<b>4.2.4.1. Determinação das "tie-lines" de trabalho.....</b>	<b>83</b>
<b>4.2.4.2. Determinação das propriedades reológicas dos sistemas bifásicos aquosos....</b>	<b>83</b>
<b>4.2.4.3. Tempo de separação das fases.....</b>	<b>84</b>

4.2.4.4. Razão de fases.....	84
4.2.5. ESTUDOS DE PARTIÇÃO EM BATELADA.....	84
4.2.5.1. Dosagem de proteína total .....	85
4.2.5.1.1. Preparação do reagente de BRADFORD.....	85
4.2.5.2. Determinação do coeficiente de partição.....	86
4.2.6. EXTRAÇÃO CONTÍNUA UTILIZANDO COLUNA DE DISCOS PERFURADOS ROTATIVOS (PRDC).....	86
4.2.6.1. Preparação dos sistemas de trabalho.....	86
4.2.6.2. Caracterização hidrodinâmica do equipamento.....	87
4.2.6.2.1. Condições operacionais.....	87
4.2.6.2.2. Determinação da fração retida da fase dispersa ( Hold up).....	87
4.2.6.3. Experimentos de transferência de massa.....	88
4.2.6.3.1. Determinação do coeficiente de transferência de massa (Kda).....	88
4.2.6.3.2. Cálculo do índice de recuperação do soluto.....	89
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	91
5.1. DETERMINAÇÃO DOS DIAGRAMAS DE FASES.....	91
5.1.1. Influência do peso molecular do polietileno glicol no diagrama de fases.....	96
5.1.2. Influência do pH no diagrama de fases.....	98
5.1.3. Influência da temperatura no diagrama de fases.....	100
5.2. CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS BIFÁSICOS AQUOSOS.....	102
5.2.1. Composição dos sistemas bifásicos aquosos ("tie-lines") .....	102
5.2.2. Propriedades reológicas dos sistemas bifásicos aquosos.....	106
5.2.3. Razão de fases e tempos de separação dos sistemas bifásicos aquosos.....	109
5.3. ESTUDOS DE PARTIÇÃO EM BATELADA.....	112
5.3.1. Influência do peso molecular do polietileno glicol (PEG) na partição da albumina de soro bovino.....	112
5.3.2. Influência do comprimento da "tie-line" na partição da albumina de soro bovino.....	117
5.3.3. Influência do pH na partição da albumina de soro bovino.....	119

<b>5.3.4. Influência da adição de NaCl na partição da albumina de soro bovino.....</b>	<b>119</b>
<b>5.3.5. Influência da temperatura na partição da albumina de soro bovino.....</b>	<b>126</b>
<b>5.4. EXTRAÇÃO CONTÍNUA UTILIZANDO COLUNA DE DISCOS PERFURADOS ROTATIVOS (PRDC).....</b>	<b>129</b>
<b>5.4.1. CARACTERIZAÇÃO HIDRODINÂMICA DO EQUIPAMENTO.....</b>	<b>130</b>
<b>5.4.1.1. Efeito da velocidade de rotação na fração retida da fase dispersa (hold up).....</b>	<b>131</b>
<b>5.4.1.2. Efeito da velocidade da fase dispersa na fração retida da fase dispersa (hold up) para diferentes composições do sistema bifásico PEG-Policaju.....</b>	<b>133</b>
<b>5.4.1.3. Efeito do número de discos na fração retida da fase dispersa (hold up) para diferentes composições do sistema bifásico PEG-Policaju.....</b>	<b>135</b>
<b>5.4.2. TRANSFERÊNCIA DE MASSA.....</b>	<b>135</b>
<b>5.4.2.1. Efeito da velocidade de rotação no coeficiente de transferência de massa (K<sub>da</sub>).....</b>	<b>136</b>
<b>5.4.2.2. Efeito da velocidade da fase dispersa no coeficiente de transferência de massa (K<sub>da</sub>).....</b>	<b>137</b>
<b>5.4.2.3. Efeito da composição do sistema no coeficiente de transferência de massa (K<sub>da</sub>).....</b>	<b>138</b>
<b>5.4.2.4. Efeito da velocidade de rotação no Índice de Recuperação.....</b>	<b>139</b>
<b>5.4.2.5. Efeito da velocidade da fase dispersa no Índice de Recuperação.....</b>	<b>140</b>
<b>5.4.2.6. Efeito da composição do sistema no Índice de Recuperação.....</b>	<b>141</b>
<b>5.4.2.7. Efeito do número de discos no coeficiente de transferência de massa (K<sub>da</sub>) e no Índice de Recuperação.....</b>	<b>141</b>
<b>5.4.3. PERFIL DO COMPORTAMENTO DA TRANSFERÊNCIA DE MASSA EM EXTRAÇÃO CONTÍNUA UTILIZANDO COLUNA DE DISCOS PERFURADOS ROTATIVOS.....</b>	<b>142</b>
<b>5.5. ANÁLISE ECONÔMICA DO SISTEMA.....</b>	<b>146</b>
<b>5.6. PERSPECTIVAS PARA OS SISTEMAS BIFÁSICOS AQUOSOS.....</b>	<b>149</b>

<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>151</b>
<b>7. SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS.....</b>	<b>153</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>154</b>
<b>9. ADENDO.....</b>	<b>173</b>

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por ter me permitido concluir mais uma etapa em minha carreira profissional.

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

À Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki, minha “mãe científica” e estrela guia na formação profissional, pelo carinho, incentivo, pelos conhecimentos transmitidos, pelo apoio e conselhos e enfim, por tudo aquilo que me foi proporcionado no decorrer da vida profissional.

À Profa. Dra. Ana Porto, como professora e amiga, pelas idéias geniais e pela ajuda em abrir meus caminhos, proporcionar novos conhecimentos neste trabalho e pela atenção e incentivo no decorrer de todos os experimentos, sem os quais tudo seria mais difícil. Meu eterno agradecimento!

Ao Reitor da UNICAP, Pe. Theodoro Paulo Severino Peters, S.J. pela oportunidade em desenvolver este trabalho nesta universidade.

Ao NPCIAMB, Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais, pelo apoio técnico e pela estrutura fantástica desenvolvida em tempo hábil para o desenvolvimento deste trabalho científico.

Ao Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior, Diretor do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) e ao Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho, chefe do setor de Biotecnologia, pelo acesso aos laboratórios desta instituição na realização inicial dos experimentos.

À minha grande amiga e companheira de bancada Luciana Alves de Oliveira, simplesmente por ser uma das pessoas mais fantásticas que surgiram em meu caminho!

Ao estagiário em Iniciação Científica, Luís Felipe Duarte Vieira, pela colaboração fundamental na realização desta pesquisa.

À Pofa. Helena Simões Duarte, da Universidade Federal Rural de Pernambuco pelo fornecimento de goma do cajueiro, pelo acesso ao laboratório desta instituição e pelas dicas recebidas durante o processo de isolamento do polissacarídeo do cajueiro.

À Profa. Ana Maria dos Anjos Carneiro Leão e a Juliana Delfino Cunha Rebouças pelo fornecimento da goma do cajueiro.

Às maravilhosas secretárias do NPCIAMB, Luciana Cosentino Acioly Rodrigues e Sônia Maria de Souza, pelo carinho e atenção.

Aos técnicos José Ferreira da Silva Neto (UFRPE), Lucas Ferreira de Rocha (UFPE) Severino Humberto de Almeida (NPCIAMB) e Salatiel Joaquim de Santana (NPCIAMB) pelo auxílio técnico.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Alves pela atenção dispensada ao longo deste trabalho.

Aos companheiros do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais, Vânia Souza Andrade, Rita de Cássia Gomes, Luciana Franco, Sandra Ambrosio e Ricardo Kenji.

Ao meu esposo, Nestor Diógenes Melo Neto, pelo amor, incentivo e paciência.

À minha maravilhosa família, Antônio, meu pai, Vânia, minha mãe e Giuseppe, meu irmão, por todo amor recebido, pelo incentivo, apoio e participação ao longo de toda esta caminhada.

A FAPESP e PRONEX/CNPq pelo apoio financeiro no decorrer deste curso.

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

## LISTA DE SÍMBOLOS

P: ponto crítico  
K: coeficiente de partição  
T: composição total do sistema  
S: composição da fase superior  
I: composição da fase inferior  
 $V_S$ : volume da fase superior  
 $V_I$ : volume da fase inferior  
 $d_S$ : densidade da fase superior  
 $d_I$ : densidade da fase inferior  
 $\Delta G_m$ : energia livre de Gibbs de mistura  
 $\Delta H_m$ : entalpia de mistura  
 $\Delta S_m$ : entropia de mistura  
t: temperatura  
 $K_{amb}$ : coeficiente de partição devido a fatores ambientais  
 $K_{est}$ : coeficiente de partição devido a fatores estruturais  
N: fluxo de proteína para a fase dispersa  
 $\Delta C_{lm}$ : média logarítmica da diferença de concentrações entre a interface e a fase dispersa  
K<sub>da</sub>: coeficiente de transferência de massa  
Q: velocidade de fluxo da fase dispersa  
V: volume da fase contínua  
C\*: concentração da proteína na interface em equilíbrio com a fase contínua  
C: concentração da proteína na fase dispersa  
 $r^+$ : Relação entre os volumes das fases superior e inferior  
 $V_{sup}$ : volume superior  
 $V_{total}$ : volume total  
y: fração de peso aparente  
 $C_A^0$ : concentração inicial do polímero A  
 $C_B^0$ : concentração inicial do polímero B  
 $C_A$ : concentração do polímero A na mistura  
 $C_B$ : concentração do polímero B na mistura  
 $C_S$ : concentração de proteínas na fase superior  
 $C_I$ : concentração de proteínas na fase inferior  
H: hold up  
C<sub>ent</sub>: concentração de soluto na corrente de entrada de fase dispersa  
C<sub>sai</sub>: concentração de soluto na corrente de saída de fase dispersa  
C<sub>fc</sub>: valor médio entre a concentração final da fase contínua e o valor inicial da mesma fase  
 $E_R$ : índice de recuperação do soluto  
 $C_f$ : fração mássica de soluto na alimentação  
 $C_r$ : fração mássica de soluto no refinado

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

FDA: Food and Drug Administration

BSA: albumina de soro bovino

SBA: sistema bifásico aquoso

PRDC: coluna de discos perfurados rotativos

RDC: contador de discos rotativos

PEG: polietileno glicol

PPG: polipropileno glicol

pI: ponto isoeletrico

DNSA: ácido dinitrosalissílico

## LISTA DE FIGURAS

	página
FIGURA 01- Diagrama de fases representativo de um sistema polímero A-polímero B-água. Misturas representadas por pontos acima da curva (ponto F) resultam em sistemas bifásicos, enquanto que misturas representadas por pontos abaixo da curva (ponto D) resultam em sistemas unifásicos.....	31
FIGURA 02- Diagrama de fases do sistema Polietileno glicol 4000-Dextrana T-500 a 20 °C (ALBERTSSON, 1986), onde: T representa a composição total do sistema; S a composição da fase superior; I a composição da fase inferior; P o ponto crítico.....	32
FIGURA 03- Exsudato obtido de <i>Anacardium occidentale</i> L.....	51
FIGURA 04- Um fragmento estrutural da goma de cajueiro. R representa D-manose, L-ramnose, L-arabinose ou cadeias de arabinose com ligação 1,2. R' representa D-glicose (glu) ou ácido D-glucurônico (glu. a.). Gal representa galactose.....	52
FIGURA 05- Exemplo de um extrator em estágios discretos.....	56
FIGURA 06- Exemplos de colunas que atuam sob a força da gravidade. (a) coluna de pratos fixos perfurados; (b) coluna recheada; (c) coluna Spray.....	57
FIGURA 07- Exemplos de colunas que atuam sob a força da gravidade. (a) coluna de fluxo pulsado; (b) coluna de pratos pulsados; (c) coluna de discos rotativos.....	58
FIGURA 08- Coluna de discos perfurados rotativos em operação (a), e em (b) vista frontal da coluna com mais detalhes, onde pode-se observar o eixo com os discos e as bombas de alimentação, a alimentação da fase leve e drenagem da fase pesada foi realizada pela parte inferior da coluna, e pelo topo da coluna ocorreu a alimentação da fase pesada e drenagem da fase leve (indicado pela fita amarela).....	74
FIGURA 09- Fluxograma de isolamento do polissacarídeo do cajueiro (Policaju) .....	76
FIGURA 10- Goma bruta do cajueiro.....	77
FIGURA 11- Polissacarídeo do cajueiro (Policaju) purificado.....	77
FIGURA 12- Diagrama de fases (I, II, III - secantes com diferentes valores de $C_A^0$ e $C_B^0$ , IV- binodal, V- diâmetro retilíneo) (a). Curvas representativas dos pontos experimentais de diferentes misturas de $C_A^0$ e $C_B^0$ (1- pontos da binodal, 2- ponto do diâmetro retilíneo, 3- ponto crítico) (b).....	81

FIGURA 13- Fluxograma representativo do processo experimental.....	90
FIGURA 14- Relação entre os volumes das fases (r+) versus fração do peso aparente (y) para o sistema PEG 8000-Policaju (POLYAKOV et al., 1980).....	92
FIGURA 15- Diagrama de fases do sistema PEG 4000-Policaju para dois lotes de goma (1° lote e 2° lote) a 27°C ± 2°C, pH 7,0.....	94
FIGURA 16- Diagrama de fases do sistema PEG 8000-Policaju para dois lotes de goma (1° lote e 2° lote) a 25°C ± 2°C, pH 7,0.....	94
FIGURA 17- Diagramas de fases dos sistemas PEG 4000-Policaju e PEG 4000-Dextrana500 a 25°C ± 2°C.....	95
FIGURA 18- Diagramas de fases dos sistemas PEG 8000-Policaju e PEG 8000-DextranaT500 (ZASLAVSKY, 1995) a 25°C ± 2°C.....	95
FIGURA 19- Diagramas de fases dos sistemas PEG 8000-Policaju, PEG 4000-Policaju e PEG 1500-Policaju a 25°C ± 2°C, pH 6,0.....	96
FIGURA 20- Diagramas de fases dos sistemas PEG 8000-Policaju, PEG 4000-Policaju e PEG 1500-Policaju a 25°C ± 2°C, pH 7,0.....	97
FIGURA 21- Diagramas de fases dos sistemas PEG 8000-Policaju, PEG 4000- Policaju e PEG 1500- Policaju a 25°C ± 2°C, pH 8,0.....	97
FIGURA 22- Diagrama de fases do sistema PEG 1500-Policaju nos pH's 6,0, 7,0 e 8,0 a 25°C ± 2°C.....	98
FIGURA 23- Diagrama de fases do sistema PEG 4000-Policaju nos pH's 6,0, 7,0 e 8,0 a 25°C ± 2°C.....	99
FIGURA 24- Diagrama de fases do sistema PEG 8000-Policaju nos pH's 6,0 7,0 e 8,0 a 25°C ± 2°C.....	99
FIGURA 25- Diagrama de fases do sistema PEG 1500-Policaju nas temperaturas 25°C ± 2°C e 40°C ± 2°C, pH 7,0.....	101
FIGURA 26- Diagrama de fases do sistema PEG 4000-Policaju nas temperaturas 25°C ± 2°C e 40°C ± 2°C, pH 7,0.....	101
FIGURA 27- Diagrama de fases do sistema PEG 8000-Policaju nas temperaturas 25°C ± 2°C e 40°C ± 2°C, pH 7,0.....	102

FIGURA 28- Influência do comprimento da "tie-line" e do pH no coeficiente de partição da albumina de soro bovino em sistema PEG1500-Policaju a 25 °C ± 2 °C.....	115
FIGURA 29- Influência do comprimento da "tie-line" e do pH no coeficiente de partição da albumina de soro bovino em sistema PEG4000-Policaju a 25 °C ± 2 °C.....	116
FIGURA 30- Influência do comprimento da "tie-line" e do pH no coeficiente de partição da albumina de soro bovino em sistema PEG8000-Policaju a 25 °C ± 2 °C.....	116
FIGURA 31- Influência da adição de NaCl no coeficiente de partição da albumina de soro bovino em sistema PEG1500-Policaju no pH 6,0 a 25 °C ± 2 °C.....	122
FIGURA 32- Influência da adição de NaCl no coeficiente de partição da albumina de soro bovino em sistema PEG1500-Policaju no pH 7,0 a 25 °C ± 2 °C.....	122
FIGURA 33- Influência da adição de NaCl no coeficiente de partição da albumina de soro bovino em sistema PEG1500-Policaju no pH 8,0 a 25 °C ± 2 °C.....	123
FIGURA 34- Influência da adição de NaCl no coeficiente de partição da albumina de soro bovino em sistema PEG4000-Policaju no pH 6,0 a 25 °C ± 2 °C.....	123
FIGURA 35- Influência da adição de NaCl no coeficiente de partição da albumina de soro bovino em sistema PEG4000-Policaju no pH 7,0 a 25 °C ± 2 °C.....	124
FIGURA 36- Influência da adição de NaCl no coeficiente de partição da albumina de soro bovino em sistema PEG4000-Policaju no pH 8,0 a 25 °C ± 2 °C.....	124
FIGURA 37- Influência da adição de NaCl no coeficiente de partição da albumina de soro bovino em sistema PEG8000-Policaju no pH 6,0 a 25 °C ± 2 °C.....	125
FIGURA 38- Influência da adição de NaCl no coeficiente de partição da albumina de soro bovino em sistema PEG8000-Policaju no pH 7,0 a 25 °C ± 2 °C.....	125
FIGURA 39- Influência da adição de NaCl no coeficiente de partição da albumina de soro bovino em sistema PEG8000-Policaju no pH 8,0 a 25 °C ± 2 °C.....	126
FIGURA 40- Influência da temperatura no coeficiente de partição da albumina de soro bovino em sistema PEG1500-Policaju no pH 7,0.....	127
FIGURA 41- Influência da temperatura no coeficiente de partição da albumina de soro bovino em sistema PEG4000-Policaju no pH 7,0.....	128

FIGURA 42- Influência da temperatura no coeficiente de partição da albumina de soro bovino em sistema PEG8000-Policaju no pH 7,0.....	128
FIGURA 43- Efeito da velocidade de rotação e da velocidade da fase dispersa sobre a fração retida da fase dispersa em PRDC com 03 discos rotativos para o sistema 9%PEG4000-18%Policaju, pH 6,0.....	132
FIGURA 44- Efeito da velocidade de rotação e da velocidade da fase dispersa sobre a fração retida da fase dispersa em PRDC com 04 discos rotativos para o sistema 9%PEG4000-18%Policaju, pH 6,0.....	132
FIGURA 45- Efeito da velocidade da fase dispersa e do número de discos sobre a fração retida da fase dispersa em PRDC para velocidade de rotação de 220 rpm para os sistemas 9%PEG4000-18%Policaju e 11%PEG4000-20%Policaju, pH 6,0.....	134
FIGURA 46- Efeito da velocidade de rotação no coeficiente de transferência de massa de albumina de soro bovino em PRDC com sistema 9%PEG4000-18%Policaju, pH 6,0.....	137
FIGURA 47- Efeito da velocidade da fase dispersa no coeficiente de transferência de massa de albumina de soro bovino em PRDC com sistema 9%PEG4000-18%Policaju, pH 6,0.....	138
FIGURA 48- Efeito da velocidade de rotação no índice de recuperação de albumina de soro bovino em PRDC com sistema 9%PEG4000-18%Policaju, pH 6,0.....	140
FIGURA 49- Efeito da velocidade da fase dispersa no índice de recuperação de albumina de soro bovino em PRDC com sistema 9%PEG4000-18%Policaju, pH 6,0.....	141
FIGURA 50- Transferência de albumina da fase rica em PEG (refinado) para a fase rica em Policaju (extrato) - sistema 9%PEG4000-18%Policaju em PRDC com 04 discos rotativos a velocidade de rotação de 220 rpm e velocidade da fase dispersa de 5 mL/min (corrida 1).....	143
FIGURA 51- Transferência de albumina da fase rica em PEG (refinado) para a fase rica em Policaju (extrato) - sistema 9%PEG4000-18%Policaju em PRDC com 03 discos rotativos a velocidade de rotação de 220 rpm e velocidade da fase dispersa de 5 mL/min (corrida 2).....	143
FIGURA 52- Transferência de albumina da fase rica em PEG (refinado) para a fase rica em Policaju (extrato) - sistema 9%PEG4000-18%Policaju em PRDC com 04 discos rotativos a velocidade de rotação de 60 rpm e velocidade da fase dispersa de 5 mL/min (corrida 3).....	144

FIGURA 53- Transferência de albumina da fase rica em PEG (refinado) para a fase rica em Policaju (extrato) - sistema 9%PEG4000-18%Policaju em PRDC com 04 discos rotativos a velocidade de rotação de 140 rpm e velocidade da fase dispersa de 5 mL/min (corrida 4).....	144
FIGURA 54- Transferência de albumina da fase rica em PEG (refinado) para a fase rica em Policaju (extrato) - sistema 9%PEG4000-18%Policaju em PRDC com 04 discos rotativos a velocidade de rotação de 220 rpm e velocidade da fase dispersa de 2 mL/min (corrida 5).....	145
FIGURA 55- Transferência de albumina da fase rica em PEG (refinado) para a fase rica em Policaju (extrato) - sistema 9%PEG4000-18%Policaju em PRDC com 04 discos rotativos a velocidade de rotação de 220 rpm e velocidade da fase dispersa de 3 mL/min (corrida 6).....	145
FIGURA 56- Transferência de albumina da fase rica em PEG (refinado) para a fase rica em Policaju (extrato) - sistema 11%PEG4000-20%Policaju em PRDC com 04 discos rotativos a velocidade de rotação de 220 rpm e velocidade da fase dispersa de 5 mL/min (corrida 7)....	146

## LISTA DE TABELAS

	página
TABELA 01- Exemplos de sistemas bifásicos aquosos.....	29
TABELA 02- Extração de enzimas utilizando a partição espontânea.....	44
TABELA 03- Exemplos de gomas industriais classificadas pela fonte.....	50
TABELA 04- Composição da goma de <i>Anacardium occidentale</i> L. de diferentes origens.....	52
TABELA 05- Classificação dos equipamentos de extração segundo HANSON (1971).....	59
TABELA 06- Soluções e reagentes utilizados ao longo do trabalho experimental.....	73
TABELA 07- Título das diversas soluções concentradas empregadas ao longo do trabalho...	78
TABELA 08- Composição das "tie-lines" de trabalho dos sistemas de duas fases aquosas PEG-Policaju utilizados ao longo dos experimentos.....	83
TABELA 09- Variáveis estudadas na extração contínua.....	87
TABELA 10- Composição das fases do sistema PEG 1500-Policaju a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , pH 6,0.....	103
TABELA 11- Composição das fases do sistema PEG 4000-Policaju a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , pH 6,0.....	103
TABELA 12- Composição das fases do sistema PEG 8000-Policaju a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , pH 6,0.....	103
TABELA 13- Composição das fases do sistema PEG 1500-Policaju a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , pH 7,0.....	104
TABELA 14- Composição das fases do sistema PEG 4000-Policaju a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , pH 7,0.....	104
TABELA 15- Composição das fases do sistema PEG 8000-Policaju a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , pH 7,0.....	104
TABELA 16- Composição das fases do sistema PEG 1500-Policaju a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , pH 8,0.....	105
TABELA 17- Composição das fases do sistema PEG 4000-Policaju a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , pH 8,0.....	105
TABELA 18- Composição das fases do sistema PEG 8000-Policaju a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , pH 8,0.....	105
TABELA 19- Composição das fases do sistema PEG 1500-Policaju a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , pH 7,0.....	106
TABELA 20- Composição das fases do sistema PEG 4000-Policaju a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , pH 7,0.....	106
TABELA 21- Composição das fases do sistema PEG 8000-Policaju a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , pH 7,0.....	106
TABELA 22- Propriedades reológicas das fases dos diferentes SBA em estudo a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .	107
TABELA 23- Propriedades reológicas das fases dos diferentes SBA em estudo a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .	108
TABELA 24- Razão de fases e tempo de separação das fases dos diferentes SBA em estudo..	110
TABELA 25- Preço por quilograma de polímeros empregadas para a formação de SBA.....	147
TABELA 26- Custo associado a um quilograma de diferentes SBA.....	148

## RESUMO

A partição bifásica aquosa explora a capacidade exibida por soluções de dois polímeros ou de um polímero e um sal de se separarem em duas fases aquosas sempre que certas concentrações mínimas sejam excedidas. As duas fases aquosas assim formadas diferem na sua composição, sendo cada uma delas rica num dos constituintes do sistema, isto é, os dois polímeros ou o polímero e o sal concentram-se em fases distintas. Estas fases apresentam elevados teores em água, podendo em alguns casos atingir valores superiores a 90 %, constituindo ambientes suaves para moléculas e partículas biológicas.

O objetivo principal deste trabalho residiu na caracterização do sistema bifásico aquoso formado por um polímero típico do Nordeste brasileiro, o polissacarídeo do cajueiro (Policaju). Sendo o elevado custo dos polímeros envolvidos o principal entrave à aplicação em grande escala da partição bifásica aquosa, este sistema apresentou a possibilidade em reduzir este custo, aumentando a competitividade da partição bifásica aquosa como processo alternativo frente aos processos tradicionais de recuperação de bioprodutos.

Mostrou-se ao longo desta tese que o sistema testado apresentou propriedades físicas (razão e tempo de separação de fases, densidade, viscosidade) e de partição características de sistemas bifásicos aquosos polímero-polímero. Após o isolamento do polissacarídeo, determinou-se o diagrama de fases e estudou-se a partição de uma proteína modelo, a albumina de soro bovino. Verificou-se o efeito exercido pelas variáveis do sistema, peso molecular do PEG (1500, 4000 e 8000), concentração dos polímeros, pH (6,0, 7,0 e 8,0), temperatura (25°C e 40°C) e adição de NaCl (0,1M e 1M).

Observou-se um deslocamento da binodal no sentido de menores concentrações de polímeros com o aumento do peso molecular do PEG. Por outro lado, a variação do pH e da temperatura não provocou um deslocamento significativo da binodal. Não foi possível estabelecer uma correlação entre o coeficiente de partição da proteína e o peso molecular do PEG, enquanto que o aumento do comprimento da "tie-line" e da temperatura, assim como a diminuição do pH, provocaram a redução no coeficiente de partição. Os resultados obtidos para a adição de NaCl demonstraram uma tendência a redução do coeficiente de partição com o aumento da concentração do sal, embora em alguns casos o coeficiente de partição tenha diminuído apenas

para uma das concentrações de sal, dependendo do sistema estudado e do pH. O aumento da temperatura para os valores estudados demonstrou uma tendência a redução no coeficiente de partição para todos os PEG's testados.

A operação dos sistemas bifásicos em contínuo também foi avaliada. Estudou-se o comportamento do sistema bifásico PEG-Policaju em coluna de discos perfurados rotativos (PRDC). Ensaiou-se a transferência da albumina de soro bovino da fase dispersa para a fase contínua, utilizando o sistema PEG4000-Policaju selecionado a partir dos estudos de partição em batelada. A coluna foi operada durante 55 minutos em contracorrente e contínuo operando como fase dispersa a fase leve do sistema bifásico (PEG) e como fase contínua a fase pesada (Policaju). Foram realizadas variações da velocidade de rotação (60, 140 e 220 rpm), velocidade da fase dispersa (2, 3 e 5 mL/min) e número de discos (03 e 04). O desempenho do equipamento foi caracterizado a partir de análise dos estudos da fração retida da fase dispersa (hold up), do coeficiente de transferência de massa e do índice de recuperação de KAWASE.

Os resultados demonstraram um aumento da fração retida da fase dispersa, do coeficiente de transferência de massa e do índice de recuperação com o aumento da velocidade de rotação. Os mesmos efeitos foram observados para o aumento da velocidade da fase dispersa, com exceção sobre o índice de recuperação, o qual não apresentou uma tendência regular com o aumento desta variável. O aumento da composição do sistema reduziu o "hold up" e a transferência de massa, embora não tenha demonstrado um efeito significativo sobre o índice de recuperação. A variação do número de discos não teve um efeito pronunciado sobre a fração retida da fase dispersa, embora o coeficiente de transferência de massa e o índice de recuperação tenham sido maiores para 03 discos. A análise do perfil de extração contínua da albumina de soro bovino demonstrou que a maior transferência de proteína foi obtida para as seguintes condições: sistema 9%PEG4000-18%Policaju em PRDC com 03 discos rotativos a velocidade de 220 rpm e velocidade da fase dispersa de 2 mL/min.

A análise econômica demonstrou que o sistema PEG-Policaju é bastante competitivo frente a outros sistemas polímeros-polímeros descritos na literatura, possibilitando o desenvolvimento de estudos futuros com este novo sistema em processos de extração.

## ABSTRACT

Aqueous two-phase partition explores the possibility of solutions of two polymers or one polymer and one salt separating into two immiscible aqueous phases, when certain critical concentrations are exceeded. Each one of these aqueous phases is more concentrated in one of the phase forming chemicals. Both exhibit a high water content, in some cases as much as 90%. Due to this high water content, these biphasic systems provide a gentle environment for molecules and particles with biological activity.

The main subject of this work was the characterisation of a new aqueous two-phase system based on a typical Brazilian north-western polymer, the polysaccharide of cashew tree (Policaju). Since the cost of the phase forming polymers is the main drawback on the large scale application of aqueous two-phase partition, this system showed the possibility of decreasing this cost by increasing the applicability of biphasic partition as an alternative technique to the traditional recovery processes of bioproducts.

It is shown that physical properties (phase volume ratio, time for phase separation, density, viscosity) and partition properties of the tested system are similar to others aqueous two-phase polymer-polymer systems. After the polysaccharide isolation, the phase diagram was determinate and the partition of a model protein, bovine serum albumin, studied. It was analysed the effect of PEG molecular weight (1500, 4000 and 8000), polymer concentration, temperature (25°C e 40°C), pH (6,0, 7,0 and 8,0) and NaCl (0,1M e 1M) addition.

It was observed a displacement of the binodal towards lower polymer concentrations when PEG molecular weights decreased. Conversely, the variation of pH and temperature did not promote significant alterations on the binodal. It was not possible to stabilise a relation between the protein partition coefficient and the PEG molecular weight, while the increase in tie-line length and temperature and the decrease in pH promoted the decrease of the partition coefficient. The results obtained for NaCl addition showed a tendency for the decrease of the partition coefficient with the increase of salt concentration, although in some cases, the partition coefficient decreased only for a determinate salt concentration, depending on the system and pH.

Continuous operation with aqueous two-phase systems was also tested. The behaviour of the biphasic system PEG-Policaju was studied using a perforated rotating disc contactor (PRDC).

The transfer of bovine serum albumin from the dispersed phase to the continuous phase was studied by using the PEG4000-Policaju system selected from batch extraction. The column was operated in countercurrent and in a continuous mode during 55 minutes of operation, where the dispersed phase was constituted by the PEG-rich phase and the continuous phase by the Policaju-rich phase. Variations in the rotation velocity (60, 140 and 220 rpm), dispersed phase velocity (2, 3 and 5 mL/min) and discs number (03 and 04) were investigated. The performance of the equipment was characterised by the analysis of the fractional dispersed phase holdup, mass transfer coefficient and KAWASE recuperation indices.

The results showed an increase of the dispersed phase holdup, mass transfer coefficient and recuperation indices with the increase of the rotation velocity. The same effects were observed for the increase of the dispersed phase velocity, except for the recuperation indices, which did not show a regular tendency. The increase of system composition decreased the fractional dispersed phase holdup and the mass transfer coefficient, although did not show a significant effect over the recuperation indices. The number discs variation did not demonstrate a significant effect upon the fractional dispersed phase holdup, although the mass transfer coefficient and the recuperation indices were higher for 03 discs. The analysis of bovine serum albumin continuous extraction showed the higher protein transfer for the following conditions: 9%PEG4000-18%Policaju system in PRDC with 03 rotary discs with rotation velocity of 220 rpm and dispersed phase velocity of 2 mL/min.

The economic analysis showed that PEG-Policaju aqueous two-phase system is very competitive with other polymer-polymer systems described in the literature. This permits the development of future researches with this new system in recovery processes.

## 1. INTRODUÇÃO

Devido a modernização dos processos industriais e a necessidade em se obter produtos de melhor qualidade e economicamente mais viáveis, existe uma grande procura por tecnologias alternativas às técnicas convencionais (DIAMOND & HSU, 1992).

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

Quando se trata de moléculas biológicas, parâmetros tais como solubilidade e estabilidade, estão muito relacionados ao meio de extração normalmente aplicado nas indústrias. Vários são os critérios usados para seleção de um meio de extração para aplicações biotecnológicas, dentre eles podemos citar (MATLASSON & LING, 1987):

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

A maioria das técnicas de separação utilizadas nos processos bioquímicos industriais para a recuperação e isolamento de enzimas, tais como a filtração e centrifugação, são altamente dependentes do tamanho da partícula. Os processos de separação sólido-líquido também são limitados para o processamento de células bacterianas. Por outro lado, a crescente importância dos processos de recuperação de proteínas tem levado ao desenvolvimento de novas e eficientes

técnicas de separação e purificação. Recentemente, as técnicas de separação de proteínas têm sido desenvolvidas baseadas na extração líquido-líquido, a qual tem demonstrado ser um campo tecnológico extremamente interessante (CABRAL & AIRES-BARROS, 1993; KULA et al., 1982).

Embora a extração líquido-líquido seja aplicada há muito tempo como técnica de separação laboratorial, sua utilização a nível industrial teve início nas primeiras décadas do século XX quando se procurava um método que resolvesse o problema da remoção de hidrocarbonetos aromáticos do querosene. Sofreu grande desenvolvimento na indústria, principalmente após a Segunda Guerra Mundial, alcançando diversos setores, desde a extração de metais nobres até a purificação de antibióticos, destacando-se na indústria petroquímica para remoção de componentes indesejáveis dos óleos lubrificantes e na separação de compostos aromáticos, além de ser usada em outros processos orgânicos e na indústria farmacêutica (TREYBAL, 1963).

A extração líquido-líquido 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 (solução alimentadora) ocorre pela adição de um constituinte líquido, insolúvel ou parcialmente solúvel na solução, o solvente, no qual o componente a ser extraído da solução, o soluto, é preferencialmente solúvel. O soluto difunde-se no solvente extrator com uma velocidade característica até atingir-se as concentrações de equilíbrio em cada uma das fases formadas. Este processo de separação é baseado na distribuição do soluto entre as duas fases e a miscibilidade parcial dos líquidos (TREYBAL, 1963).

Num processo de extração líquido-líquido as seguintes denominações são usadas:

- soluto: constituinte a ser extraído e que se encontra dissolvido no diluente
- alimentação: solução constituída pela mistura soluto + diluente
- solvente: líquido destinado a extrair os constituintes (solutos) da solução
- diluente ou inerte: líquido nos quais se encontra dissolvidos os solutos
- extrato: fase líquida rica em solvente, que contém o soluto extraído dissolvido
- refinado: fase líquida pobre em solvente, que retém essencialmente o diluente ou inerte

A operação de extração líquido-líquido consiste dos seguintes passos:

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

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

A extração líquido-líquido tornou-se um dos principais procedimentos de separação adotados industrialmente. O seu “scale up” é relativamente fácil e normalmente não envolve equipamentos dispendiosos, apresentando vasta aplicação dentro das indústrias químicas (ZASLAVSKY, 1995). Contudo, o uso de uma fase orgânica tem levado a limitação das aplicações no processamento de bioprodutos sensíveis como proteínas, ácidos nucleicos e partículas celulares devido a baixa solubilidade no solvente orgânico e ao efeito desnaturante deste último. Por outro lado, a separação das fases também pode ser obtida quando polímeros hidrofílicos são adicionados a uma solução aquosa como resultado da incompatibilidade entre os polímeros. Quando a concentração dos polímeros excedem um certo valor, duas fases aquosas são formadas, as quais são biocompatíveis com as células e preservam a função biológica de proteínas e ácidos nucleicos, tendo sido estes tipos de sistemas os mais frequentemente investigados e utilizados na purificação de biomoléculas (CABRAL & AIRES-BARROS, 1993; DIAMOND & HSU, 1992; KULA *et al.*, 1982).

Nas últimas três décadas, várias pesquisas têm sido realizadas com sistemas bifásicos aquosos (SBA) em escala laboratorial para separação de proteínas, organelas celulares, vírus e outros materiais biológicos (DIAMOND & HSU, 1992; WALTER & JOHANSSON, 1986).

A extração com sistemas bifásicos aquosos pode ser economicamente competitiva na separação de proteínas, células e componentes celulares. A grande vantagem destes sistemas reside nos tempos de processamento reduzidos, elevadas capacidades volumétricas, e facilidade de “scale-up” (KRONER *et al.*, 1984).

Ultimamente, a ampliação da escala de laboratório para planta piloto (PAPAMICHAEL et al., 1992), a modelagem do processo de partição (KING et al., 1988; GROßMANN et al., 1998; EITMAN, 1994) e o desenvolvimento de novos sistemas bifásicos (CHRISTIAN et al., 1998; VENÂNCIO et al., 1993; 1995) têm sido enfatizado.

Entre os sistemas bifásicos aquosos mais estudados em partição aquosa destaca-se o sistema Polietileno glicol-Dextrana. A utilização do Polietileno glicol (PEG) torna-se vantajosa devido ao baixo custo do polímero e as propriedades físico-químicas favoráveis. Por outro lado, a Dextrana apresenta um inconveniente: um elevado custo.

Para combater a falta de competitividade econômica dos sistemas bifásicos constituídos por PEG e Dextrana tem-se recorrido quase exclusivamente a sistemas PEG-Sais (BOLAND et al., 1991; KULA et al., 1982; PAPAMICHAEL et al., 1992).

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

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

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

Normalmente, os processos de extração de partículas biológicas têm sido realizados de modo descontínuo; recentemente, a utilização de processos contínuos tem recebido impulso com a extração contínua em colunas operando em contracorrente, uma vez que o processamento

contínuo apresenta inúmeras vantagens como a automação do processo, redução no tempo de processamento e menor espaço físico ocupado, uma vez que as unidades não são volumosas (KULA, 1990; BOLAND, 1990).

O interesse do emprego de SBA na extração líquido-líquido reside na disponibilidade de equipamentos já desenvolvidos, cujo desempenho é, ao menos em parte, conhecido. No entanto, o projeto destes equipamentos tem por base estudos realizados em sistemas tradicionais, enquanto as pesquisas voltadas aos sistemas de interesse atuais se concentram na escolha de solventes, na determinação do equilíbrio de fases e dos coeficientes de partição, evidenciando a necessidade do estudo operacional e de transferência de massa para esta operação unitária aplicada a bioseparações.

Entre os equipamentos que trabalham em contracorrente e de modo contínuo, as colunas de discos perfurados rotativos (PRDC) tornaram-se uma alternativa atrativa quando comparadas a outros equipamentos convencionais de separação líquido-líquido. Entre as vantagens deste equipamento estão o aumento do grau de dispersão e da eficiência de uma certa separação devido à agitação mecânica imposta aos discos.

Poucos sistemas bifásicos aquosos têm sido testados em colunas de extração líquido-líquido. Os trabalhos encontrados na literatura referem-se a sistemas PEG-Dextran (SAWANT et al., 1990), sistemas PEG-Maltodextrina (RAGHAV-RAO et al., 1991) e a sistemas PEG-Sais (JAFARABAD et al., 1992a; JAFARABAD et al., 1992b; PORTO et al., 1997; PORTO et al., 1999).

Dada a escassez de resultados encontrados na literatura, especialmente no que se refere à aplicação de sistemas bifásicos aquosos formados por dois polímeros e a utilização destes em extração contínua, torna-se necessário o desenvolvimento de sistemas menos dispendiosos para processamento industrial.

Definiu-se, como objetivo deste trabalho, o estudo da aplicação de um polímero regional de baixo custo a técnicas de separação bifásica aquosa. Pretendeu-se mostrar que os dados compilados ao longo das últimas três décadas para sistemas bifásicos aquosos formados por polímeros como a Dextrana podem ser transpostos para sistemas formados por polímeros alternativos.

Assim, iniciou-se o trabalho com a caracterização de sistemas bifásicos aquosos formados pelo polissacarídeo do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) e PEG através do estudo das variáveis do processo (peso molecular do polietileno glicol, pH, "tie-line", temperatura e adição de NaCl) na extração de uma proteína modelo, a albumina de soro bovino.

Estudou-se ainda a implementação destes sistemas em processos de extração em contínuo utilizando colunas de extração com discos perfurados rotativos (PRDC). A avaliação do desempenho operacional deste equipamento foi realizada com base na sua caracterização hidrodinâmica através do estudo da influência de variáveis geométricas e operacionais como velocidade de rotação, velocidade da fase dispersa e número de discos sobre a fração retida da fase dispersa, o coeficiente de transferência de massa e o índice de recuperação.

Por fim, o potencial econômico do sistema foi avaliado com vistas ao desenvolvimento de estudos futuros em processos de extração.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. SISTEMAS BIFÁSICOS AQUOSOS

#### 2.1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A extração líquido-líquido utilizando sistemas de duas fases aquosas tem sido um tópico de grande interesse nestes últimos anos e foi primeiramente descrita na literatura pelo microbiologista alemão BEIJERINCK (1896), o qual descobriu que gelatina (ou amido), ágar e água misturados a certas concentrações formavam um sistema de duas fases, sendo a fase superior rica em gelatina e a fase inferior, rica em ágar. Em 1947, DOBRY e BOYER-KAWENOKI desenvolveram um estudo sistemático sobre a miscibilidade de diferentes polímeros na presença de água e de solventes orgânicos. Na década de 40, CRAIG & CRAIG foram os pioneiros no uso de sistemas aquoso-orgânico para a purificação de proteínas utilizando distribuição em contra-corrente (ALBERTSSON *et al.*, 1990; DIAMOND & HSU, 1992). Posteriormente, nos anos 50, PERAKE ALBERTSSON descobriu que polietileno glicol (PEG), fosfatos de potássio e água, assim como PEG, Dextrana e água formavam sistemas de duas fases (DIAMOND & HSU, 1992).

Foi ALBERTSSON que reconheceu a possível utilização destes sistemas como método de separação aplicado a biomacromoléculas, partículas celulares e células sob condições que preservassem sua atividade biológica, estabelecendo um grande número de diagramas de fase de vários sistemas de duas fases aquosas, descrevendo também as suas propriedades físico-químicas básicas (DIAMOND & HSU, 1992; KULA *et al.*, 1982).

Os sistemas de duas fases aquosas são geralmente formados por uma solução aquosa de dois polímeros hidrófilos ou um polímero e de determinados sais. Acima da concentração crítica destes componentes ocorre espontaneamente a separação de fases, predominando um ou outro componente em cada uma das fases resultantes. A TABELA 01 apresenta vários exemplos de sistemas bifásicos aquosos para aplicações biotecnológicas. Consideremos, por exemplo, uma mistura de Polietileno glicol (PEG), Dextrana e água. Acima de determinadas concentrações dos polímeros, esta mistura separa-se em duas fases aquosas em equilíbrio, sendo a fase superior rica em PEG e a fase inferior, rica em Dextrana. Embora ambos os polímeros sejam solúveis em água,

TABELA 01- Exemplos de sistemas bifásicos aquosos

<b>1. SISTEMAS POLÍMERO-POLÍMERO-ÁGUA</b>			
<b>Polímero</b>	<b>Polímero</b>	<b>Referência</b>	
Polietileno glicol	Hidroxipropildextrana	ALBERTSSON, 1986	
	Goma de Guar	VENÂNCIO et al., 1995	
	Farinha de alfarroba	VENÂNCIO, 1996	
	Maltodextrina	SZLAG & GIULIANO, 1988	
	Dextrana	ALBERTSSON, 1986	
	Hidroxipropilamido	TJERNELD et al., 1986	
		BUITELAAR et al., 1992	
		VENÂNCIO et al., 1993	
		Pululana	NGUYEN et al., 1988
		Álcool polivinílico	ALBERTSSON, 1986
		Polivinilpirrolidina	ALBERTSSON, 1986
Polivinilpirrolidina	Dextrana	ALBERTSSON, 1986	
Hidroxipropildextrana	Dextrana	ALBERTSSON, 1986	
Metilcelulose	Dextrana	ALBERTSSON, 1986	
	Hidroxipropildextrana	ALBERTSSON, 1986	
Ficol	Dextrana	ALBERTSSON, 1986	
Detergentes não-iônicos baseados no polioxi-etileno (Triton N, Triton X, Tween)		SANCHEZ-FERRER et al., 1994	

## **2. SISTEMAS POLÍMERO-SOLUTO DE BAIXO PESO MOLECULAR-ÁGUA**

<b>Polímero</b>	<b>Soluto de baixo peso molecular</b>	<b>Referência</b>
Polietileno glicol	Fosfato de potássio	ALBERTSSON, 1986
	Sulfato de potássio	ALBERTSSON, 1986
	Sulfato de magnésio	EITMAN & GAINER, 1990
	Glicose	ALBERTSSON, 1986
	Glicerol	ALBERTSSON, 1986
Metoxipolietileno glicol	Fosfato de potássio	ALBERTSSON, 1986

quando misturados, são incompatíveis, separando-se em duas fases. A imiscibilidade das fases é resultado do fenômeno de incompatibilidade entre os polímeros. Quando a concentração dos polímeros são altas, eles não são capazes de interagir, levando a formação de agregados que tendem a promover suas exclusões e simultaneamente a separação das fases. Uma mistura

homogênea só é atingida se a interação entre os diferentes polímeros for maior do que a interação entre as moléculas da mesma espécie (ALBERTSSON, 1986).

Os sistemas bifásicos aquosos apresentam a característica particular de apresentarem em sua composição um elevado conteúdo em água, o que permite a partição de biomoléculas em condições não desnaturantes. Por exemplo, as fases dos sistemas constituídos por Polietileno glicol-Dextrana contêm cerca de 80-90% em água. Já os sistemas bifásicos constituídos por solventes orgânicos e água, como butanol-água e etanol-soluções salinas, possuem apenas cerca de 40-50% em água na fase orgânica, condição que pode causar a precipitação e desnaturação de proteínas e concentração de materiais biológicos exclusivamente na fase aquosa (DIAMOND & HSU, 1992).

### 2.1.2. CARACTERIZAÇÃO DOS DIAGRAMAS DE FASES

Basicamente, qualquer polímero hidrofílico, natural ou sintético, miscível em água, pode dar origem a separação de fases quando misturado com outro polímero ou com determinados sais. As composições das fases e as concentrações das misturas polímero-polímero ou polímero-sal necessárias para que ocorra a separação das fases podem ser representadas num diagrama de fases. A FIGURA 01 representa esquematicamente o diagrama de fases para um sistema polímero A - polímero B - água. Neste, as concentrações dos polímeros são expressas em % (p/p), designando-se por binodal a linha curva que divide o diagrama em duas áreas distintas. A separação das fases ocorre apenas quando a mistura dos dois polímeros possuem composições representadas por pontos acima da binodal (ponto F), enquanto que misturas representadas por pontos abaixo da binodal (ponto D) resultam numa solução homogênea (CABRAL & AIRES-BARROS, 1993).

A FIGURA 02 apresenta o diagrama de fases para o sistema Polietileno glicol 4000-Dextrana T500 a 20 °C, estando o PEG concentrado na fase superior e a Dextrana na fase inferior. Nesta figura, a composição da fase inferior da mistura de concentração total T, é representada pelo ponto I, e a composição da fase superior, por S. A linha que une estes pontos é designada por "tie-line". Qualquer ponto sobre a mesma "tie-line" resulta num sistema em que as

fases têm as mesmas composições mas diferentes proporções em volume ( $V_s/V_I$ ). O comprimento da "tie-line" é um parâmetro que depende da concentração total do sistema, representando por isso uma medida da diferença entre as fases em equilíbrio. De fato, à medida que a composição do sistema se aproxima do ponto crítico (P) o comprimento da "tie-line" diminui, decrescendo também a diferença entre as duas fases. No ponto crítico, a composição e o volume das duas fases em equilíbrio tornam-se iguais (CABRAL & AIRES-BARROS, 1993).

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

$$V_s/V_I = d_I/d_s \times TI/TS$$

No entanto, a densidade das duas fases não é muito diferente da densidade da água, pelo que a razão de volumes pode ser obtida aproximadamente a partir das distâncias TI e TS na "tie-line".

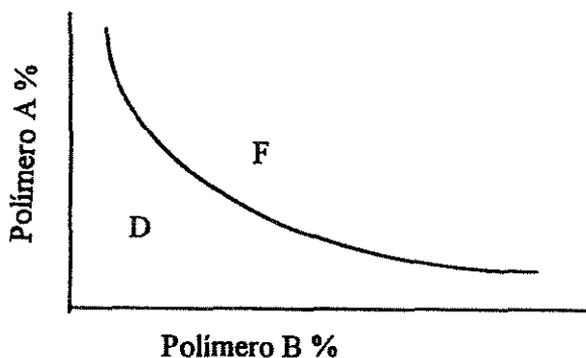


FIGURA 01- Diagrama de fases representativo de um sistema polímero A-polímero B-água. Misturas representadas por pontos acima da curva (ponto F) resultam em sistemas bifásicos, enquanto que misturas representadas por pontos abaixo da curva (ponto D) resultam em sistemas unifásicos

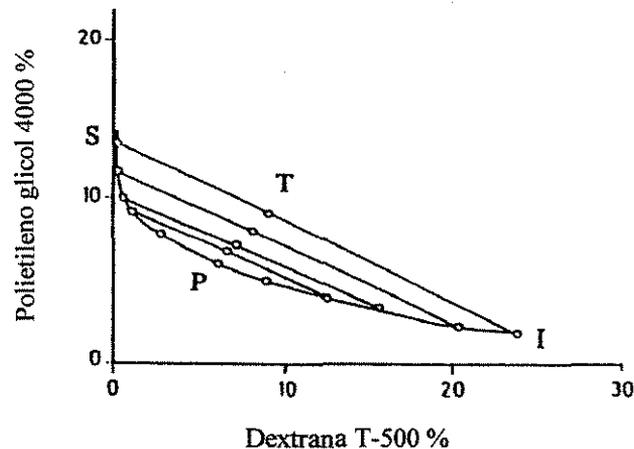


FIGURA 02- Diagrama de fases do sistema Polietileno glicol 4000-Dextrana T-500 a 20 °C (ALBERTSSON, 1986), onde: T representa a composição total do sistema; S a composição da fase superior; I a composição da fase inferior; P o ponto crítico

### 2.1.2.1. Termodinâmica do diagrama de fases

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

$$\Delta G_m = \Delta H_m - t\Delta S_m$$

onde  $\Delta G_m$ ,  $\Delta H_m$ ,  $T\Delta S_m$  e  $t$  referem-se a energia livre de Gibbs de mistura, a entalpia de mistura, entropia de mistura e temperatura, respectivamente. Se  $\Delta G_m$  é negativo, a mistura dos polímeros com água resultará numa solução homogênea. Se  $\Delta G_m$  é positivo, a separação de fases ocorrerá. A teoria de FLORY-HUGGINS (1941) sugere que se as concentrações das soluções de polímeros são baixas, existirá apenas um pequeno ganho de entropia na mistura dos polímeros em água.

Entretanto, uma vez que a cadeia do polímero tem uma área superficial muito maior do que os compostos de baixo peso molecular, as interações entre os segmentos das duas moléculas de polímero, que são geralmente desfavoráveis, levará a um  $\Delta H_m$  positivo que dominará o  $\Delta G_m$  da expressão (FLORY, 1953). O  $\Delta G_m$  positivo resultará na separação das fases. Portanto pode-se concluir pelo uso da teoria de FLORY-HUGGINS (1941) que a água não possui um papel importante na separação das fases, mas sim apenas as interações entre os polímeros.

Por outro lado, ZASLAVSKY e colaboradores (1989) afirmam que a estrutura da água também deve ser considerada na separação de fases. Sua teoria baseia-se nas propriedades físico-químicas da água (constante dielétrica, tempo de relaxamento dielétrico, afinidade relativa da água para o grupo  $\text{CH}_2$  e polaridade total), ou seja, a água não se comportaria como um solvente inerte sendo capaz de interagir em múltiplas ligações covalentes, como também em pontes de hidrogênio em um único segmento dos polímeros hidrofílicos envolvidos. Estes autores baseiam-se no fato de que alterando-se diferentes fatores (temperatura, solventes orgânicos, sais inorgânicos) efeitos similares são produzidos no comportamento do diagrama de fases. O ponto que esses fatores têm em comum é afetar a estrutura da água.

#### **2.1.2.2. Fatores que influenciam o comportamento do diagrama de fases**

O diagrama de fases de um determinado sistema pode ser influenciado por muitos fatores como a concentração e peso molecular dos polímeros, temperatura, adição de sais e pH, embora os mecanismos e os efeitos através dos quais estes parâmetros influenciam a separação das fases ainda não estejam completamente compreendidos (KULA et al., 1982).

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

O efeito da concentração dos polímeros foi rapidamente discutido na descrição do diagrama de fases. Normalmente, para baixas concentrações de polímeros, ambos são miscíveis com a água e entre si. Com o aumento da concentração, ocorrerá a separação de fases (DIAMOND & HSU, 1992).

O efeito da temperatura é muito diferente de sistema para sistema, dependendo do tipo de polímero usado. Normalmente, sistemas bifásicos aquosos compostos por polímero-sal, como os sistemas PEG-fosfatos, formam mais facilmente duas fases a temperaturas elevadas, ocasionando uma diminuição nas concentrações de polímero e sal necessárias a formação de duas fases. Pelo contrário, sistemas polímero-polímero, como o PEG-Dextrana, formam com mais facilidade duas fases a temperaturas mais baixas, o que promove uma aproximação da binodal da origem do diagrama de fases. Comportamentos similares são observados para sistemas Polivinilpirrolidina-Dextrana e Polivinil álcool-Dextrana (ZASLAVSKY et al.,1989); já o sistema Metilcelulose-Dextrana não é praticamente afetado pela temperatura (DIAMOND & HSU, 1992).

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

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

### 2.1.2.3. Propriedades físicas das fases

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

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

A viscosidade das fases está diretamente relacionada com o aumento da massa do polímero; geralmente, quanto maior for a massa molecular do polímero, mais elevada é a viscosidade das duas fases em equilíbrio (ALBERTSSON, 1986). Entretanto, o aumento da viscosidade com a massa molecular do polímero pode ser minimizado pelo fato de que, quando se usam polímeros de elevada massa molecular, são necessárias concentrações mais baixas destes polímeros para a formação das fases. De fato, a viscosidade de uma solução de polímero é

extremamente dependente da sua concentração (CABRAL & AIRES-BARROS, 1993; TJERNELD & JOHANSSON, 1990).

A pressão osmótica das fases é pequena devido aos elevados pesos moleculares dos polímeros formadores das fases. Quando as fases estão em equilíbrio, a pressão osmótica é a mesma para ambas. Em elevadas concentrações dos polímeros, a pressão osmótica é independente do peso molecular (ALBERTSSON, 1986).

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

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

#### **2.1.2.4. Fatores que influenciam a partição de biomoléculas em sistemas bifásicos aquosos**

Os fundamentos da partição de biomoléculas entre duas fases ainda não são bem compreendidos, apesar do significativo progresso alcançado com a modelagem termodinâmica da distribuição de proteínas em SBA. A modelagem quantitativa da partição de proteínas representa

um problema complexo pelo fato do comportamento do sistema depender de fatores muito diversos como tamanho da molécula, conformação, estrutura da superfície, interações de polímeros com as cadeias das proteínas e com diferentes sais, interações polímero-polímero, sal-proteína, e, quando usados, as interações dos ligantes com os outros componentes presentes. As condições adequadas para a partição deverão ser encontradas experimentalmente devido à interdependência dos fatores acima citados. Considerando que  $C_s$  seja a concentração da proteína na fase superior e  $C_i$  a concentração da proteína na fase inferior, o coeficiente de distribuição das proteínas é definido por:

$$K = C_s / C_i$$

A distribuição de substâncias solúveis como proteínas e ácidos nucléicos entre as fases é então caracterizada pelo coeficiente de partição ( $K$ ).

Devido a capacidade de adsorver material biológico, a interface pode desempenhar também um papel muito importante na partição entre as duas fases do sistema. De fato, no estudo da partição de partículas em suspensão, como células e organelas celulares, três "fases" devem ser consideradas: a fase de cima, a interface e a fase de baixo, pois a interface adsorve quantidades relativamente grandes de biomaterial. Na partição de substâncias solúveis este fenômeno não é significativo (ALBERTSSON, 1986).

ALBERTSSON, (1986) propôs o modelo mais simples para o cálculo de  $K$ , considerando que a partição de substâncias com atividade biológica em SBA varia com inúmeros fatores: fatores de ordem estrutural e de ordem ambiental. Assim, o coeficiente de partição pode ser definido pela expressão:

$$\log K = \log K_{amb} + \log K_{est}$$

onde  $K_{amb}$  e  $K_{est}$  representam, respectivamente, a contribuição dos fatores de ordem ambiental e estrutural para o coeficiente de partição.

No grupo dos fatores ambientais englobam-se as propriedades e características do SBA: sais (tipo e concentração), polímeros (tipo, peso molecular e concentração), pH, temperatura e

presença de ligandos bioespecíficos. Os fatores estruturais relacionam-se com as propriedades do material a particionar: peso molecular, carga superficial, hidrofobicidade e outras propriedades de superfície (MATIASSON & LING., 1987; DIAMOND & HSU, 1992).

Entretanto, modelos quantitativos para predição do comportamento do sistema em função do tipo de polímero, de biomolécula, da composição das fases, do pH e da temperatura não estão disponíveis. Adicionalmente, os mecanismos fundamentais que governam o comportamento destas variáveis não foram ainda satisfatoriamente elucidados (BASKIR *et al.*, 1989). Uma vez mais é possível ressaltar a importância do desenvolvimento da termodinâmica da extração com SBA (KULA, 1990).

A partição de compostos com atividade biológica pode ser ajustada por manipulação da composição dos SBA. A estrutura, presença de grupos iônicos, massa molecular e concentração dos polímeros influenciam a partição.

Em geral, um aumento na massa molecular de um dos polímeros do sistema bifásico, para uma determinada composição de fases, diminui a partição de material biológico para a fase rica neste polímero. Por exemplo, em sistemas PEG-Dextrana observa-se um aumento no coeficiente de partição de proteínas quando se aumenta a massa molecular da Dextrana ou quando se diminui a massa molecular do PEG (HUSTEDT *et al.*, 1978). Este efeito da massa molecular dos polímeros está muito relacionado com a massa molecular do biomaterial. De fato, a partição de aminoácidos ou proteínas de baixa massa molecular (até 10.000 Da) não é muito influenciada por variações na massa molecular dos polímeros, não acontecendo o mesmo com proteínas de maior massa molecular (WALTER & JOHANSSON, 1986).

Perto do ponto crítico de um sistema bifásico as duas fases em equilíbrio têm composições muito semelhantes, pelo que o coeficiente de partição de biomoléculas é aproximadamente igual a 1. Pelo contrário, aumentando a concentração dos polímeros, ou seja, afastando-se do ponto crítico, as biomoléculas distribuem-se de forma desigual entre as duas fases, podendo acumular-se preferencialmente nas fases de cima ou de baixo (ALBERTSSON, 1986). Em sistemas PEG-Dextrana, a concentração da Dextrana não é considerada uma variável muito crítica, enquanto que a concentração de PEG influencia a partição de forma mais acentuada.

Tal como foi referido, são muitos os polímeros solúveis em água que podem ser usados para formar sistemas de duas fases aquosas. ALBERTSSON (1986) publicou extensas listas de SBA obtidos pelas mais variadas combinações de polímeros. Do tipo de polímero escolhido para formar o sistema bifásico, depende, por exemplo, a hidrofobicidade das duas fases e consequentemente a partição de biomateriais. ALBERTSSON (1986) comparou a hidrofobicidade de soluções aquosas de vários polímeros tendo obtido a seguinte sequência: Sulfato de dextrana Carboximetildextrana < Dextrana < Hidroxipropildextrana < Metilcelulose < Polivinil álcool < PEG < Polipropileno glicol.

O efeito da temperatura na partição de proteínas não tem sido sistematicamente avaliado (DIAMOND & HSU, 1992; FORCINITI *et al.*, 1991). A influência da temperatura é bastante complexa devido ao seu efeito na composição das fases em equilíbrio, assim como a alteração (associação ou dissociação) da estrutura da proteína e desnaturação. Alguns trabalhos relatam um aumento do coeficiente de partição com a temperatura (JOHANSSON *et al.*, 1983; JOHANSSON *et al.*, 1984; TJERNELD *et al.*, 1985;); outros, que não há relação entre o coeficiente de partição e a temperatura (JOHANSSON *et al.*, 1973; TJERNELD *et al.*, 1985), demonstrando a necessidade de estudos mais aprofundados para se esclarecer o efeito deste parâmetro sobre a partição.

A adição de sais, mesmo em concentrações milimolares, influencia fortemente a partição de materiais carregados eletricamente. Embora os sais se distribuam quase que igualmente entre as fases, existem pequenas mas significantes diferenças nos coeficientes de partição de diferentes sais, o que significa que diferentes íons possuem diferentes afinidades pelas fases, criando uma diferença de potencial elétrico entre as fases, que por sua vez direciona a partição de materiais biológicos carregados. Mesmo em SBA formados por dois polímeros sem carga, caso do sistema PEG-Dextrana, alguns íons mostram diferentes afinidades para as fases. A influência de diferentes sais na partição de proteínas a baixas concentrações foi estudada no sistema PEG-Dextrana (ALBERTSSON, 1986). Para proteínas carregadas negativamente, os cátions diminuem o coeficiente de partição na ordem  $\text{Li}^+ < \text{NH}_4^+ < \text{Na}^+ < \text{Cs}^+ < \text{K}^+$  e os ânions monovalentes na ordem  $\text{F}^- < \text{Cl}^- < \text{Br}^- < \text{I}^-$ . Os ânions bivalentes diminuem o coeficiente de partição na ordem  $\text{HPO}_4^{2-} < \text{SO}_4^{2-}$ . O efeito é oposto para proteínas carregadas positivamente. Assim, para se obter um elevado coeficiente de partição para proteínas carregadas negativamente, deve-se usar monohidrogeno

fosfato de sódio ou lítio. Por outro lado, para se obter um menor coeficiente de partição, deve-se usar cloreto ou brometo de potássio. Uma vez que a carga na maioria dos materiais biológicos é dependente do pH, a escolha deste e de um sal pode constituir um modo efetivo de ajuste da partição (WALTER & JOHANSSON, 1986). A dependência do coeficiente de partição para concentrações elevadas de sais no sistema PEG-Dextrana também foi explorada por ALBERTSSON (1986) para o NaCl. As forças iônicas mais elevadas ( $> 1,0$  M), a partição de proteínas é fortemente influenciada pela concentração do sal. O aumento do coeficiente de partição com o aumento da concentração de NaCl pode ser atribuído a um aumento das interações hidrofóbicas com o Polietileno glicol ou a efeitos do "salting-out". Apesar do Polietileno glicol ser hidrofílico, suas interações com os domínios hidrofóbicos das proteínas podem aumentar para concentrações elevadas de sal. Este efeito é muito comum em partição de proteínas, sendo observado principalmente em sistemas de PEG-Dextrana com NaCl.

Em sistemas polímero-sal, a partição de material biológico é fortemente influenciada pela concentração do sal, o que pode ser atribuído a efeitos de "salting-out" (KULA et al., 1982). Em sistemas de PEG-Sal, um aumento do comprimento da "tie-line" promove a transferência das proteínas da fase rica em sal para a fase rica em PEG ou, caso a solubilidade das proteínas nesta fase não seja suficientemente elevada, a precipitação destas na interface.

Em geral, o coeficiente de partição de moléculas pequenas, como aminoácidos, é aproximadamente igual a 1 (SAZAKAWA & WALTER, 1974). Pelo contrário, moléculas maiores tendem a se distribuir de maneira desigual entre as fases, acumulando-se preferencialmente numa das fases (SAZAKAWA & WALTER, 1972). Existem, no entanto, algumas exceções, o que mostra que a partição entre as fases depende de outras propriedades, além do tamanho da biomolécula, como por exemplo, propriedades de superfície (carga e hidrofobicidade).

A influência da carga da biomolécula na sua partição pode ser estudada medindo o coeficiente de partição a vários valores de pH (SAZAKAWA & WALTER, 1974) pois, como se sabe, a carga de biomoléculas depende do pH. Contudo, esta influência da carga da biomolécula depende muito do tipo de sal presente no sistema, uma vez que diferentes sais dão origem a diferentes potenciais elétricos entre as fases, como discutido anteriormente. Para se ocultar a contribuição do tampão para o potencial interfacial, o sal deve ser adicionado em excesso. Este comportamento pode ser explorado para a determinação do ponto isoelétrico (pI) das proteínas.

Para tal, basta determinar o coeficiente de partição para diferentes pH e na presença de diferentes sais, correspondendo o pI ao pH para o qual não se detecta o efeito do sal na partição (ALBERTSSON, 1986). A partição de proteínas em sistemas possuindo potencial nulo, para o que basta escolher o sal ou a mistura de sais apropriada, deveria ser independente da carga, ou seja, independente do pH. No entanto, certas proteínas não apresentam este tipo de comportamento em determinados intervalos de pH, o que, em alguns casos, pode ser explicado em termos de alterações conformacionais da estrutura das proteínas (ALBERTSSON, 1986). Em condições extremas de pH é possível que ocorra a desnaturação das proteínas. Geralmente, a partição de proteínas desnaturadas é diferente da partição das mesmas proteínas na forma nativa, o que pode ser atribuído não só à maior área superficial da forma desnaturada, mas também ao fato da superfície exposta desta ser muito mais hidrofóbica (ALBERTSSON, 1986).

A modificação química de um dos polímeros do sistema bifásico constitui um processo de aumentar a partição de material biológico para a fase rica nesse polímero e inclui a ligação covalente de grupos carregados, grupos hidrofóbicos e outros ligandos possuindo afinidade específica para determinada biomolécula (JOHANSSON, 1989; JOHANSSON et al., 1973; WALTER & JOHANSSON, 1986). De fato, a introdução de grupos carregados positivamente a um dos polímeros do sistema promove um aumento na partição de proteínas possuindo carga negativa para a fase rica neste polímero. Assim, a intensidade desta interação eletrostática entre o polímero carregado e as proteínas e conseqüentemente a partição depende fortemente do pH, uma vez que deste depende a carga das proteínas (ALBERTSSON et al., 1990).

Conforme comentado anteriormente, a ligação de grupos hidrofóbicos a um dos polímeros aumenta a afinidade de proteínas com zonas de ligação hidrofóbicas para a fase rica neste polímero. Este tipo de partição em que as interações hidrofóbicas assumem um papel muito importante, vulgarmente conhecida como partição de afinidade hidrofóbica, pode ser usada não só para separar material biológico de acordo com sua hidrofobicidade, mas também para medir a hidrofobicidade de proteínas e partículas celulares (JOHANSSON et al., 1973).

Muitas proteínas apresentam interações únicas com pequenas moléculas, permitindo a alteração da partição e a obtenção de seletividade. Esta aproximação, denominada partição por afinidade, combina o efeito da partição com o do biorreconhecimento. Uma classe de ligandos bastante usada nestas aplicações são os corantes de triazina que, quando ligados ao PEG em

sistemas PEG-Dextrana, aumentam consideravelmente a afinidade de uma série de proteínas para a fase rica em PEG (JOHANSSON, 1989). A partição por afinidade constitui assim um processo de aumentar a especificidade e a seletividade da extração líquido-líquido de material biológico.

O fato da partição depender de um grande número de fatores distintos confere considerável versatilidade aos sistemas de duas fases aquosas na separação de misturas de componentes. Entretanto, a existência de tantas variáveis, na sua grande maioria interdependentes, torna extremamente difícil a previsão teórica do coeficiente de partição de um dado soluto, obrigando por vezes a um trabalho experimental exaustivo (KULA et al., 1982).

#### **2.1.2.5. Termodinâmica da partição**

O banco de dados para SBA é pobre no que se refere a seleção e concentração de sais adicionados, pH, temperatura e peso molecular dos polímeros adequados para se obter um fator de purificação satisfatório. Adicionalmente, estas condições devem ser ajustadas ao tipo de biomolécula a ser particionada. Assim é fundamental estabelecer métodos que possibilitem a predição o comportamento das variáveis do sistema, para tornar o processo de purificação comercialmente viável.

Vários modelos teóricos que descrevem as propriedades termodinâmicas de SBA e a partição de proteínas nestes sistemas têm sido propostos. DIAMOND & HSU (1989) utilizaram uma forma modificada da teoria de FLORY-HUGGINS (1941) para correlacionar a partição de proteínas em sistemas PEG-Dextrana. KING e colaboradores (1988) modelaram com sucesso a partição de proteínas em sistemas PEG-Dextrana na presença de sais usando um modelo termodinâmico-molecular baseado na equação do virial. Além destes, vários outros modelos teóricos e experimentais têm sido desenvolvidos por pesquisadores em todo mundo (EITMANN & GAINER, 1992; GROßMANN & GAINER, 1988; GROßMANN et al., 1998; LIN et al., 1999; TINTINGER et al., 1997).

De fato, estes modelos facilitam o desenvolvimento dos fundamentos termodinâmicos para SBA (KULA, 1990). No entanto, muitos deles são limitados não só devido a dificuldade em se determinar seus parâmetros, mas também pelo fato de que o grande número de parâmetros e sua

variação com a composição do sistema requer um elevado número de experimentos independentes (BASKIR *et al.*, 1989). Conseqüentemente, o banco de dados de métodos capazes de correlacionar e prever o comportamento de partição de materiais biológicos em SBA está longe de se tornar adequado para aplicações industriais.

### 2.1.3. APLICAÇÕES EM LARGA ESCALA

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

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

- facilidade no aumento da escala;
- rápida transferência de massa;
- equilíbrio alcançado com recurso a baixas energias na forma de mistura mecânica;
- possibilidade de operação em contínuo;
- possibilidade de operação à temperatura ambiente, sendo
- mais econômico que outros processos de separação.

As operações envolvendo os sistemas bifásicos aquosos são, de um modo geral, facilmente executadas em qualquer escala técnica. Isto se deve principalmente a rapidez com que ocorre o equilíbrio das fases permitindo um coeficiente de partição constante devido a baixa tensão interfacial destes sistemas, a simplicidade das unidades de operação e a disponibilidade comercial dos equipamentos necessários (CABRAL & AIRES-BARROS, 1993). Em particular, a facilidade em se obter o "scale-up" pode ser demonstrado pela independência do coeficiente de partição com

relação ao volume dos sistemas. Aumentos de escala com fatores de 25.000 já foram mencionados. Para facilitar a utilização destes sistemas de escala laboratorial para larga escala, no entanto, faz-se necessário a caracterização do sistema bifásico adequado para a partição de uma determinada proteína, e a correlação deste com o coeficiente de partição da biomolécula (DIAMOND & HSU, 1992).

Assim, quando se deseja isolar uma determinada proteína de uma mistura complexa, torna-se essencial encontrar as condições ideais. Isto é realizado normalmente, conforme descrito anteriormente, via experimentos em escala laboratorial, para então se realizar o “scale-up”. Para se obter o projeto de um experimento, é importante otimizar o rendimento e a partição versus o restante dos componentes da mistura, isto é, o fator de purificação. Exemplos de purificação de proteínas podem ser observados na TABELA 02. A grande vantagem é que os componentes que podem prejudicar os passos de purificação são removidos sem a necessidade da utilização de centrifugações e filtração por membranas. Ainda, a partição espontânea de proteínas reside no fato de que o material contaminante é facilmente removido em um só passo. Sob condições favoráveis, é possível atingir-se um elevado fator de purificação no primeiro passo de extração (MATIASSEN & LING, 1987).

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

TABELA 02- Extração de enzimas utilizando a partição espontânea

Enzimas	Organismos	Sistemas	Partição	Rendimento (%)	Fator de purificação	Referências
$\beta$ -galactosidase	<i>E. coli</i>	PEG-Sal	62	87	9,3	VEIDE et al., 1983
pululanase	<i>K. pneumoniae</i>	PEG-Dextrana	3,0	91	2	HUSTEDT et al., 1978
formatodesidrogenase	<i>C. biodinii</i>	PEG-Dextrana bruta	11	94	n. id.*	KRONER et al., 1982

n. id.\* : não identificado

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

#### **2.1.4. SISTEMAS BIFÁSICOS AQUOSOS MAIS ESTUDADOS**

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

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

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

Estes sistemas parecem exibir características fundamentais, apresentam propriedades físicas favoráveis, como baixa viscosidade em ambas as fases e uma razoável diferença de densidade entre as duas fases e são formados por polímeros biodegradáveis e disponíveis em grande quantidade, enquadrando-se dentro da legislação de um grande número de países para o trabalho com produtos alimentícios e farmacêuticos (DIAMOND & HSU, 1992).

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

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

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

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

### 2.1.5. SISTEMAS BIFÁSICOS ALTERNATIVOS

KRONER e colaboradores (1982) analisaram a aplicação da Dextrana bruta para a purificação de enzimas em grande escala em sistemas com PEG. Embora este sistema tenha sido utilizado como alternativa econômica, uma vez que proporcionou uma redução significativa nos custos referentes a Dextrana e na eliminação do problema da elevada concentração de sais nos efluentes, apresentou como desvantagem uma elevada viscosidade na fase inferior, cerca de 20 vezes maior quando comparado a fases correspondentes com Dextrana fracionada.

Em algumas aplicações, os polímeros (PEG e Dextrana) têm sido modificados por diferentes métodos, como por exemplo, pela introdução de ligandos por afinidade (por exemplo, alterando a hidrofobicidade ou a carga). Assim, outros derivados da Dextrana, como o Hidroxipropildextrana, Carboximetildextrana e Sulfato de dextrana têm sido utilizados na obtenção de sistemas bifásicos, especialmente com o PEG (ALBERTSSON 1986).

Dentre os polímeros testados para partição bifásica aquosa como substituto da Dextrana, destaca-se o sucesso obtido pelo Hidroxipropilamido. Este polímero, formado a partir do amido, produto natural abundante de custo de produção inferior a Dextrana, possibilita uma aplicação mais econômica a sistemas bifásicos aquosos. Comercializado pela Reppe AB, sob o nome comercial de Reppal PES, este polímero tem sido, logo em seguida a Dextrana, o mais empregado em partição bifásica aquosa (TJERNELD et al., 1986; STURESSON et al., 1990). A substituição da Dextrana por Reppal PES em sistemas bifásicos provocou uma redução significativa no custo dos reagentes necessários a formação de fases (TJERNELD et al., 1986).

A modificação da molécula do amido pela adição de grupos hidroxipropil tem sido realizada para minimizar a tendência da retrogradação e formação de géis (TJERNELD & JOHANSSON, 1990). Outra alternativa para reduzir a tendência a gelificação de soluções de amido é a redução do peso molecular do polímero, usando, por exemplo, dextrina. Um sistema de baixo custo baseado em PEG-Maltodextrina tem sido utilizado para a extração de enzimas (SZLAG & GIULIANO, 1988).

Derivados de celulose também têm sido utilizados para a formação de sistemas bifásicos aquosos. O sistema Metilcelulose-Dextrana foi testado nos primórdios do desenvolvimento da partição com sistemas bifásicos aquosos (ALBERTSSON, 1986). O Etilhidroxietilcelulose foi

estudado como constituinte para sistemas bifásicos. Estes dois derivados de celulose formam sistemas bifásicos com Dextrana a baixas concentrações (1-2%), uma característica a ser considerada economicamente quando se deseja realizar estudos em larga escala (TJERNELD & JOHANSSON, 1990). SKUSE e colaboradores (1992) também estudaram a aplicação de Hidroxipropilcelulose sob o nome comercial de Klucel L em SBA.

Sistemas baseados em PEG-Pululana, um polissacarídeo microbiológico disponível comercialmente a baixo preço têm sido investigados com o objetivo de substituição da Dextrana em aplicações biotecnológicas (NGUYEN et al., 1988).

Outra alternativa ao sistema PEG-Dextrana consiste no recurso a polímeros não purificados. Pelo recurso a estes polímeros pretende-se, mantendo as propriedades de partição apresentadas pelos mesmos polímeros na sua forma mais pura, reduzir substancialmente o custo associado a aplicação em grande escala de sistemas bifásicos aquosos polímero-polímero. VENÂNCIO (1996) e VENÂNCIO e colaboradores (1993; 1995) testaram a implementação de polissacarídeos não purificados em partição bifásica aquosa como o Hidroxipropilamido, Goma de Guar e Farinha de Alfarroba.

Recentemente, CHRISTIAN e colaboradores (1998) realizaram um estudo preliminar do uso de uma arabinogalactana em SBA. A análise do sistema demonstrou vantagens econômicas com o uso deste polissacarídeo frente a Dextrana.

Além de polissacarídeos, outras classes de polímeros têm sido estudadas para aplicação em sistemas bifásicos aquosos juntamente com o PEG, como Poliéteres (categoria que inclui o PEG), Polivinilpirrolidinas, Poliacrilatos e Poliálcoois em certos intervalos de concentração (TJERNELD & JOHANSSON, 1990).

Detergentes aniônicos como o Triton X-114 têm sido igualmente empregues na purificação de moléculas biológicas. Estes detergentes são constituídos por uma cadeia hidrofílica de polioxietileno com 9 ou 10 unidades e uma cabeça hidrofóbica. O Triton X-114 é solúvel em água a baixas temperaturas, mas quando aquecido a temperaturas superiores a 25°C separa-se em duas fases, uma rica em detergente e a outra pobre no mesmo. Nestes sistemas as proteínas separam-se de acordo com sua hidrofobicidade (SANCHEZ-FERRER et al., 1994).

Embora a revisão da literatura tenha demonstrado o constante avanço nas pesquisas com sistemas bifásicos aquosos, para que esta técnica de partição tenha lugar de destaque como

processo de separação em grande escala, existe a necessidade em se buscar novos polímeros. Dentro deste contexto, vários polímeros, em especial, polissacarídeos, têm sido testados como constituintes de sistemas bifásicos.

### **2.1.6. POLISSACARÍDEO DO CAJUEIRO (POLICAJU)**

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

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

As gomas industriais podem ser classificadas em naturais e modificadas. As naturais podem ser obtidas de exsudatos de árvore, de sementes, de algas ou por fermentação microbológica. As modificadas são as derivadas de polissacarídeos insolúveis, como por exemplo, a celulose. A TABELA 03 apresenta exemplos de gomas industriais classificadas pela fonte.

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

TABELA 03- Exemplos de gomas industriais classificadas pela fonte

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

As gomas vegetais oriundas de árvores (ou exsudatos vegetais) são constituídas principalmente por heteropolissacarídeos, sendo produzidas espontaneamente após injúria mecânica ou invasão microbiana através dos troncos, galhos ou frutos, constituindo-se como parte do metabolismo normal da planta. Sua produção parece estar relacionada com algum mecanismo protetor do vegetal (JONES & SMITH, 1949; MARQUES & XAVIER-FILHO, 1991).

As gomas vegetais podem ser classificadas de acordo com propriedades físicas como solubilidade e viscosidade, com relação a presença de ácidos urônicos (gomas ácidas ou neutras) e também utilizando-se da estrutura química do heteropolissacarídeo (SMITH & MONTGOMERY, 1959; ASPINNAL, 1969; STEPHEN, 1983).

O uso de gomas naturais, provenientes dos exsudatos e extratos de plantas, vem tomando grande impulso pelas múltiplas e lucrativas possibilidades de industrialização. O exsudato do cajueiro, produzido pela *Anacardium occidentale* L., planta nativa do nordeste brasileiro (FIGURA 03), consiste num heteropolissacarídeo ramificado (arabinogalactana ácida) exsudado naturalmente ou através de incisões do tronco e ramos da árvore como uma goma ou resina de coloração amarelada e solúvel em água (MENESTRINA et al., 1998; PAULA & RODRIGUES, 1995).



FIGURA 03 - Exsudato obtido de *Anacardium occidentale* L.

A goma possui característica semelhante a goma arábica, podendo substituí-la como cola líquida para papel, na indústria farmacêutica, em cosméticos, e como aglutinante de cápsulas e comprimidos, e na indústria alimentícia como estabilizante de sucos, cervejas e sorvetes. Desta forma, o polissacarídeo do cajueiro representa um uso alternativo não convencional, podendo ser utilizado com diferentes finalidades. Existem estudos da goma do cajueiro com árvores provenientes da Índia (Madras), Nova Guiné (Papua) (ANDERSON et al., 1974; ANDERSON et al., 1975) e também com árvores brasileiras, destacando-se o estado do Ceará como maior produtor do país (MENESTRINA et al., 1998; PAULA & RODRIGUES, 1995; RODRIGUES et al., 1993). A goma do cajueiro é constituída por unidades de galactose, arabinose, glicose, ácido urônico, manose e xilose. Entretanto, tem sido verificado que a percentagem dos monossacarídeos varia de acordo com a região geográfica. Um possível fragmento estrutural da goma pode ser observado na FIGURA 04. A TABELA 04 mostra a composição da goma de *Anacardium occidentale* L. de diferentes regiões.

As árvores produzem cerca de 700g/ ano em goma. A produção de frutos em árvores com mais de 25 anos aumenta após a extração da goma (PAULA & RODRIGUES, 1995). Devido a importância da cultura do cajueiro em algumas regiões brasileiras, a goma tem apresentado, recentemente, um crescente interesse industrial, embora a aplicação deste produto biotecnologicamente ainda não tenha sido explorada.



Estudos recentes (PAULA & RODRIGUES, 1995) sobre a caracterização da goma do cajueiro mostram que esta é uma goma de baixa viscosidade. A viscosidade absoluta em soluções de 1% é de 1,0 mPas, encontrando-se dentro dos valores exigidos para a formação de uma dispersão de fases adequada, o que representa uma adequação da goma para aplicação como componente de sistemas bifásicos aquosos, além de constituir um produto de fácil obtenção, já que o Nordeste brasileiro é rico nesta fonte natural.

### 2.1.7. POLIETILENO GLICOL

O polietileno glicol (PEG),  $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ , é um poliéter sintético neutro, linear ou de cadeia ramificada, obtido por polimerização do óxido de etileno e disponível em uma variedade de pesos moleculares, de poucas centenas de milhares de daltons. Os dois grupos terminais (hidroxilas) são normalmente usados para ligação de ligandos por afinidade e outros grupos. Solubiliza-se em água e em solventes orgânicos. É também conhecido pelos nomes comerciais de poliglicol E®, carbowax® e pluracol E®, dependendo da empresa que o fabrica. Estão disponíveis em baixo preço. Para pesos moleculares acima de 20.000 daltons são denominados óxidos de polietileno, PEO. São fornecidos de forma de soluções incolores estáveis ou pastas se possuem pesos moleculares menores que 1.000. Os de pesos moleculares elevados, acima de 1.000, são encontrados na forma de pó ou de flocos brancos. Podem ser estocados a temperatura ambiente, embora a 4 °C a ocorrência de oxidação em soluções seja retardada (HARRIS, 1992).

Sendo não antigênico nem imunogênico, foi aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration). Sua utilização é de interesse na biotecnologia e biomedicina, principalmente por excluir, em ambiente aquoso, outros polímeros de sua vizinhança, não se solubilizando com eles. Está sujeito a modificações químicas rápidas controlando a solubilidade e aumentando o tamanho de moléculas as quais se liga. Não provoca a diminuição da atividade de células e proteínas, sendo biodegradável e atóxico (HARRIS, 1992).

### 2.1.8. EQUIPAMENTOS UTILIZADOS NA EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

Ultimamente, em virtude da necessidade em se procurar alternativas mais viáveis economicamente para uma dada separação, a extração líquido-líquido vem sendo usada de maneira crescente. Isso torna-se evidente pelo grande número de novos equipamentos desenvolvidos neste campo.

Alguns fatores que vêm estimulando o desenvolvimento da extração líquido-líquido, atualmente, são (HUMPHREY et al., 1984):

- perspectivas de economia de energia em comparação a destilação;
- possibilidade de evitar a degradação de compostos, devido ao efeito da temperatura, que pode ser causada por processos que fazem uso de energia térmica;
- desenvolvimento de equipamentos mais eficientes e que permitam um contato das fases líquidas mais efetivo;
- melhor entendimento dos princípios para desenvolvimento, projeto e “scale-up” dos processos de extração.

No passado, as operações de extração líquido-líquido eram restritas a processos que utilizassem um pequeno número de estágios devido a elevada altura dos estágios teóricos associados a colunas gravitacionais que representava um alto investimento de capital, tornando o processo de extração bastante oneroso. Nas últimas décadas, contudo, novos projetos de extratores tipo coluna e tanques misturados foram desenvolvidos possibilitando em vários casos considerar a extração líquido-líquido como alternativa para separações que requerem um grande número de estágios teóricos (LOGSDAIL et al., 1957). O desenvolvimento de novos equipamentos para efetuar extração líquido-líquido tem tornado este método mais competitivo com relação aos outros processos de separação existentes (SOUZA, 1997).

Para o desenvolvimento de equipamentos de extração líquido-líquido, são alvo de considerações fatores como (STEINER, 1988):

- o sistema de trabalho: solvente a ser usado, grau de pureza do refinado, condições de escoamento dos líquidos, entre outros;
- dados de equilíbrio: são imprescindíveis, deverão estar disponíveis na temperatura de trabalho;

- dados de transferência de massa.

Durante o processo de extração vários fenômenos acontecem no interior do extrator, alguns dos quais prejudicam a transferência de massa. Os mais conhecidos são definidos abaixo:

- “Hold up”: é a fração retida da fase dispersa, que é a razão do volume da fase dispersa pelo volume total do equipamento
- Inundação: quando as condições de operação na coluna fazem com que seja impossível as correntes escoarem em contracorrente e uma fase se dispersar na outra. Nesta situação, as correntes entram e saem da coluna numa mesma extremidade
- “Backmixing” (mistura axial): é o retorno axial da fase dispersa. A fase dispersa escoar em sentido oposto ao esperado. Ele faz com que o gradiente de concentração, que é a força motriz da transferência de massa na coluna, diminua, prejudicando a taxa de transferência de massa e a eficiência de separação
- “Backflow”: é o retorno axial da fase contínua. Ocorre quando a fase contínua é carregada na direção oposta a esperada

Num processo de extração, existem diversos fatores que influenciam o desempenho do extrator, principalmente em escala industrial. Portanto, é necessário um estudo em escala piloto para melhor definir as condições de operação.

A utilização de extratores verticais nos processos de extração líquido-líquido é justificado devido a esses equipamentos ocuparem pequena área, terem boa eficiência de separação e apresentarem facilidades de operação e manutenção.

Existem vários tipos de extratores que podem ser classificados de acordo com os princípios gerais de operação e construção. Vários autores dividiram os extratores em duas categorias, de acordo com o tipo de contato entre as fases em (HANSON, 1971):

- Sistemas de contato e separação de fases em estágios (descontínuos): estes sistemas são formados por uma série de estágios compostos por tanques misturadores-decantadores, onde a solução e o solvente são misturados até serem atingidas as concentrações de equilíbrio em ambas as fases. Após isso deixa-se decantar a fase mais densa e, então, faz-se a separação das fases antes delas passarem ao próximo estágio. Nestes equipamentos, obtém-se altas eficiências

de separação em cada estágio. A desvantagem é o grande espaço físico que ocupam (FIGURA 05).

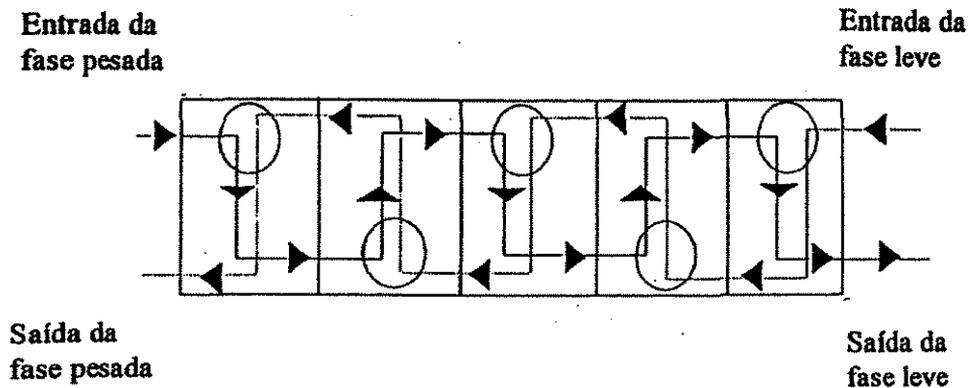


FIGURA 05- Exemplo de um extrator em estágios discretos

- **Sistemas de contato diferencial (contínuos):** nos sistemas diferenciais, os líquidos escoam continuamente em contracorrente, sem misturadores ou decantadores intermediários, sendo que estes contadores são normalmente colunas verticais. O escoamento em contracorrente ocorre em função da diferença de densidade entre as fases. A fase mais densa é alimentada no topo e flui de maneira descendente no interior da coluna e a fase menos densa é alimentada na base e flui em direção ao topo da coluna. As colunas de contato diferencial são equipamentos mais compactos e ocupam um menor espaço físico que os misturadores-decantadores.

Esta categoria pode ainda ser subdividida de acordo com a maneira de se promover a mistura das fases, em:

- Colunas sem agitação mecânica e separação pela gravidade, como colunas de pratos perfurados fixos, colunas tipo Spray e colunas recheadas (FIGURA 06). Nestes equipamentos, a forma de promover o contato entre as fases e portanto a transferência de massa, é a ação da força gravitacional, devido a diferença de densidade entre as fases. São os mais simples dos extratores diferenciais usados na extração líquido-líquido. Apresentam baixo custo de instalação e manutenção e ocupam reduzido espaço físico. A principal desvantagem é a baixa eficiência de separação.

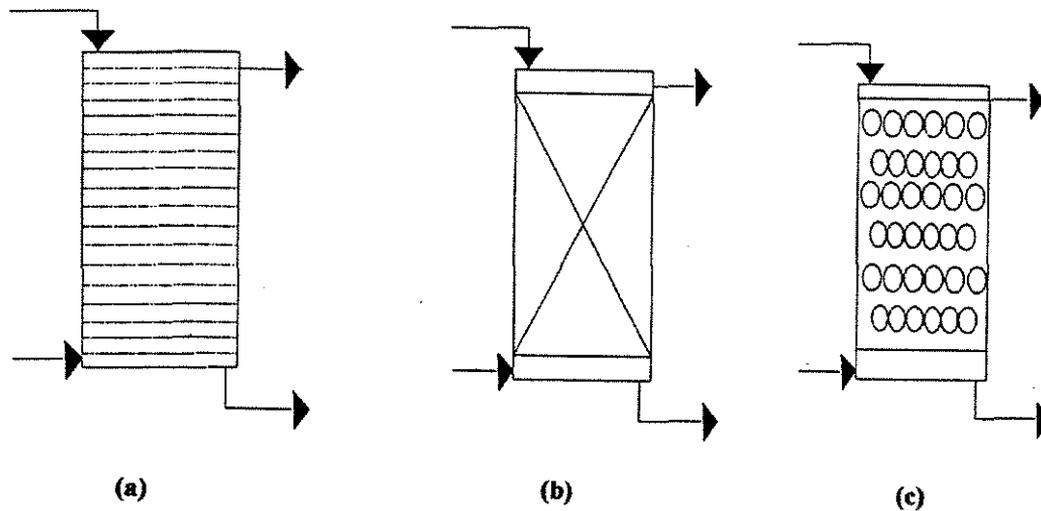


FIGURA 06- Exemplos de colunas que atuam sob a força da gravidade. (a) coluna de pratos fixos perfurados; (b) coluna recheada; (c) coluna Spray

- Colunas com agitação mecânica e separação pela gravidade, como coluna de discos rotativos (RDC), coluna de fluxo pulsado, coluna de pratos pulsados, coluna “Oldshue-Rushton”, coluna “Sheibel” e coluna Kuhni (FIGURA 07). Nestes extratores, além da força da gravidade, tem-se a ação da agitação causada mecanicamente que pode ser empregada através de pulsações ou sistemas rotativos. Nas colunas agitadas mecanicamente por meio de sistemas rotativos, a força da gravidade atua em conjunto com a energia introduzida por estes sistemas de rotação, que podem ser: discos rígidos ou perfurados, pás, turbinas, etc. O grau de dispersão, e portanto, o grau de transferência de massa é bastante elevado em comparação aos equipamentos sem agitação mecânica.

- Contadores centrífugos, que utilizam a força centrífuga como força motriz para a transferência de massa. São de desenvolvimento mais recente e possuem alta eficiência de separação e ocupam pouco espaço físico. A desvantagem é o seu alto custo de implantação. São exemplos o extrator Podbielniak, Luwesta e de Laval.

A classificação dos equipamentos segundo HANSON (1971) pode ser observada na TABELA 05.

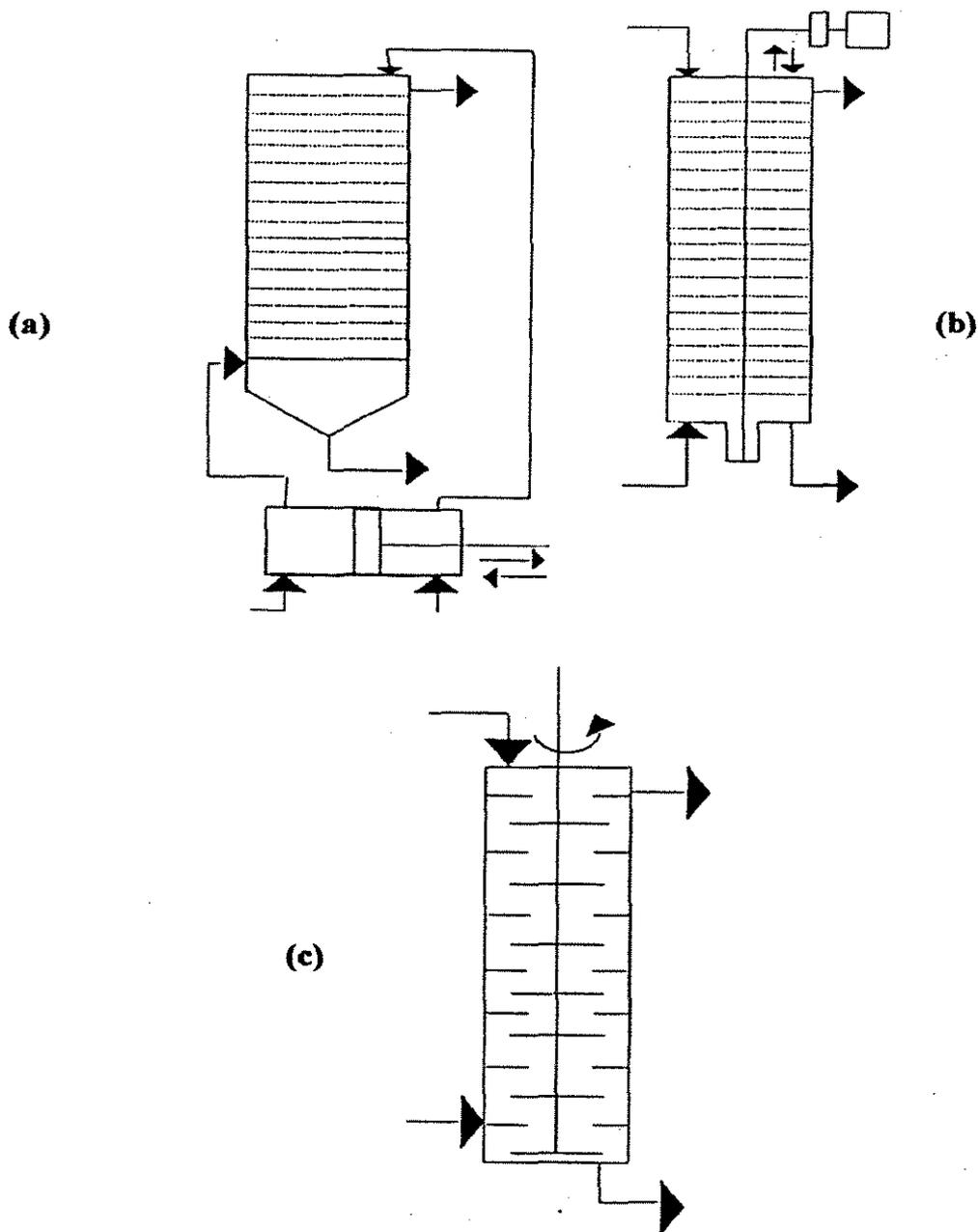


FIGURA 07- Exemplos de colunas que atuam sob a força da gravidade. (a) coluna de fluxo pulsado; (b) coluna de pratos pulsados; (c) coluna de discos rotativos

TABELA 05- Classificação dos equipamentos de extração segundo HANSON (1971)

TIPO DE AGITAÇÃO	CONTATO COM SEPARAÇÃO DE FASES	CONTATO CONTÍNUO
<b>SEM AGITAÇÃO</b>		-coluna Spray -coluna de chicanas -coluna recheada -coluna de pratos perfurados
<b>APARELHO AGITADO POR ROTAÇÃO</b>	-Holley-Mott -misturador-decantador simples -misturador-decantador com bomba -centrífuga de estágio individual -misturador-decantador com pulsação	-coluna Sheibel -coluna Oldshue-Rushton -contador de discos rotativos -coluna misturadora multi-estágio
<b>COM PULSAÇÃO</b>	-misturador-decantador com pulsação	-coluna recheada com pulsação -coluna de pratos perfurados pulsados -coluna de fluxo pulsado com pratos perfurados

### 2.1.9. PROCESSAMENTO CONTÍNUO

A maioria dos processos de extração de partículas biológicas tem sido realizados de modo descontínuo; recentemente, a utilização de processos contínuos têm ganhado um grande impulso, uma vez que o processamento contínuo apresenta inúmeras vantagens (BOLAND, 1990):

- Redução no tempo de processamento: os processamentos de fases aquosas atualmente são muito rápidos. A mistura e o equilíbrio das fases ocorre em alguns minutos quando se utilizam equipamentos adequados. Portanto, a utilização do processo contínuo permite processar

rapidamente grandes quantidades de material, com instalações reduzidas em relação a quantidade de material que está sendo processada, resultando numa economia de capital e energia.

- automação do processo, o que significa baixa mão-de-obra a ser empregada;
- obtenção de produtos mais homogêneos: a combinação entre o processo contínuo e a automação mantém o processamento mais constante, com poucas variações e maior uniformidade ao longo da corrida;
- maior rendimento de produtos lábeis: devido a rapidez do processamento, as perdas de materiais lábeis são minimizadas;
- possibilidade de reciclagem dos componentes constituintes das fases.

A aplicação de sistemas bifásicos aquosos para a purificação em contínuo de proteínas tem sido demonstrada em vários trabalhos utilizando diferentes sistemas de extração. ALBERTSSON (1986) descreveu a operação de uma unidade Craig, em modo contracorrente, empregando sistemas PEG-Dextrana. KULA e colaboradores (1982) pesquisaram a extração de formiato desidrogenase com sistemas PEG-Sal. HUSTEDT e colaboradores (1988) analisaram o processo contínuo em uma coluna Kuhni, em um extrator Graesser, em uma coluna Podbielniak e em uma unidade misturadora-decantadora usando SBA.

Em operação semicontínua, SAWANT e colaboradores (1990), PATIL e colaboradores (1991) e JAFARABAD e colaboradores (1992a; 1992b) avaliaram a transferência de massa e a fração retida da fase dispersa (“hold up”) para a albumina de soro bovino e para amiloglicosidase. Para a purificação da albumina foram empregadas as colunas tipo Spray e York-scheibel operando com sistemas PEG-Dextrana e PEG-fosfato de potássio, respectivamente. Para a separação da amiloglicosidase foi utilizado o sistemas PEG-sulfato de sódio nas colunas York-scheibel e Empacotada.

COIMBRA e colaboradores (1994) utilizaram um extrator Graesser para a separação das proteínas  $\alpha$ -lactoalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina do soro do leite com sistemas bifásicos PEG-fosfato e avaliaram a performance do extrator com relação a eficiência de separação e a transferência de massa (COIMBRA et al.,1995). PAWAR e colaboradores (1997) analisaram a fração retida da

fase dispersa e o coeficiente de transferência de massa em uma coluna Spray modificada utilizando o sistema bifásico PEG-sulfato para a extração de amilglicosidase e  $\beta$ -galactosidase. Mais recentemente, PORTO e colaboradores (1997; 1999) avaliaram a transferência de massa e a fração retida da fase dispersa (“hold up”) para o citocromo b5 e albumina de soro bovino em coluna de discos perfurados rotativos com sistemas PEG-fosfatos de potássio.

### **2.1.10. EXTRAÇÃO CONTÍNUA EM COLUNA DE DISCOS PERFURADOS ROTATIVOS**

Com a finalidade de melhorar a transferência de massa, aumentando a área interfacial entre as fases e diminuindo o tamanho das gotas tem-se recorrido a colunas mecanicamente agitadas.

Entre as colunas mecanicamente agitadas que utilizam sistemas rotativos se encontram as colunas de discos rotativos (RDC). Assim como outros tipos de contadores que operam em contracorrente, a ação da rotação dos discos aumenta a eficiência da coluna pelo aumento da turbulência e da área interfacial para a transferência de massa.

A coluna de discos rotativos foi primeiramente desenvolvida por REMAN em 1951 como um equipamento utilizado para extração contínua em contracorrente. Desde então, este equipamento tem sido utilizado com sucesso em indústrias petroquímicas (STRAND et al., 1962). REMAN & VAN DE VUSSE (1955) e VERMIJS & KRAMERS (1954) publicaram dados operacionais e de transferência de massa para colunas RDC. LOGSDAIL e colaboradores (1957) estudaram as condições de inundação da coluna. O equipamento consiste de um cilindro vertical do qual a zona de extração é dividida em compartimentos idênticos por discos fixos. Além destes há discos rotores, sendo que cada compartimento possui um destes discos. Esses discos são fixos a um eixo que é coaxial ao tubo. Os discos rotores são fixos de maneira a estarem no meio de cada compartimento. O diâmetro dos discos rotores é sempre menor que o diâmetro de abertura dos discos fixos (KUNG & BECKMAN, 1961). Neste tipo de coluna as duas fases são introduzidas, em contracorrente, sendo a fase dispersa (fase leve), na base da coluna e a fase contínua (fase pesada), no topo da coluna. Basicamente, se forma um fluxo em contracorrente entre as fases causado pela diferença de densidade entre estas (LADDHA et al., 1978). A mistura das fases e

consequentemente a transferência de massa é governada principalmente pela velocidade de rotação dos discos. Ajustando esta variável independente, condições ideais de separação para uma dada mistura podem ser estabelecidas (VERMIJS & KRAMERS, 1954). Segundo STRAND e colaboradores (1962), para velocidades baixas, as gotas surgem rapidamente na zona de contato e apresentam dimensões maiores, proporcionando pequenas áreas interfaciais e baixas taxas de transferência de massa. No caso de altas velocidades de rotação, as gotas são menores e apresentam um aumento significativo na área interfacial, levando a elevadas taxas de transferências de massa.

Quanto ao escoamento dos líquidos nos compartimentos da coluna, observa-se teórica e experimentalmente que as forças centrífugas produzidas pela rotação dos discos rotores induzem, próximo aos discos rotores um escoamento de líquidos a partir do eixo do rotor em direção a parede do tubo, e próximo aos discos fixos um escoamento de líquidos a partir da parede do tubo em direção ao eixo rotor. Além disso, há uma rotação do líquido em torno do eixo rotor e um fluxo em contracorrente das fases. Então o escoamento de líquido resultante é toroidal (LADDHA et al., 1978).

Vários autores estudaram os aspectos geométricos e estruturais da coluna de discos rotativos. KUNG & BECKMANN (1961) estudaram o efeito da geometria da coluna e da vazão de alimentação sobre o “hold up” numa coluna de discos rotativos utilizando o sistema tolueno-água. Algumas variáveis foram estudadas como diâmetro e altura da coluna, velocidade de rotação dos discos e velocidade das fases dispersa e contínua. LADDHA e colaboradores (1978) realizaram um estudo da transferência de massa e da hidrodinâmica num contador de discos rotativos. Neste trabalho, foram apresentadas equações para o estudo da transferência de massa relacionadas ao diâmetro das gotas. Estudos realizados por WESTERTEP & LANDSMAN (1962) demonstraram que a dispersão axial (grau de mistura que ocorre no interior de um equipamento na direção longitudinal) depende da velocidade do líquido circulante na coluna e do grau de agitação e recirculação. MURAKAMI e colaboradores (1978) estudaram o efeito da geometria da coluna, vazão de alimentação e velocidade de rotação sobre o “hold up” utilizando os sistemas metil isobutil cetona-água e querosene-água com e sem transferência de massa. LADDHA e colaboradores (1978) realizaram um estudo detalhado da hidrodinâmica da coluna para sistemas solvente-água com e sem transferência de massa.

Colunas de discos perfurados rotativos foram usadas por POPE & SHAH (1971). A coluna de discos perfurados rotativos com anéis estatores era similar ao contador de discos rotativos estudado por REMAN (1951). POPE & SHAH (1971) demonstraram que os discos perfurados proporcionavam um excelente contato entre as fases e conseqüentemente um aumento no coeficiente de transferência de massa e na eficiência. TAMBOURGI (1989), utilizando uma coluna de discos perfurados rotativos (PRDC) sem anéis estatores realizou um estudo detalhado sobre o efeito da área perfurada dos discos rotativos sobre o comportamento hidrodinâmico do equipamento, dispersão axial e condições de inundação utilizando o sistema n-butanol-água.

Em 1993, TAMBOURGI & PEREIRA, utilizando o sistema ácido acético-butanol-água, descreveram resultados obtidos com uma PRDC construída em perspex (acrílico) com 20 e 40 % de área perfurada, variando os espaçamentos e o número de discos, bem como a velocidade de rotação. Os resultados obtidos demonstraram que o número de discos influencia a eficiência de separação, tendo sido observado maiores eficiência de separação para 7 discos do que para 5 discos testados. Segundo os autores, este fenômeno poderia ser explicado pelo fato de que um elevado grau de agitação causa uma maior área interfacial refletindo numa maior transferência de massa. O aumento da área perfurada dos discos de 20 para 40% também proporcionou um aumento na eficiência de separação.

CARNEIRO-DA-CUNHA e colaboradores (1994) utilizaram uma PRDC para extração de cutinase recombinante com sistemas micelares. Os resultados demonstraram um rendimento de extração de 78% em proteína.

PORTO e colaboradores (1997) utilizando uma PRDC para a extração de citocromo b5 recombinante com o sistema PEG-fosfato, obtiveram um rendimento de 75% em proteína. Mais recentemente, PORTO e colaboradores (1999) avaliaram a transferência de massa e a fração retida da fase dispersa ("hold up") para o albumina de soro bovino em PRDC com sistemas PEG-fosfatos de potássio.

### 2.1.11. TRANSFERÊNCIA DE MASSA EM SISTEMAS BIFÁSICOS AQUOSOS

Quando um sistema contém dois ou mais componentes cujas concentrações variam de ponto a ponto no sistema, há uma tendência natural à massa ser transferida, minimizando as diferenças de concentração no sistema, já que de acordo com a segunda lei da termodinâmica, sistemas que não estão em equilíbrio tendem a alcançar o equilíbrio com o tempo. O transporte de um constituinte de uma região de maior concentração para outra de menor concentração é chamado “transferência de massa”.

É de fundamental importância no estudo de um processo de extração líquido-líquido ou de um extrator em particular, a avaliação da transferência de massa no interior deste equipamento.

A transferência de massa entre duas fases líquidas é função do comportamento dos líquidos que atravessam o extrator e da taxa local de transferência de massa, que depende da resistência no filme líquido interfacial.

O estudo da transferência de massa visa principalmente avaliar o quanto o sistema se aproxima do equilíbrio. Com este estudo, pode-se definir um limite ideal de operação para o extrator.

Em equipamentos de extração líquido-líquido, em contracorrente, a transferência de massa ocorre numa dispersão de gotas que fluem pela gravidade através da fase líquida contínua, sendo o contador de discos rotativos um exemplo destes equipamentos.

A mudança da concentração numa gota, numa dada parte da coluna, é dependente da diferença de densidades, do coeficiente de transferência de massa, da área interfacial e do tempo de contato, sendo que todas essas variáveis dependem do diâmetro das gotas. Segundo HANSON (1968) a transferência de massa ocorre entre a fase contínua e as gotas.

Em sistemas líquido-líquido, o aumento da agitação, inicialmente causa um aumento da área interfacial (através da diminuição no tamanho das gotas) e assim, aumentando a taxa de transferência de massa. Porém, isso não ocorre indefinidamente. Primeiramente, há um limite para o aumento da área interfacial que pode ser obtida. Em segundo lugar, abaixo de um certo tamanho de gotas, estas começam a se comportar como esferas rígidas sem circulação pelo lento processo de difusão molecular. Em terceiro lugar, após um certo ponto, o aumento na agitação pode

começar a suprimir a interação gota-gota, reduzindo a mistura na fase dispersa e também a taxa de transferência de massa. Há portanto um grau ótimo de agitação que fornece a taxa de transferência de massa máxima (ROD, 1966).

Segundo HANSON (1968), a coalescência das gotas da fase dispersa numa fase contínua é fundamental para ocorrer a separação das fases. Em geral, quanto menor o tamanho das gotas, mais lenta é a coalescência. Quanto menores forem as gotas, maior será a tendência da solução emulsificar.

Em colunas de discos perfurados rotativos, o coeficiente global de transferência de massa pode ser determinado por

$$N = Kda(C^* - C)V$$

onde  $N$ ,  $Kda$ ,  $C^*$ ,  $C$  e  $V$  representam, respectivamente, o fluxo de proteína para a fase dispersa, o coeficiente global de transferência de proteína, a concentração de proteína na interface em equilíbrio com a fase contínua, a concentração de proteína na fase dispersa e o volume da fase contínua.

Considerando que as duas fases são imiscíveis, que a quantidade de soluto transferida entre as fases é pequena, que o coeficiente de partição para a proteína é independente da sua concentração e que o coeficiente de transferência se mantém constante ao longo da coluna, a integração da expressão acima é possível, originando:

$$N = Kda \Delta C_{lm} V$$

onde  $\Delta C_{lm}$  representa a média logarítmica da diferença de concentrações entre a interface e a fase dispersa. O balanço material global do soluto na coluna origina

$$Q(C_{ent} - C_{sai}) = Kda \Delta C_{lm} V$$

em que  $Q$ ,  $C_{ent}$  e  $C_{sai}$  representam, respectivamente, a velocidade de fluxo da fase dispersa, a concentração de proteína na corrente de entrada da fase dispersa, a concentração de proteína na corrente de saída da fase dispersa. Reorganizando esta expressão, obtém-se a expressão:

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

onde  $K$  representa o coeficiente de partição do soluto.

Sabe-se que existem dois aspectos distintos sobre a eficiência de extração a serem considerados: o primeiro costuma diferenciar o comportamento real do ideal; o segundo interpreta a eficiência em termos de mecanismos de transporte de massa. Baseado nestes aspectos, várias definições de eficiência têm sido propostas.

O desempenho de um contador de discos rotativos com saia perfurada foi estudado por KAWASE (1990) em escala piloto. Os dados obtidos para este equipamento foram examinados usando a correlação proposta para uma coluna de discos rotativos. Foram realizados estudos sobre a eficiência de extração, na qual as concentrações das fases no topo e no fundo da coluna foram medidas. O cálculo da eficiência de extração neste equipamento foi realizado usando a seguinte relação, baseada nas concentrações da fase onde se encontra o soluto.

$$E_k = \frac{C_f - C_r}{C_f} \times 100$$

Onde:  $C_f$  é a fração mássica de soluto na alimentação e

$C_r$  é a fração mássica de soluto no refinado

Esta definição representa um índice de recuperação do soluto.

### 2.1.12. RECUPERAÇÃO DOS PRODUTOS

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

Os primeiros trabalhos encontrados na literatura (ALBERTSSON, 1986) reportavam que a remoção dos polímeros do sistema era um obstáculo para a aplicação de SBA em larga escala. No entanto, observa-se, por exemplo, que a ultrafiltração pelo uso de membranas semi-permeáveis com poros seletivos é uma forma rápida e eficiente de se remover os polímeros. Considerando o sistema tradicional PEG-Dextrana, como o peso molecular do PEG é bem menor e o peso molecular da Dextrana bem maior do que o peso molecular da maioria das proteínas, este método torna-se bastante viável, permitindo que a membrana retenha a proteína, promovendo simultaneamente a remoção do PEG. Esta técnica ainda permite ganhos na purificação, já que outras proteínas menores ou partículas contaminantes podem ficar retidas na membrana. Um dos métodos mais comuns baseia-se na transferência da molécula biológica para uma fase com baixa concentração de polímero. Assim, quando a proteína se encontra acumulada na fase PEG, pode-se recorrer a adição de um sal que leve a formação de um novo SBA. Utilizando-se condições apropriadas, a proteína pode ser re-extraída e se concentrar na fase rica em sal (HUSTEDT et al., 1978; CABRAL & AIRES-BARROS, 1993). O sal, por sua vez, poderá ser removido por filtração em membrana utilizando ultrafiltração ou diálise. As proteínas também podem ser removidas por adsorção em trocadores iônicos (ALBERTSSON, 1986; HUSTEDT et al., 1978). Para sistemas PEG-Dextrana, uma vez que ambos os polímeros são neutros, eles não se ligarão aos trocadores e podem ser removidos por lavagem, deixando a proteína ligada a matriz. Para polímeros carregados, bastaria ajustar o pH e a força iônica. O inconveniente é a possibilidade de ocorrer uma alta pressão das gotas quando soluções poliméricas viscosas são processadas em coluna. Outras possibilidades incluem a centrifugação para moléculas ou partículas de elevado peso molecular (ALBERTSSON, 1986). ALBERTSSON (1986) também descreve um método específico para a recuperação de moléculas biológicas da fase inferior de sistemas PEG-Dextrana. Por adição de sulfato de amônia ou fosfato de potássio ao sistema PEG-Dextrana, a concentração de PEG na fase inferior vai diminuindo gradualmente até ser completamente excluída desta fase. A

partir deste ponto, a molécula biológica pode ser precipitada da fase inferior por adição de sulfato de amônia.

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

Um recente desenvolvimento no campo da separação bifásica aquosa é combinar SBA's com a separação induzida pela temperatura. Vários trabalhos sobre este processo alternativo de purificação estão disponíveis na literatura (ALRED et al., 1993; FARKAS et al., 1996; LI et al., 1997; PERSSON et al., 1999, SVENSSON et al., 1999). São exemplos de polímeros "termoseparadores" o PEG, Álcool polivinílico e Etilhidroxietilcelulose. A separação de fases por indução pela temperatura torna possível separar o polímero da substância biológica isolada, permitindo recuperar o polímero "termoseparador". O processo de purificação é composto por dois passos. No primeiro, um sistema bifásico composto pelo polímero "termoseparador" como polímero predominante da fase superior e Dextrana ou Hidroxipropilamido como polímero predominante da fase inferior, é utilizado na partição da biomolécula, de modo que esta se concentre na fase superior. No segundo passo, a fase superior é isolada e o aquecimento acima de uma temperatura crítica, característica para cada sistema, levará a uma nova formação de fases, de modo que o polímero termoseparador fica concentrado na fase inferior, enquanto que a fase superior é uma fase aquosa praticamente livre de polímero, que concentra a molécula biológica, a qual pode ser recuperada por ultrafiltração ou diálise (JOHANSSON et al., 1996).

### 2.1.13. RECICLAGEM DE POLÍMEROS

A possibilidade de reutilização dos constituintes das fases deve ser considerada ao se efetuar o "scale-up" pois os custos dos componentes das fases aumentam linearmente com a escala de produção (KRONER et al., 1984). A recirculação de reagentes tem sido fundamentalmente estudada em sistemas PEG-Sais (PAPAMICHAEL et al., 1992; RITO-PALOMARES et al.,

1994) e pode ser obtida na prática por recirculação direta da fase PEG ou da fase rica em sal após ultrafiltração.

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

#### 2.1.14. ASPECTOS ECONÔMICOS

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

O conhecimento em sistemas bifásicos aquosos e suas habilidades de partição de moléculas biológicas tem sido estudada por mais de 40 anos. Desde então, o interesse nesta área mostrou-se reduzido até os últimos anos, quando uma série de pesquisas tomaram lugar dentro do mundo científico (MATIASSON & LING, 1987).

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

O custo operacional, por sua vez, está extremamente relacionado com o tipo e concentração dos polímeros necessários para a formação das fases do sistema e sua capacidade. Conforme mencionado anteriormente, o preço dos polímeros mais empregados, como a Dextrana, é bastante elevado, embora o sistema PEG-Dextrana possua características importantes como a biodegradabilidade, além de já reunir uma elevada gama de informações sobre a partição de vários compostos ao longo dos anos. O uso prático da Dextrana apenas seria justificado em casos raros,

como na produção de produtos especiais (MATIASSON & LING, 1987). Para combater este problema, tem-se recorrido nos últimos anos ao Hidroxipropilamido, similar a Dextrana e mais econômico.

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

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

### 3. OBJETIVOS

#### GERAL

Caracterizar e utilizar um novo sistema para partição bifásica aquosa de biomoléculas

#### ESPECÍFICOS

- Determinar os diagramas de fases dos sistemas bifásicos formados por combinação do polietileno glicol com o polissacarídeo do cajueiro (Policaju)
- Estudar a influência do peso molecular do polietileno glicol, da temperatura e do pH nos diagramas de fases do sistema em estudo
- Determinar as propriedades físicas dos sistemas, tais como densidade, viscosidade, tempo de separação e razão de fases
- Determinar o coeficiente de partição de uma proteína modelo, a albumina de soro bovino
- Estudar a influência do peso molecular do polietileno glicol, da temperatura, comprimento da "tie-line", pH e adição de NaCl na partição
- Estudar o comportamento do sistema para processamento contínuo através da utilização da coluna de extração com discos perfurados rotativos (PRDC) e caracterizar hidrodinamicamente o equipamento por manipulação de variáveis geométricas e operacionais. Determinar o "hold up" para o novo sistema e calcular o coeficiente de transferência de massa e o índice de recuperação
- Avaliar o potencial econômico do sistema

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. MATERIAIS**

#### **4.1.1. Reagentes**

##### **4.1.1.1. Polímeros constituintes dos sistemas bifásicos aquosos**

Foram utilizados polietileno glicol (PEG) de diferentes peso molecular, PEG 550, PEG 1500, PEG 4000 e PEG 8000, fornecidos pela Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo., EUA.

A goma do cajueiro, de peso molecular  $\pm 110.000$  Da (MENESTRINA et al., 1998) foi coletada como exsudato natural de árvores de *Anacardium occidentale* L. (produtoras do caju amarelo) de diferentes localidades do estado de Pernambuco, no período de dezembro a março.

##### **4.1.1.2. Proteína**

Nos estudos de partição foi utilizada a proteína padrão albumina de soro bovino (BSA) de peso molecular 66.500-67.500 Da (ponto isoeletrico = 5,1), obtida da Sigma Chemical Co (St. Louis, Mo, EUA).

##### **4.1.1.3. Outros reagentes**

Os principais reagentes utilizados ao longo do trabalho experimental estão apresentados na TABELA 06.

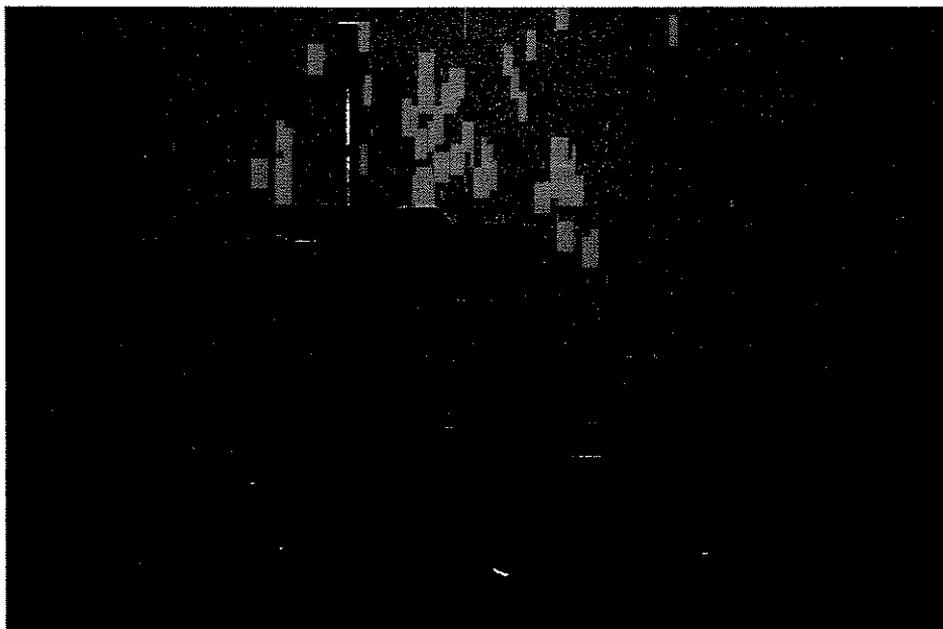
#### 4.1.2. Coluna de extração PRDC

Nos ensaios de extração com alimentação contínua de ambas as fases foi utilizada a coluna de discos rotativos perfurados (PRDC) como representado na FIGURA 08. A coluna foi construída com tubo de acrílico (perspex) com 32 mm de diâmetro interno e 160 mm de altura. Na parte central encontra-se um eixo contendo discos perfurados, separados equidistantes e movidos por um agitador a diferentes velocidades, conforme as condições experimentais. Os discos perfurados são de 30 mm de diâmetro, contendo cada disco 06 orifícios de 60 mm de diâmetro, com uma área livre de fluxo de 21%. A coluna foi mantida a temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ).

TABELA 06- Soluções e reagentes utilizados ao longo do trabalho experimental

Reagente	Pureza	Fornecedor
Cloreto de sódio	99%	Merck
Dihidrogenofosfato de potássio	99%	Kanto Chemical Co
Hidrogenofosfato de potássio	99%	Kanto Chemical Co
Comassie Blue G- 250	----	Eastman Kodak
Etanol	98%	Merck
Etanol comercial	----	----
Hidróxido de sódio	97%	Vetec
Ácido sulfúrico	95-97%	Merck
Ácido 3,5- dinitrossalicílico	----	Sigma
Ácido perclórico	60%	Kanto Chemical Co
Ácido ortofosfórico	85%	Vetec
Cloreto de bário	99,9%	Vetec
Iodo	99,9%	Kanto Chemical Co
Tartarato duplo de sódio e de potássio	99%	Vetec
Glicose	PA	Sigma

(a)



(b)

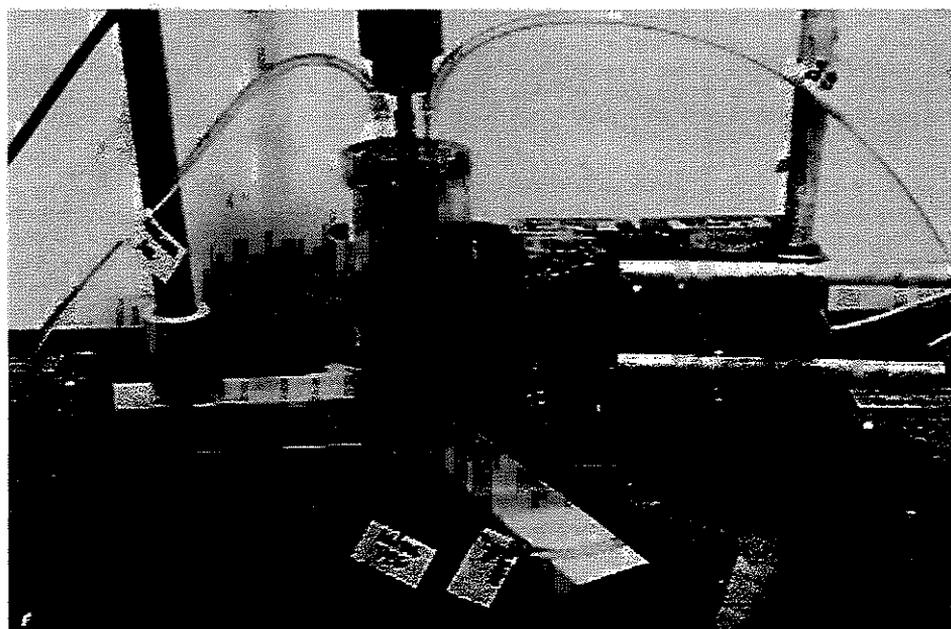


FIGURA 08- Coluna de discos perfurados rotativos em operação (a), e em (b) vista frontal da coluna com mais detalhes, onde pode-se observar o eixo com os discos e as bombas de alimentação, a alimentação da fase leve e drenagem da fase pesada foi realizada pela parte inferior da coluna, e pelo topo da coluna ocorreu a alimentação da fase pesada e drenagem da fase leve (indicado pela fita amarela).

### 4.1.3. Equipamentos

- Agitador de toque modelo MA 162, MARCONI, Brasil.
- Agitador magnético com aquecimento modelo 258, FANEM, Brasil.
- Balança analítica modelo AB104, METTLER, EUA.
- Bomba de vácuo modelo MA058, MARCONI, Brasil.
- Centrífuga de bancada modelo 225, FISHER SCIENTIFIC, EUA.
- Espectrofotômetro modelo B442, MICRONAL, Brasil.
- Estufa de secagem modelo 002 CB, FANEM Ltda., Brasil.
- Bombas peristálticas de um canal ATTA, Japão.
- Micropipetas automáticas finnpipette, LABSYSTEMS, EUA.
- Potenciômetro ORION, EUA.
- Viscosímetro digital BROOKFIELD DV-II.
- Banho termostaticado modelo 100, FANEM, Brasil.

## 4.2. MÉTODOS

### 4.2.1. ISOLAMENTO DO POLISSACARÍDEO DO CAJUEIRO (POLICAJU)

A goma bruta (isenta de cascas e folhas) foi submetida ao método de RINAUDO & MILLAS (1991) modificado: a goma foi triturada e dissolvida em solução aquosa a 20%, sendo filtrada em tela de serigrafia (número de fios 90 e 110) e precipitada com etanol comercial (3x volume), de modo a separar o polissacarídeo dos mono e oligopolissacarídeos, que permaneceram em solução. O precipitado assim obtido foi deixado em repouso “overnight” a 4°C e novamente filtrado e lavado com etanol concentrado. O precipitado assim obtido foi submetido a secagem em estufa a 35°C. O álcool utilizado foi recuperado e reaproveitado para nova precipitação da goma. O processo de purificação está esquematizado na FIGURA 09. As ilustrações da goma bruta e do polissacarídeo isolado após extração com etanol podem ser observados nas FIGURAS 10 e 11, respectivamente.

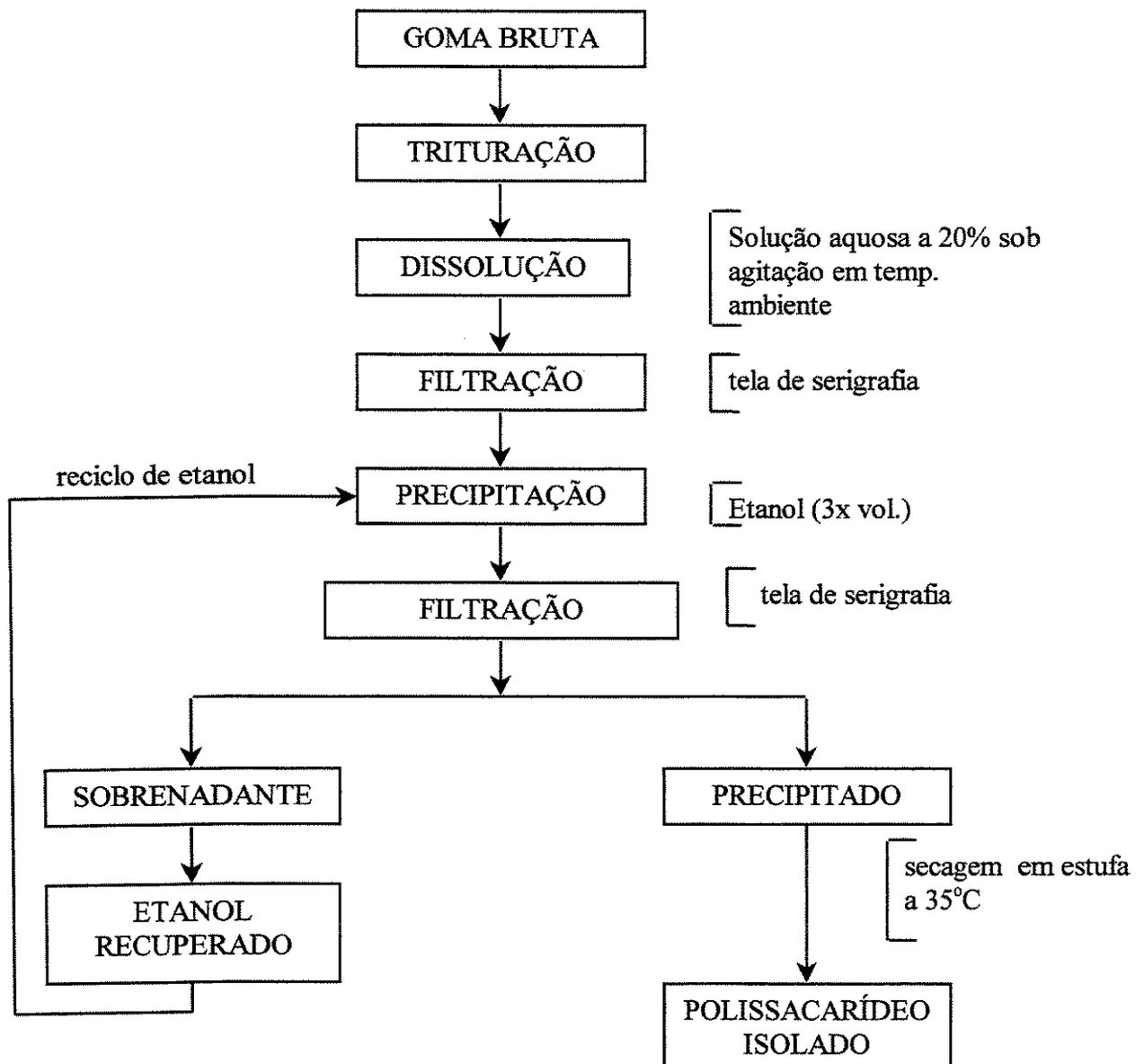


FIGURA 09 - Fluxograma de isolamento do polissacarídeo do cajueiro (Policaju)



FIGURA 10- Goma bruta do cajueiro



FIGURA 11-Polissacarídeo do cajueiro (Policaju) purificado

#### 4.2.2. PREPARAÇÃO DOS SISTEMAS BIFÁSICOS AQUOSOS

Foram preparados sistemas bifásicos aquosos Policaju-PEG's de vários pesos moleculares de diferentes concentrações em tubos de centrifuga graduados (15 ml), por pesagem das quantidades apropriadas de soluções concentradas de PEG e Policaju em tampão fosfato de forma a obter os pH's desejados (6,0, 7,0 e 8,0), obedecendo a relação entre fosfato monobásico e dibásico, a temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ). O conteúdo destes tubos foi agitado em agitador de toque (vortex) até completa dissolução e, em seguida, centrifugado a 500 rpm durante 5 minutos. Os sistemas contendo NaCl foram preparados pela adição do sal diretamente aos sistemas para concentrações de 0,1 e 1M. Para os experimentos realizados a temperatura de  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , os sistemas foram agitados e colocados em banho termostatizado durante 24 horas.

As soluções concentradas utilizadas na preparação dos sistemas bifásicos aquosos estão apresentadas na TABELA 07.

TABELA 07- Título das diversas soluções concentradas empregadas ao longo do trabalho

REAGENTE	TÍTULO
Policaju	30% (p/p)
PEG 550	70% (p/p)
PEG 1500	70% (p/p)
PEG 4000	50% (p/p)
PEG 8000	50% (p/p)
Soluções tampão	15 mM
Solução de proteína	2,0 mg/mL

### 4.2.3. DETERMINAÇÃO DOS DIAGRAMAS DE FASES

Para os sistemas bifásicos foram construídos os respectivos diagramas de fases. Por estes foi possível ter acesso a concentração mínima de polímeros necessários a formação de um SBA e a composição das fases em equilíbrio.

A determinação dos diagramas de fases foi realizada segundo a metodologia proposta por ALBERTSSON (1986). Vários sistemas bifásicos com diferentes composições (8,0 g) foram preparados de acordo com o item 4.2.2 para os diferentes pesos moleculares de PEG, nos pH's 6,0, 7,0 e 8,0 nas temperaturas de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . As composições das fases foram determinadas, e uma curva foi traçada através dos pontos representativos destas composições. Desta forma, uma série de composições da curva de equilíbrio de fases (binodal) foi obtida e a concentração do polietileno glicol plotada versus a concentração do polissacarídeo, fornecendo a curva binodal do sistema. Como convenção, a concentração do composto que se distribui favoravelmente na fase inferior, é plotado na abscissa e a concentração do polímero que se distribui preferencialmente na fase superior é plotado na ordenada. A determinação das linhas de amarração ("tie-lines") foi realizada pela quantificação dos dois polímeros, o polissacarídeo e o PEG, em cada uma das fases do SBA (ítems 4.2.3.1 e 4.2.3.2). Uma amostra de cada fase foi retirada sendo feita sua divisão em duas alíquotas. A primeira alíquota determinou a quantidade de polissacarídeo e a segunda alíquota, a quantidade de PEG.

Com a finalidade de se testar metodologias alternativas para a determinação dos diagramas de fases, estudou-se o método proposto por POLYAKOV e colaboradores, (1980). Este método baseia-se na construção gráfica a partir da relação entre os volumes das fases (volume da fase superior / volume total) e os valores de frações de peso aparente (razão entre as concentrações em massa final e inicial de um dos polímeros em solução, considerando a solução inicial deste polímero a solução antes da mistura e a solução final a resultante do sistema bifásico). A partir de extrapolações gráficas dos dados obtidos é possível a obtenção da curva de equilíbrio de fases, bem como das linhas de amarração ("tie-lines").

O método proposto estabelece a seguinte relação:

$r^+$  : relação entre os volumes das fases

$r^+ = V_{\text{sup}} / V_{\text{total}}$ , sendo  $V_{\text{total}} = V_{\text{sup}} + V_{\text{inf}}$

Quando  $V_{\text{sup}} \gg V_{\text{inf}}$ ,  $r^+ = V_{\text{sup}} / V_{\text{sup}} = 1$ ; quando  $V_{\text{inf}} \gg V_{\text{sup}}$ ,  $r^+ = V_{\text{sup}} / V_{\text{inf}} = 0$  e quando  $V_{\text{inf}} = V_{\text{sup}}$ ,  $r^+ = V_{\text{sup}} / 2V_{\text{sup}} = 0,5$  (ponto do diâmetro retilíneo-ponto crítico). Com base nestes princípios, o método da relação entre os volumes das fases pode ser facilmente utilizado na determinação dos diagramas de fases.

A composição das misturas dos dois polímeros estudados foram expressas através de valores de frações de peso aparente  $y = C_A^0 / C_A$  e  $y-1 = C_B^0 / C_B$  onde  $C_A^0$  e  $C_B^0$  foram as concentrações iniciais das soluções dos polímeros A (Policaju) e B (PEG 8000) e  $C_A$  e  $C_B$  as concentrações de A e B na mistura (pH 7,0). De acordo com o método, a localização geométrica dos pontos correspondentes a misturas com diferentes  $y$  corresponde a secante  $C_A^0 C_B^0$  no diagrama de fases. Se a linha reta  $C_A^0 C_B^0$  intercepta o intervalo de imiscibilidade, a mistura dará lugar a um sistema bifásico. Em cada caso, os volumes das fases conjugadas são medidos e o valor de  $r^+$  é determinado. A relação  $r^+ = f(y)$  é então plotada. A extrapolação de  $r^+ = f(y)$  para  $r^+=0$  e  $r^+=1$  é usada para determinar a posição dos pontos da binodal na secante  $C_A^0 C_B^0$ . O valor de  $r^+=0,5$  facilita a determinação do ponto do diâmetro retilíneo na reta secante. Algumas curvas típicas estão apresentadas na FIGURA 12b. A curva I corresponde ao caso em que os pontos de interseção da secante  $C_A^0 C_B^0$  com a binodal não atravessam o diâmetro retilíneo. A curva II corresponde a interseção da secante com a binodal no ponto crítico, enquanto que a curva III os pontos de interseção da secante  $C_A^0 C_B^0$  com a binodal atravessam o diâmetro retilíneo. Se o procedimento acima for repetido para outros valores de  $C_A^0$  e  $C_B^0$  vários grupos de pontos da binodal e do diâmetro retilíneo podem ser obtidos. O ponto crítico do sistema pode ser determinado pela interseção da binodal com o diâmetro retilíneo. Uma vez que qualquer ponto do diâmetro retilíneo divide as "tie-lines" em dois segmentos iguais, estas também podem ser encontradas.

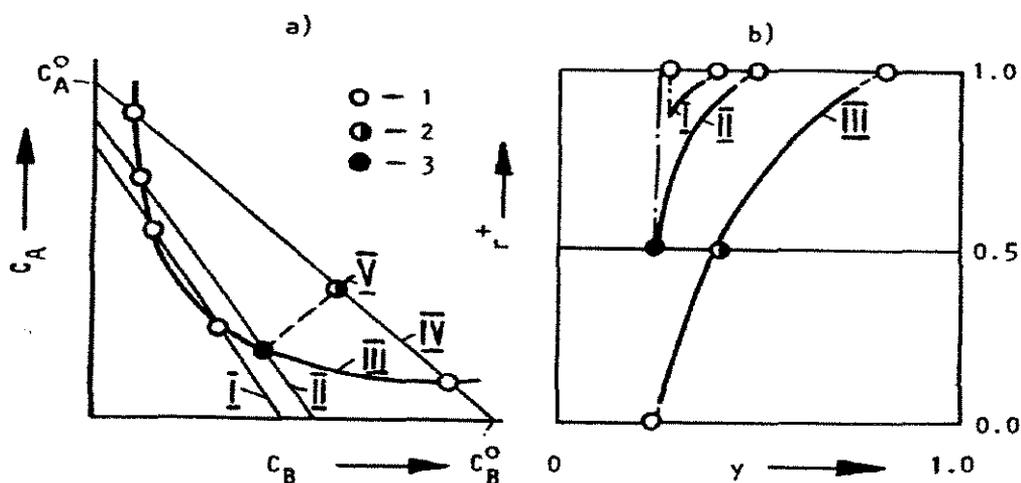


FIGURA 12- Diagrama de fases (I, II, III - secantes com diferentes valores de  $C_A^0$  e  $C_B^0$ , IV- binodal, V- diâmetro retilíneo) (a). Curvas representativas dos pontos experimentais de diferentes misturas de  $C_A^0$  e  $C_B^0$  (1- pontos da binodal, 2- ponto do diâmetro retilíneo, 3- ponto crítico) (b)

#### 4.2.3.1. Análise do polissacarídeo do cajueiro

##### 4.2.3.1.1. Hidrólise do polissacarídeo

Para a dosagem dos monossacarídeos presentes no polissacarídeo foi realizada sua hidrólise ácida. Foram utilizados tubos de ensaio rosqueados onde adicionou-se, separadamente, 0,5 g da fase inferior e 1,0 g da fase superior. O conteúdo dos tubos foi então completado com água destilada até massa total de 5,0 g a fim de se obter uma diluição adequada para quantificação. Em seguida, adicionou-se 1 mL de ácido sulfúrico concentrado. Esta solução foi agitada e colocada em banho a 100 °C durante 60 minutos. Após a hidrólise, as amostras foram resfriadas a temperatura ambiente e neutralizadas a pH 6,0-7,0 pela adição de 5 mL de NaOH 6,0M e pequenas quantidades de NaOH 1M. Após a neutralização, o volume do hidrolisado foi completado para 25 mL em proveta graduada e a concentração de açúcares redutores do Policaju determinada pelo método de MILLER (1959).

#### 4.2.3.1.2. Dosagem de açúcares redutores pelo método de MILLER (DNSA)

O método de DNSA, usado para dosagem de açúcares com poder redutor é baseado na redução, em solução alcalina, do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNSA) a ácido 3-amino-5-nitrossalicílico, sendo os grupos carbonila dos açúcares oxidados a carboxila. A presença de sal de La Rochele (tartarato duplo de sódio e de potássio) na solução visa proteger o reagente da ação do oxigênio dissolvido (MILLER, 1959).

A determinação da concentração de açúcares redutores em solução foi efetuada pela adição de 1 mL de amostra a 1 mL de reagente DNSA. Esta solução foi mergulhada, por 5 minutos, num banho de água em ebulição. A solução foi resfriada a temperatura ambiente e aferida para 25 mL em proveta graduada. A absorvância da solução foi lida a 540 nm e o teor em açúcares redutores totais determinado a partir de uma curva de calibração construída a partir de soluções padrão de glicose, de 0,2-2,0 mg/mL.

#### 4.2.3.1.3. Preparação do reagente DNSA

O reagente DNSA é preparado por dissolução de 5 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico em 100 mL de uma solução de NaOH 2M à 70°C em banho-maria. Em paralelo, 150 g de sal de La Rochele (tartarato duplo de sódio e de potássio) são dissolvidos em 250 mL de água destilada à 70°C em banho-maria. Após dissolução completa, estas duas soluções são misturadas e o volume final ajustado a 500 mL com água destilada. Esta solução é conservada em frasco escuro.

Para cada solução de reagente DNSA é construída uma curva de calibração com soluções padrão de glicose.

#### 4.2.3.2. Análise do Polietileno Glicol

A concentração de PEG dos sistemas foi determinada de acordo com o método de SKOOG, (1979). Pesou-se 0,2 g da fase inferior e 1,0 g da fase superior, separadamente, e

completou-se para 50 mL com água destilada em balão volumétrico. 1 mL de cada amostra assim diluída, foi adicionado a 4 mL de ácido perclórico 0,5M. Em seguida, 2 mL destas soluções foram adicionados a 0,5 mL de uma solução de cloreto de bário a 5%, 0,5 mL de uma solução de iodo 0,01M e 0,5 mL de ácido perclórico 0,5 M. A absorvância foi lida após 15 min a 535 nm. A curva de calibração foi obtida pela preparação de soluções de cada PEG, 1500, 4000 e 8000, com concentração de 0,02-0,08 mg/mL.

#### 4.2.4. CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS BIFÁSICOS AQUOSOS

##### 4.2.4.1. Determinação das "tie-lines" de trabalho

Sistemas obtidos experimentalmente pela mistura de diferentes concentrações de Polietileno glicol e Policaju foram submetidos a análise de PEG e do polissacarídeo em ambas as fases (itens 4.2.3.1 e 4.2.3.2), a fim de se determinar as "tie-lines" de trabalho, para todos os pH's, conforme descrito na TABELA 08.

TABELA 08- Composição das "tie-lines" de trabalho dos sistemas de duas fases aquosas PEG-Policaju utilizados ao longo dos experimentos

SISTEMAS	Policaju (%p/p) / PEG (%P/P)		
	Tie-line 1	Tie-line 2	Tie-line 3
PEG 1500-Policaju	21/13	22,5/13,8	----
PEG 4000- Policaju	18/9	20/11	22/13
PEG 8000- Policaju	16/9	18/11	20/13

##### 4.2.4.2. Determinação das propriedades reológicas dos sistemas bifásicos aquosos

Para a determinação da viscosidade das fases dos SBA em estudo foi utilizado um viscosímetro rotativo BROKFIELD DV-II, acoplado a um banho termostatizado. As medições

foram efetuadas a velocidade de 60 rpm com spindle de números 40 e 52 para amostras das fases superior e inferior, respectivamente. A capacidade de leitura do viscosímetro permite leituras até valores de 985 cP.

As densidades das fases superiores foram determinadas pesando-se em balança analítica 1 mL da fase superior dos sistemas com micropipeta, em quadruplicata. As densidades das fases inferiores foram determinadas por balanço de massa. A determinação das densidades dos sistemas a temperatura de  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  foi realizada da mesma forma, com o auxílio de um banho termostaticado.

#### **4.2.4.3. Tempo de separação das fases**

O tempo requerido para a separação das fases foi determinado para sistemas de 10 g. Após agitação para mistura das fases, os sistemas foram deixados em repouso sob ação da gravidade até a formação de uma interface visível. Para os sistemas a temperatura de  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , o tempo de separação das fases foi determinado da mesma forma, com o auxílio de um banho termostaticado.

#### **4.2.4.4. Razão de fases**

Os volumes das fases dos sistemas (10 g) em estudo, preparados em tubos de centrífuga graduados, foram usados para se determinar a razão de fases,  $V_s$  (volume da fase superior) /  $V_i$  (volume da fase inferior). Para os sistemas a temperatura de  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , a razão de fases foi determinada da mesma forma, com o auxílio de um banho termostaticado.

#### **4.2.5. ESTUDOS DE PARTIÇÃO EM BATELADA**

Após a determinação dos diagramas de fases para o novo sistema e do estudo das suas propriedades físicas, estudou-se a partição de uma proteína modelo, albumina de soro bovino.

#### 4.2.5.1. Dosagem de proteína total

Foram preparados sistemas de duas fases aquosas PEG-Policaju com massa total de 4 g por pesagem das quantidades apropriadas de soluções concentradas de PEG e Policaju, como descrito no item 4.2.2. Em seguida, foram adicionados 400 µl de uma solução de albumina de soro bovino (2 mg/ml) aos sistemas. O conteúdo destes tubos foi agitado e então centrifugado a 500 rpm durante 5 minutos. Para a temperatura de  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , os sistemas foram preparados e após permanecerem por 24 horas em banho termostatizado, adicionou-se a solução de proteína, agitou-se e colocou-se novamente no banho-maria por mais 2 horas.

A concentração de proteína foi determinada segundo BRADFORD (1976). O princípio do método é baseado no fato do corante Coomassie Blue G-250 coexistir em duas formas de diferente cor: vermelho e azul. A sua forma de cor vermelha é rapidamente convertida na outra forma por ligação da parte cromófora do corante a proteínas. A reação de ligação do corante à proteína é um processo bastante rápido e a cor obtida é estável durante 1 hora.

Para a determinação da proteína, adicionou-se 400 µL da fase superior a 2 ml de reagente de BRADFORD e a absorbância foi lida a 595 nm antes de 15 minutos, empregando-se como branco uma amostra retirada de um SBA sem proteína e preparada da mesma forma. Dada a maior viscosidade da fase inferior (Policaju) dos sistemas bifásicos em estudo, a concentração de proteína nesta fase foi determinada por balanço material. A curva de calibração foi obtida a partir de soluções estoques de albumina de soro bovino de concentração de 10-100 mg/l.

##### 4.2.5.1.1. Preparação do reagente de BRADFORD

O reagente de Bradford foi preparado solubilizando 100 mg de azul brilhante de Coomassie G em 50 mL de etanol (95% v/v), adicionando-se 100 mL de ácido ortofosfórico (85%) e completando o volume para 1 L com água destilada. A mistura foi deixada sob agitação durante 1 hora e em seguida filtrada duas vezes antes de sua utilização na ausência de luz.

#### 4.2.5.2. Determinação do coeficiente de partição

Após a determinação da concentração de proteína nas fases, determinou-se o coeficiente de partição da proteína (K) definido como a razão entre a concentração de proteína na fase superior e inferior.

$K = C_s$  (concentração de proteínas na fase superior)/ $C_i$  (concentração de proteínas na fase inferior)

Estes experimentos foram realizados para vários comprimentos de "tie-lines", com diferentes massas moleculares de PEG (1500, 4000 e 8000), a diferentes pH's (6,0, 7,0 e 8,0) e adição de NaCl (0,1M e 1M), nas temperaturas de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.2.6. EXTRAÇÃO CONTÍNUA UTILIZANDO COLUNA DE DISCOS PERFURADOS ROTATIVOS (PRDC)

##### 4.2.6.1. Preparação dos sistemas de trabalho

Para os ensaios em contínuo, a partir das observações realizadas para os experimentos em batelada, foram selecionadas duas "tie-lines" (18%PEG4000-9%Policaju e 20%PEG4000-11%Policaju, pH 6,0) de modo que foram preparados sistemas de 600g e 700g, respectivamente, de acordo com a razão de fases, da mesma forma que para o processo em batelada, ou seja, a partir de soluções estoque de PEG e Policaju (item 4.2.2). Os sistemas assim preparados foram agitados por cerca de 1 hora e deixados em repouso "overnight". Posteriormente, as fases inferior e superior foram separadas para utilização na coluna.

Para os experimentos com transferência de massa, a proteína foi diretamente dissolvida na fase dispersa (PEG) de modo a obter uma solução com concentração final de 2 mg/mL. A solução foi então agitada por cerca de 1 hora até a completa solubilização da proteína.

#### 4.2.6.2. Caracterização hidrodinâmica do equipamento

##### 4.2.6.2.1. Condições operacionais

Para a operação da coluna, com a finalidade da obtenção de dados para a caracterização hidrodinâmica do extrator, seguiu-se o procedimento abaixo:

- 1- Alimentou-se a coluna inicialmente com 80 mL da fase contínua (fase rica em Policaju) , com a drenagem da fase contínua e alimentação da fase dispersa fechadas até enchê-la;
- 2- Adicionou-se o mecanismo de rotação dos discos e, depois de ajustada a vazão de entrada com a de saída da fase contínua, procedeu-se então a alimentação da fase dispersa (fase rica em PEG) nas vazões desejadas. Para este procedimento foram utilizadas 4 bombas peristáltica de 1 canal, a fim de se garantir a velocidade de fluxo requerida para cada fase.

Neste trabalho foram analisadas algumas variáveis operacionais e geométricas sobre a fração retida na fase dispersa (hold up), transferência de massa e índice de recuperação na coluna de discos perfurados rotativos (TABELA 09).

TABELA 09- Variáveis estudadas na extração contínua

Variáveis operacionais/geométricas	Valores
Velocidade de rotação dos discos (rpm)	60; 140; 220
Velocidade da fase dispersa (ml/min)	2,0; 3,0; 5,0
Número de discos	03; 04; 07

##### 4.2.6.2.2. Determinação da fração retida da fase dispersa (Hold up)

Nos ensaios de extração em contínuo, após se atingir o estado estacionário, em condições de agitação e velocidade de fase dispersa pré-determinadas, foi determinado o "hold up" (H) da fase rica em PEG pelo método do estancamento. Neste procedimento são interrompidas simultaneamente a agitação e todas as correntes de entrada e saída da coluna. A coluna foi

descarregada, as fases levadas à decantação e os volumes das fases lidos em proveta graduada. Esta técnica leva a medida de “hold up” médio e calculado de acordo com a seguinte expressão:

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

#### 4.2.6.3. Experimentos de transferência de massa

##### 4.2.6.3.1. Determinação do coeficiente de transferência de massa (Kda)

Para a determinação do coeficiente de transferência de massa da proteína, a proteína foi inicialmente dissolvida na fase PEG e esta foi alimentada através da fase contínua, de modo a se obter a transferência da proteína para a fase extrato. Amostras das fases contínua e dispersa foram recolhidas nas correntes de saída em intervalos de tempo de 10, 20, 30, 40, 50 e 55 minutos de operação, em condições pré-estabelecidas de velocidade de rotação, velocidades das fases dispersa e contínua e número de discos, seguidas pelas determinações das quantidades de proteína de acordo com o método de BRADFORD (1976).

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

$$Kda = Q/V \cdot \ln(Cent - KCfc/Csai - KCfc)$$

onde Kda, Q, V, Cent, Csai e K representam respectivamente, o coeficiente de transferência de massa, a velocidade de fluxo da fase dispersa, o volume da fase contínua, a concentração de proteína na corrente de entrada de fase dispersa, a concentração de proteína na corrente de saída de fase dispersa, coeficiente de partição. Toma-se para valor de Cfc, o valor médio entre a concentração final da fase contínua e o valor inicial da mesma fase, isto é, toma-se para o valor de Cfc metade do valor de concentração de soluto determinado para a fase contínua, pois o valor inicial na fase contínua será zero (SAWANT et al., 1990).

#### 4.2.6.3.2. Cálculo do índice de recuperação do soluto

A eficiência de extração para diferentes condições operacionais pré-estabelecidas foi obtida através da expressão proposta por KAWASE (1990), a qual se baseia nas concentrações da fase onde se encontra o soluto:

$$E_k = \frac{C_f - C_r}{C_f} \times 100$$

Onde:  $C_f$  é a fração mássica de soluto na alimentação e

$C_r$  é a fração mássica de soluto no refinado

O fluxograma representativo de todo processo experimental está demonstrado na FIGURA 13.

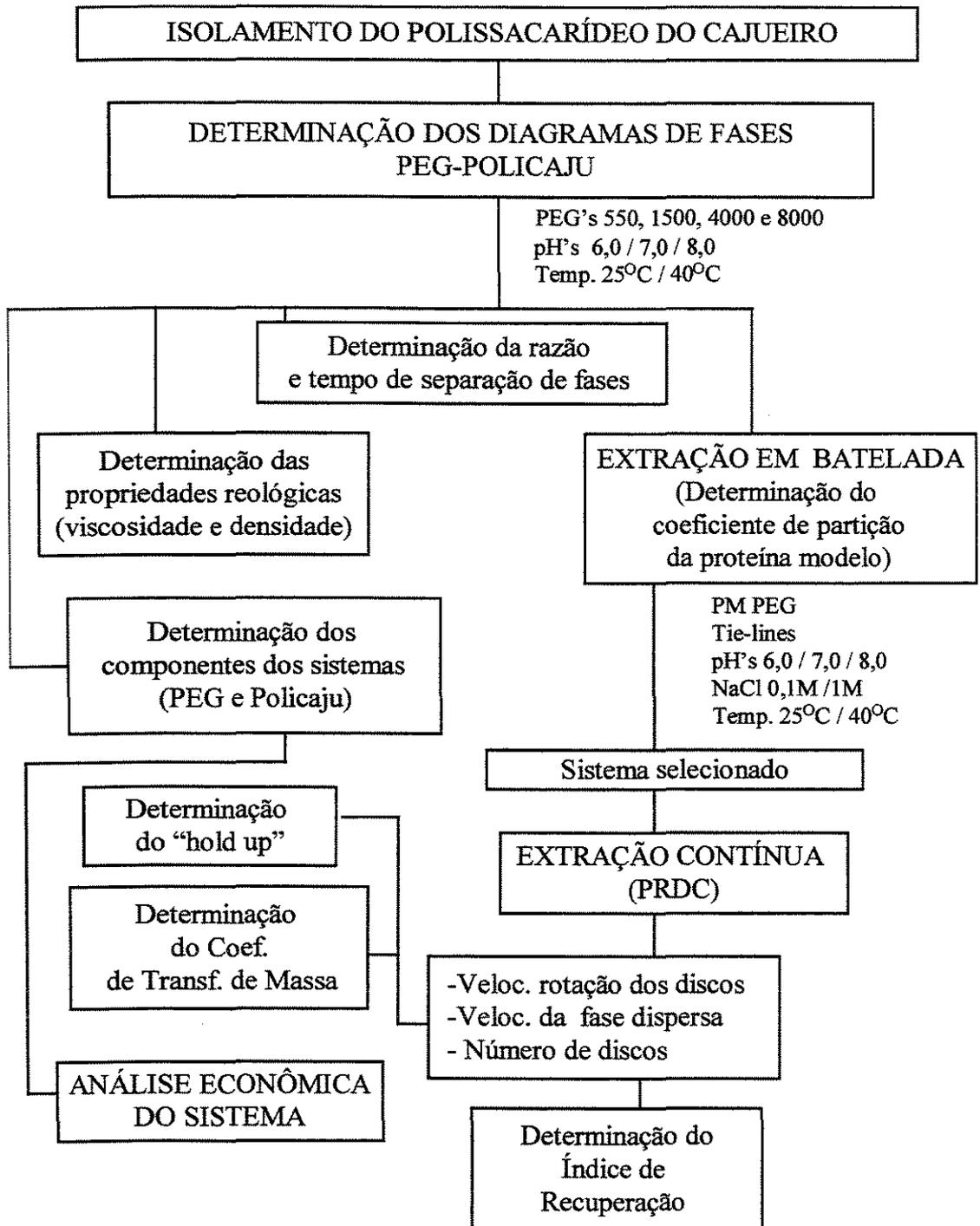


FIGURA13- Fluxograma representativo do processo experimental

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

Neste sentido, procurou-se estudar a aplicação de um polímero regional de baixo custo a técnicas de separação bifásica aquosa, possibilitando a redução dos custos no desenvolvimento de sistemas bifásicos aquosos como técnica alternativa aos processos tradicionais de recuperação. Pretendeu-se mostrar que os dados compilados ao longo das últimas três décadas para sistemas bifásicos aquosos formados por polímeros como a Dextrana podem ser transpostos para sistemas formados por polímeros alternativos.

### 5.1. DETERMINAÇÃO DOS DIAGRAMAS DE FASES

Para a caracterização dos sistemas bifásicos formados por combinação do polissacarídeo em estudo com PEG, convém determinar o diagrama de fases. O seu interesse reside no fato de ser possível, pela sua consulta, ter-se acesso à concentração de polímeros necessária à formação das fases, à composição das fases em equilíbrio e efetuar uma previsão qualitativa da partição de moléculas e partículas biológicas.

Inicialmente, procedeu-se com o isolamento do Policaju. O processo de purificação permitiu um rendimento de 85-90% em polissacarídeo. Em seguida foram testadas duas metodologias para a determinação dos diagramas de fases do sistema bifásico aquoso PEG-Policaju. Os resultados obtidos utilizando a metodologia proposta por POLYAKOV e colaboradores (1980) para o sistema PEG 8000-Policaju estão apresentados na FIGURA 14.

A análise comparativa dos resultados experimentais apresentados graficamente com o modelo gráfico proposto (ver item 4.2.3 - FIGURA 12) demonstrou um comportamento diferente do modelo proposto, uma vez que não foi possível extrapolar para os valores de  $y = 0$  e  $y = 1$ .

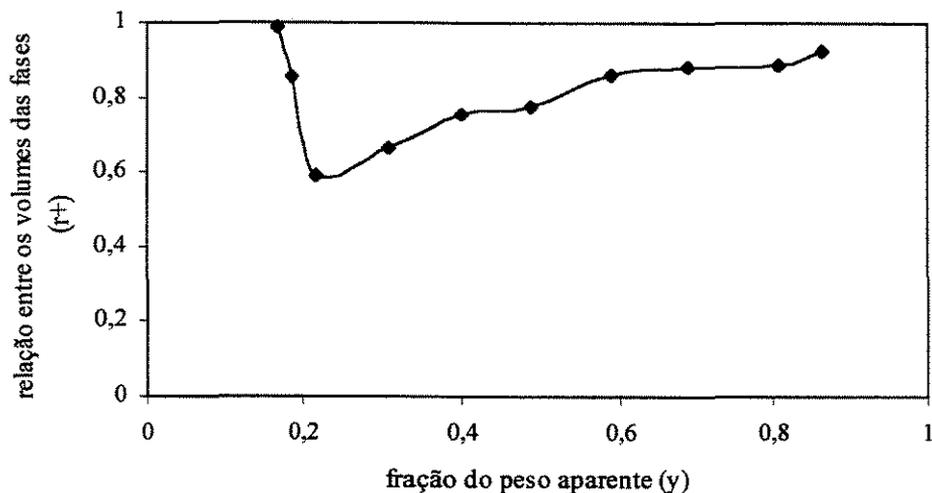


FIGURA 14- Relação entre os volumes das fases ( $r_+$ ) versus fração do peso aparente ( $y$ ) para o sistema PEG 8000-Policaju

Estes resultados podem ser explicados pela viscosidade da fase rica em goma na maioria dos pontos testados, o que pode acarretar grandes erros na aplicação desta metodologia devido a heterogeneidade da fase gel, de acordo com POLYAKOV e colaboradores (1980). Por outro lado, a metodologia proposta por ALBERTSSON (1986) foi bastante favorável para a determinação dos diagramas de fases dos sistemas em estudo.

Após a seleção da metodologia para a determinação das curvas binodais, prosseguiu-se com a determinação da uniformidade das amostras de polissacarídeo obtidas em diferentes localidades no estado de Pernambuco, uma vez que, como qualquer produto natural, possui variações entre diferentes lotes do mesmo produto. De fato, lotes isolados da goma demonstraram características particulares em relação a viscosidade, coloração e solubilidade, destacando-se a importância em se utilizar uma amostra padronizada da matéria prima. Desta forma, determinaram-se inicialmente os diagramas de fases PEG 8000-Policaju e PEG 4000-Policaju no pH 7,0 para duas amostras diferentes de Policaju. Estes resultados podem ser observados nas FIGURAS 15 e 16 onde se demonstram as características da binodal de uma amostragem única de goma (primeiro lote) e um lote contendo gommas de diferentes localidades do estado de

Pernambuco (segundo lote). As curvas binodais demonstraram um perfil semelhante apresentando apenas um leve deslocamento entre ambas. Este comportamento demonstra a possibilidade de utilização de ambas as amostras, de modo que o segundo lote, mais expressivo por reunir características mais homogêneas de uma amostragem maior, foi selecionado para a realização dos experimentos. Observou-se ainda a necessidade em se utilizar altas concentrações de polímeros para a construção do diagrama de fases deste sistema, não sendo possível a determinação da binodal com o PEG 550, um vez que as fases eram altamente viscosas, inviabilizando o uso deste sistema para estudos de partição. De fato, observou-se a partir da revisão bibliográfica a necessidade em se utilizar PEG's de peso molecular elevado, normalmente acima de 1000 Da, para a formação de duas fases aquosas quando se estudam sistemas polímero-polímero (KULA et al., 1982), o mesmo não acontecendo em sistemas PEG-Sais, já que para estes casos também se utilizam PEG's de baixo peso molecular (ALBERTSSON, 1986; ZASLAVSKY, 1995).

Para efeitos de comparação, os diagramas de fases estabelecidos para os PEG's de peso molecular 4000 e 8000, para o lote selecionado, foram plotados juntamente com sistemas semelhantes extensivamente descritos na literatura, como o sistema PEG-Dextrana 500 e PEG-Dextrana T500 (FIGURAS 17 e 18). As curvas, que representam o limite entre um sistema unifásico e bifásico possuem perfis semelhantes em ambos os casos, havendo porém um deslocamento no sentido de maior concentração dos polímeros para o sistema PEG-Policaju. Este deslocamento está relacionado ao menor peso molecular do Policaju em relação a Dextrana. De fato, o peso molecular do Policaju está em torno de 110.000 Da, enquanto que o peso molecular da Dextrana 500 e da Dextrana T500, é de 215.000 Da e 507.000 Da, respectivamente (ZASLAVSKY, 1995). Ambos os polissacarídeos, Policaju e Dextrana se concentraram predominantemente na fase inferior, enquanto o PEG se concentrou predominantemente na fase superior.

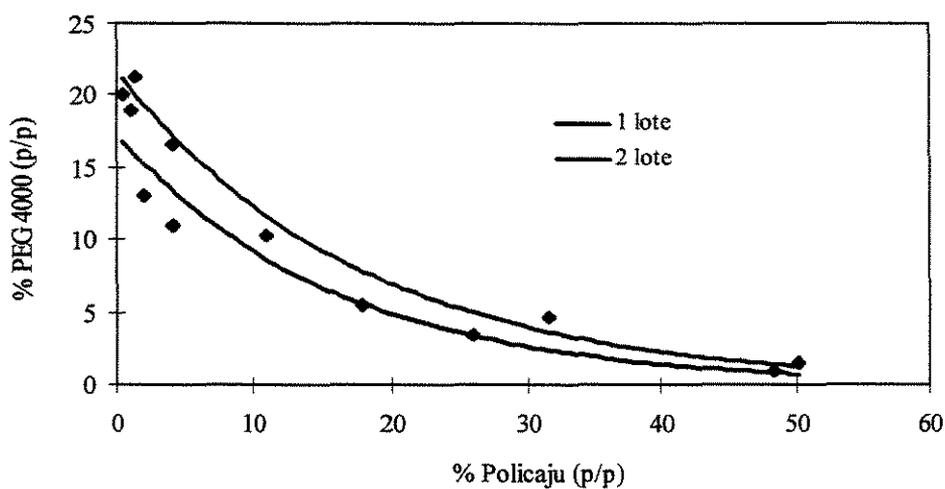


FIGURA 15- Diagrama de fases do sistema PEG 4000-Policaju para dois lotes de goma (1º lote e 2º lote) a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , pH 7,0

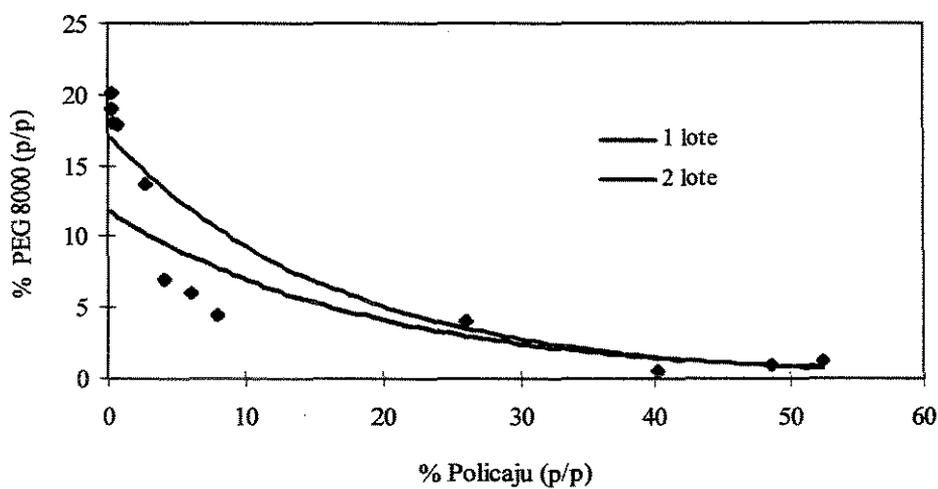


FIGURA 16- Diagrama de fases do sistema PEG 8000-Policaju para dois lotes de goma (1º lote e 2º lote) a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , pH 7,0

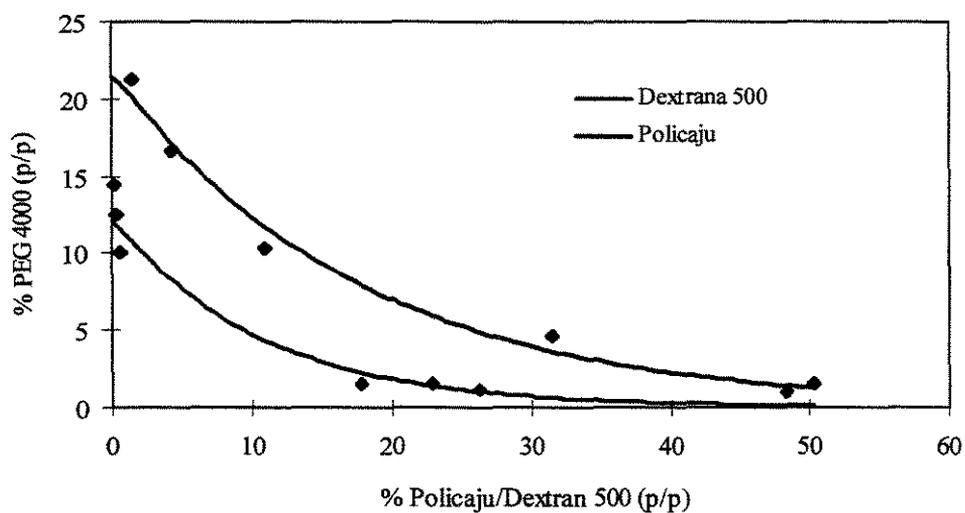


FIGURA 17- Diagramas de fases dos sistemas PEG 4000-Policaju e PEG 4000-Dextrana500 (ZASLAVSKY, 1995) a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

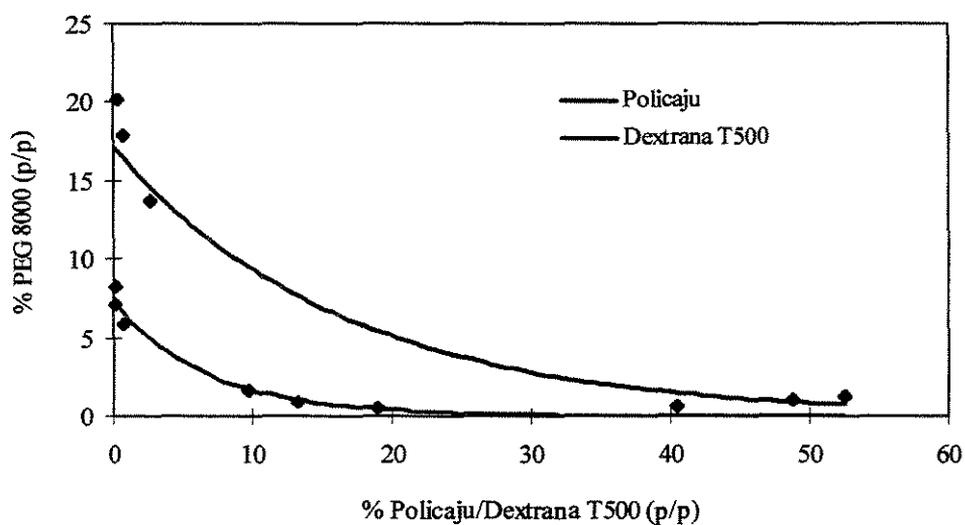


FIGURA 18- Diagramas de fases dos sistemas PEG 8000-Policaju e PEG 8000-DextranaT500 (ZASLAVSKY, 1995) a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

### 5.1.1. Influência do peso molecular do polietileno glicol no diagrama de fases

Analisando-se os diagramas de fases para os sistemas estudados nos diferentes pH's (6,0, 7,0 e 8,0) observou-se um deslocamento das binodais no sentido de menores concentrações de polímeros com o aumento do peso molecular do PEG, ou seja, quanto maior o peso molecular do Polietileno glicol, menor a concentração necessária de polímeros para a formação de um sistema bifásico aquoso (FIGURAS 19, 20 e 21). Com o aumento do peso molecular do PEG há um aumento na hidrofobicidade do polímero, o qual se torna mais incompatível com o polissacarídeo do cajueiro (Policaju), levando a separação de fases a menores concentrações de polímeros. Os resultados obtidos concordam com as trabalhos realizados por ALBERTSSON (1986). O mesmo comportamento foi observado por VENÂNCIO e colaboradores (1995) ao se estudar o sistema PEG-Goma de Guar para PEG 4000 e 8000 e CHRISTIAN e colaboradores (1998) para o sistema PEG-Arabinogalactana com PEG's 4500 e 20000. SZLAG & GIULIANO (1988) também observaram que a concentração de Maltodextrina requerida para a formação de um sistema bifásico com PEG 8000 aumenta com a diminuição do peso molecular do polissacarídeo.

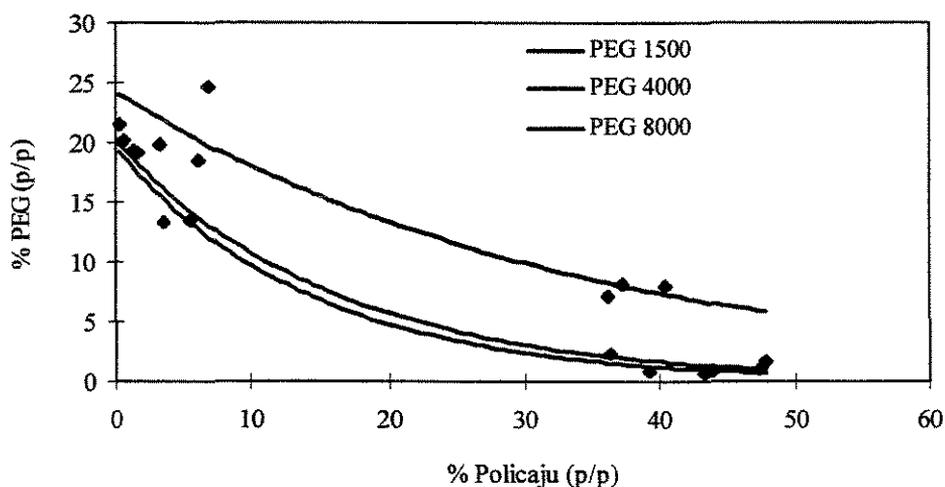


FIGURA 19- Diagramas de fases dos sistemas PEG 8000-Policaju, PEG 4000-Policaju e PEG 1500-Policaju a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , pH 6,0

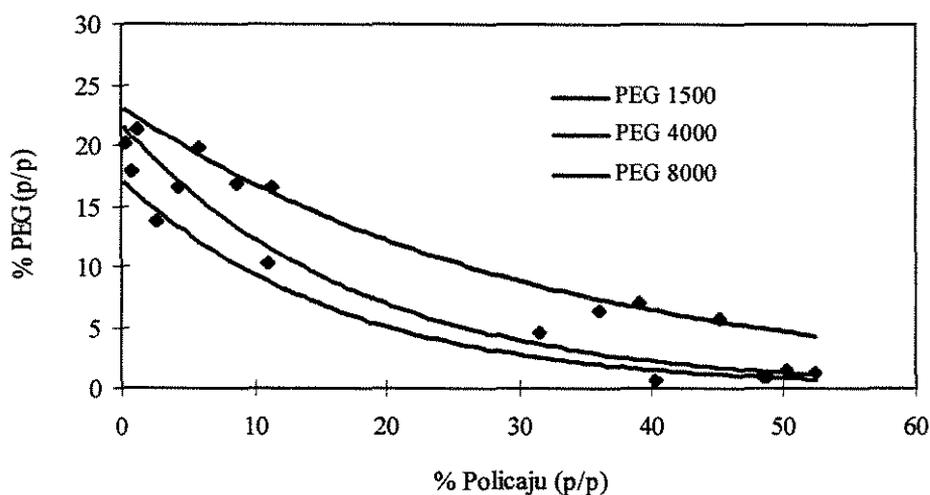


FIGURA 20- Diagramas de fases dos sistemas PEG 8000-Policaju, PEG 4000-Policaju e PEG 1500-Policaju a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , pH 7,0

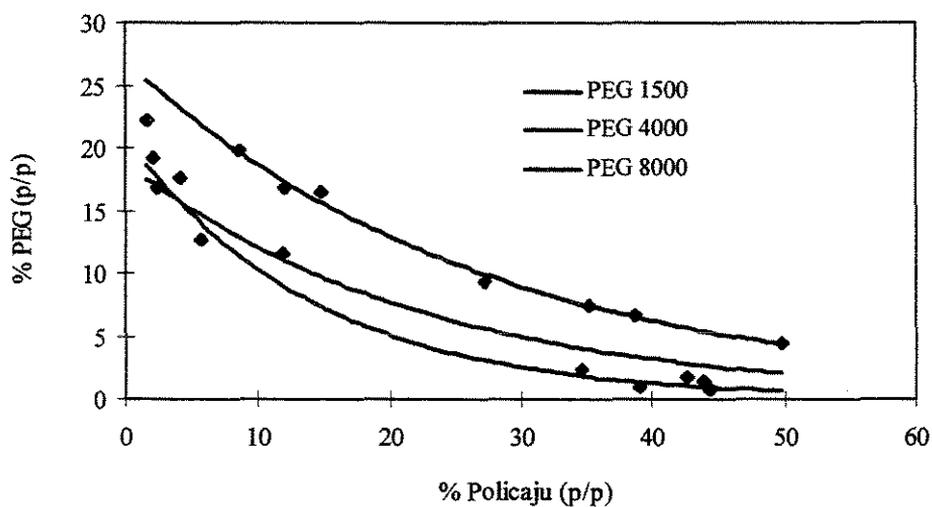


FIGURA 21- Diagramas de fases dos sistemas PEG 8000-Policaju, PEG 4000-Policaju e PEG 1500- Policaju a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , pH 8,0

### 5.1.2. Influência do pH no diagrama de fases

Analisando-se o comportamento das binodais de cada sistema frente aos diferentes pH's, não houve um deslocamento das binodais (FIGURAS 22, 23 e 24). Ainda, não foram encontrados na literatura dados a cerca da influência deste parâmetro sobre a binodal em sistemas polímero-polímero.

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

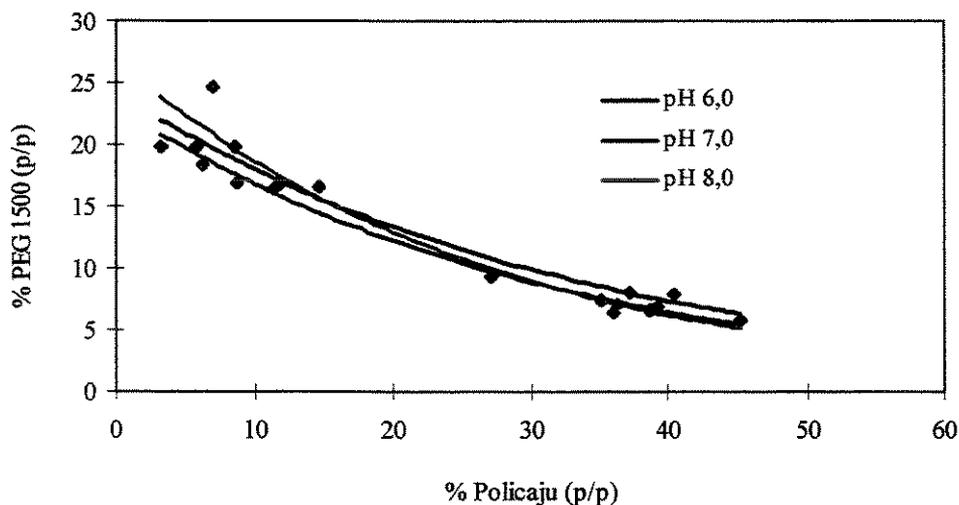


FIGURA 22- Diagrama de fases do sistema PEG 1500-Policaju nos pH's 6,0, 7,0 e 8,0 a 25°C ± 2°C

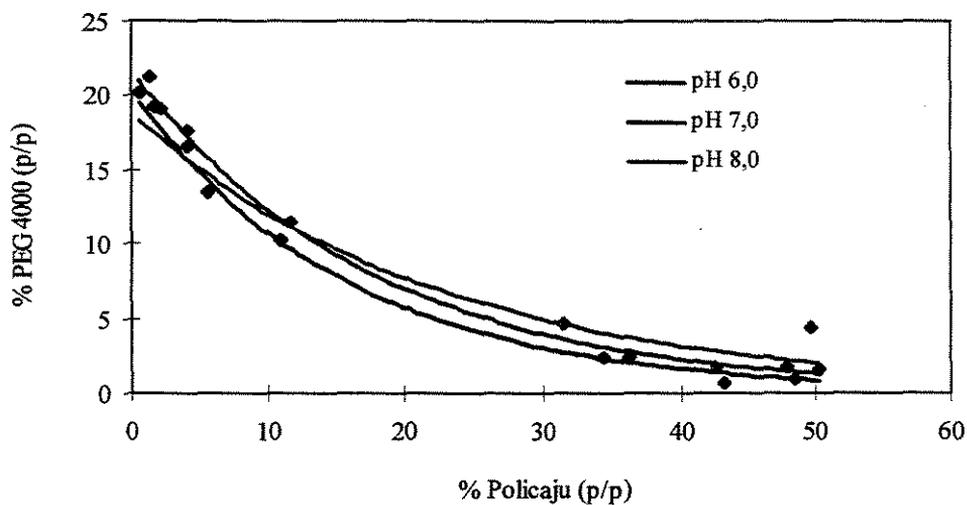


FIGURA 23- Diagrama de fases do sistema PEG 4000-Policaju nos pH's 6,0, 7,0 e 8,0 a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

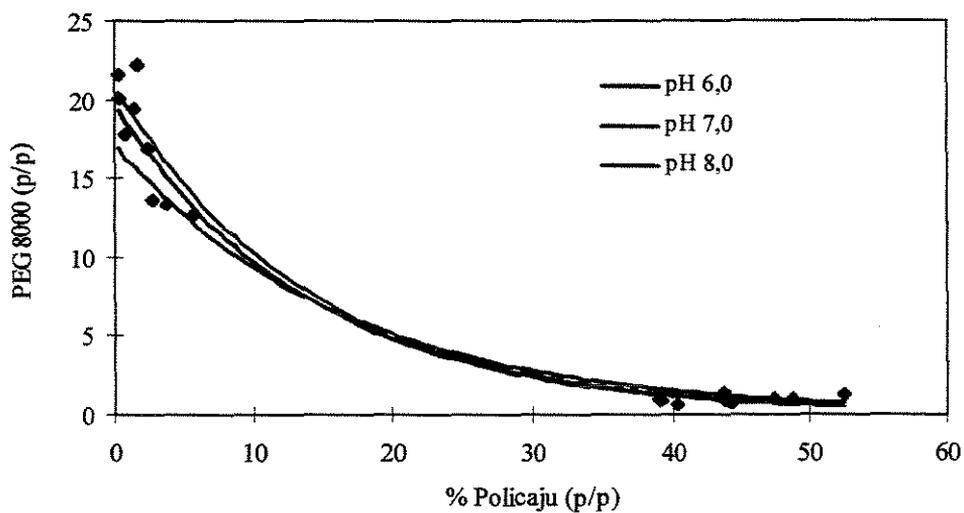


FIGURA 24- Diagrama de fases do sistema PEG 8000-Policaju nos pH's 6,0 7,0 e 8,0 a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

### 5.1.3. Influência da temperatura no diagrama de fases

O efeito da temperatura é muito diferente de sistema para sistema, dependendo do tipo de polímero usado. Para o sistema PEG-Policaju observou-se um comportamento semelhante para os três PEG's estudados (1500, 4000, 8000) ao se aumentar a temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  para  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , ou seja, a binodal dos sistemas permaneceu praticamente inalterada com a variação da temperatura (FIGURAS 25, 26 e 27). Este comportamento também pode ser observado pela semelhança entre a composição das "tie-lines" estudadas nas duas temperaturas (TABELAS 13, 14 e 15 com 19, 20 e 21). DIAMOND & HSU (1992) também observaram que o sistema Metilcelulose-Dextrana não é praticamente afetado pela temperatura. Por outro lado, outros sistemas polímero-polímero são bastante afetados por alterações na temperatura. VENÂNCIO e colaboradores (1993) estudando o sistema bifásico PEG-Hidroxioprilamido, observaram a necessidade de maiores concentrações dos polímeros para a formação das fases ao se aumentar a temperatura de  $19^{\circ}\text{C}$  para  $50^{\circ}\text{C}$ . Este comportamento também foi observado por FORCINITI e colaboradores (1991) para sistemas PEG-Dextrana ao se aumentar a temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  para  $25^{\circ}\text{C}$  e para  $40^{\circ}\text{C}$ . ZASLAVSKY e colaboradores (1989) também observaram este comportamento para os sistemas Polivinilpirrolidina-Dextrana e Polivinil álcool-Dextrana. Por outro lado, os sistemas PEG-Sais se comportam de modo oposto. PATHAK e colaboradores (1991) observaram um deslocamento da binodal para a origem com o aumento da temperatura de  $20^{\circ}\text{C}$  para  $30^{\circ}\text{C}$  e para  $40^{\circ}\text{C}$  para sistemas PEG-Sais de sulfato.

A variação de temperatura estudada foi considerada adequada, pois a temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) é adequada para a extração de proteínas, inclusive industrialmente, sendo a variação de  $13^{\circ}\text{C}$  bastante razoável para analisar a estabilidade do sistema e a faixa de temperatura de trabalho de uma unidade industrial pode operar.

O estudo do deslocamento da binodal para baixas temperaturas não foi considerado um parâmetro relevante, uma vez que o polissacarídeo torna-se mais viscoso a baixas temperaturas, dificultando a utilização do sistema. Por outro lado, vários autores têm sugerido a modificação química de polímeros a fim de torná-los mais adequados para a aplicação em SBA. TJERNELD e colaboradores (1986), pela modificação química da molécula de amido através da introdução de grupos hidroxipropil, obtiveram um polímero mais estável a baixas temperaturas. Segundo os

autores, mesmo com o custo adicional da modificação, a aplicação da técnica seria comercialmente viável.

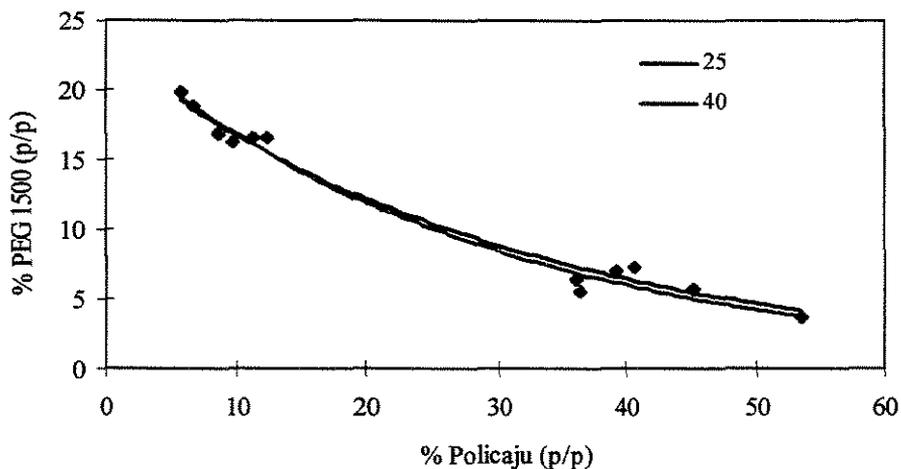


FIGURA 25- Diagrama de fases do sistema PEG 1500-Policaju nas temperaturas  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , pH 7,0

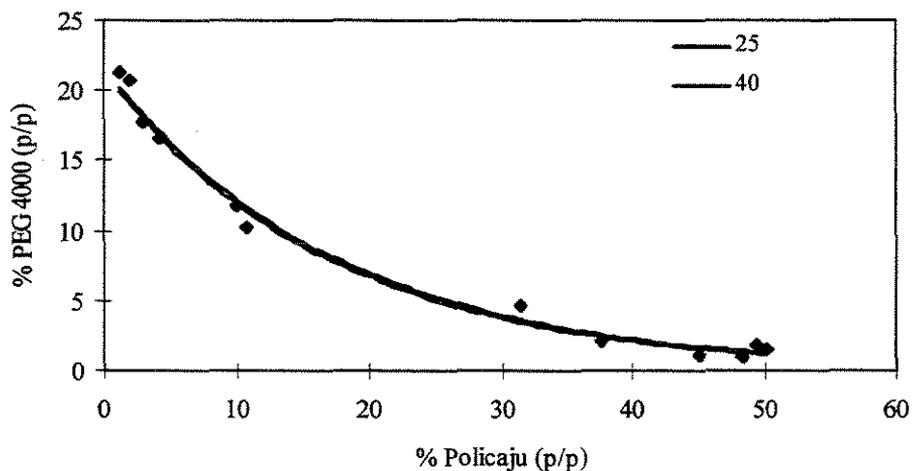


FIGURA 26- Diagrama de fases do sistema PEG 4000-Policaju nas temperaturas  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , pH 7,0

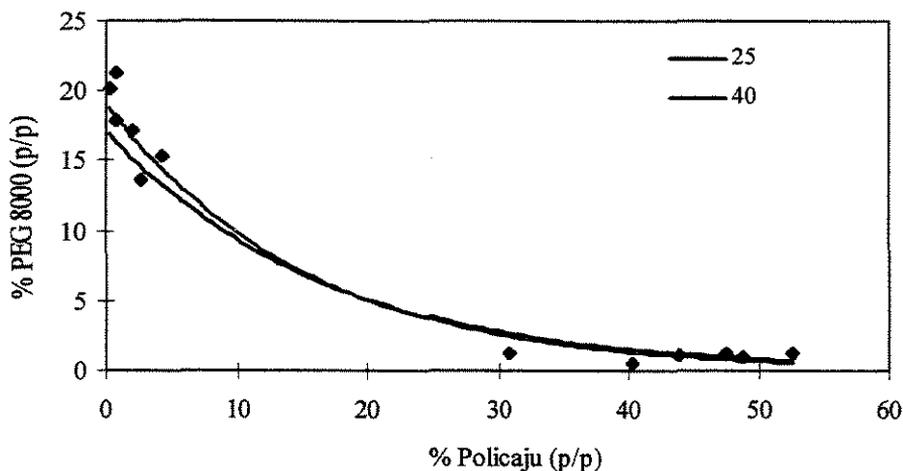


FIGURA 27- Diagrama de fases do sistema PEG 8000-Policaju nas temperaturas  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , pH 7,0

## 5.2. CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS BIFÁSICOS AQUOSOS

### 5.2.1. Composição dos sistemas bifásicos aquosos ("tie-lines")

A composição dos sistemas estudados ao longo deste trabalho para diferentes pH's e temperaturas estão apresentadas nas TABELAS a seguir. Pode-se observar que não há uma variação significativa entre as composições das "tie-lines" para cada peso molecular do PEG ao se variar o pH do sistema (6,0, 7,0 e 8,0) e a temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ).

TABELA 10- Composição das fases do sistema PEG 1500-Policaju a 25°C ± 2°C, pH 6,0

PEG 1500	Composição Total			Composição			Composição		
	do Sistema (% p/p)			da Fase Superior (% p/p)			da Fase Inferior (% p/p)		
Tie-line	Goma	PEG	H <sub>2</sub> O	Goma	PEG	H <sub>2</sub> O	Goma	PEG	H <sub>2</sub> O
1	21	13	66	6,22	18,45	75,33	36,97	7,15	55,88
2	22,5	13,8	63,7	3,31	19,82	76,87	40,42	7,97	51,61

TABELA 11- Composição das fases do sistema PEG 4000-Policaju a 25°C ± 2°C, pH 6,0

PEG 4000	Composição Total			Composição			Composição		
	do Sistema (% p/p)			da Fase Superior (%p/p)			da Fase Inferior (%p/p)		
Tie-line	Goma	PEG	H <sub>2</sub> O	Goma	PEG	H <sub>2</sub> O	Goma	PEG	H <sub>2</sub> O
1	18	9	73	5,52	13,54	80,94	36,35	2,37	61,28
2	20	11	69	1,66	19,23	79,11	43,22	0,63	56,15
3	22	13	65	0,59	20,24	79,17	47,84	1,68	50,48

TABELA 12- Composição das fases do sistema PEG 8000-Policaju a 25°C ± 2°C, pH 6,0

PEG 8000	Composição Total			Composição			Composição		
	do Sistema (% p/p)			da Fase Superior(%p/p)			da Fase Inferior (% p/p)		
Tie-line	Goma	PEG	H <sub>2</sub> O	Goma	PEG	H <sub>2</sub> O	Goma	PEG	H <sub>2</sub> O
1	16	9	75	3,64	13,33	83,03	39,15	0,86	59,99
2	18	11	71	1,33	19,39	79,28	43,88	0,85	55,27
3	20	13	67	0,35	21,56	78,09	47,37	0,99	51,64

TABELA 13- Composição das fases do sistema PEG 1500-Policaju a 25°C ± 2°C, pH 7,0

PEG 1500	Composição Total			Composição			Composição		
	do Sistema (% p/p)			da Fase Superior (% p/p)			da Fase Inferior (% p/p)		
Tie-line	Goma	PEG	H <sub>2</sub> O	Goma	PEG	H <sub>2</sub> O	Goma	PEG	H <sub>2</sub> O
1	21	13	66	8,73	16,91	74,36	39,20	7,00	53,80
2	22,5	13,8	63,7	5,75	19,89	74,36	45,15	5,73	49,12

TABELA 14- Composição das fases do sistema PEG 4000-Policaju a 25°C ± 2°C, pH 7,0

PEG 4000	Composição Total			Composição			Composição		
	do Sistema (% p/p)			da Fase Superior (%p/p)			da Fase Inferior (%p/p)		
Tie-line	Goma	PEG	H <sub>2</sub> O	Goma	PEG	H <sub>2</sub> O	Goma	PEG	H <sub>2</sub> O
1	18	9	73	10,93	10,25	78,82	31,47	4,64	63,89
2	20	11	69	4,12	16,58	79,30	48,43	0,98	50,59
3	22	13	65	1,29	21,32	77,39	50,27	1,54	48,19

TABELA 15- Composição das fases do sistema PEG 8000-Policaju a 25°C ± 2°C, pH 7,0

PEG 8000	Composição Total			Composição			Composição		
	do Sistema (% p/p)			da Fase Superior(%p/p)			da Fase Inferior (% p/p)		
Tie-line	Goma	PEG	H <sub>2</sub> O	Goma	PEG	H <sub>2</sub> O	Goma	PEG	H <sub>2</sub> O
1	16	9	75	2,69	13,69	83,62	40,37	0,59	59,04
2	18	11	71	0,80	17,85	81,35	48,78	1,03	50,19
3	20	13	67	0,24	20,13	79,63	52,43	1,25	46,32

TABELA 16- Composição das fases do sistema PEG 1500-Policaju a 25°C ± 2°C, pH 8,0

PEG 1500	Composição Total			Composição			Composição		
	do Sistema (% p/p)			da Fase Superior (% p/p)			da Fase Inferior (% p/p)		
Tie-line	Goma	PEG	H <sub>2</sub> O	Goma	PEG	H <sub>2</sub> O	Goma	PEG	H <sub>2</sub> O
1	21	13	66	11,91	16,86	71,23	35,08	7,45	57,47
2	22,5	13,8	63,7	8,60	19,80	71,60	38,72	6,69	54,59

TABELA 17- Composição das fases do sistema PEG 4000-Policaju a 25°C ± 2°C, pH 8,0

PEG 4000	Composição Total			Composição			Composição		
	do Sistema (% p/p)			da Fase Superior (%p/p)			da Fase Inferior (%p/p)		
Tie-line	Goma	PEG	H <sub>2</sub> O	Goma	PEG	H <sub>2</sub> O	Goma	PEG	H <sub>2</sub> O
1	18	9	73	11,75	11,56	76,69	34,49	2,36	63,15
2	20	11	69	4,00	17,59	78,41	42,55	1,74	55,51
3	22	13	65	2,03	19,14	78,83	49,71	4,37	45,92

TABELA 18- Composição das fases do sistema PEG 8000-Policaju a 25°C ± 2°C, pH 8,0

PEG 8000	Composição Total			Composição			Composição		
	do Sistema (% p/p)			da Fase Superior(%p/p)			da Fase Inferior (% p/p)		
Tie-line	Goma	PEG	H <sub>2</sub> O	Goma	PEG	H <sub>2</sub> O	Goma	PEG	H <sub>2</sub> O
1	16	9	75	5,59	12,64	81,77	38,99	0,97	60,04
2	18	11	71	2,32	16,86	80,82	43,76	1,41	54,83
3	20	13	67	1,63	22,18	76,19	44,37	0,81	54,82

TABELA 19- Composição das fases do sistema PEG 1500-Policaju a 40°C ± 2°C, pH 7,0

PEG 1500	Composição Total			Composição			Composição		
	do Sistema (% p/p)			da Fase Superior (% p/p)			da Fase Inferior (% p/p)		
Tie-line	Goma	PEG	H <sub>2</sub> O	Goma	PEG	H <sub>2</sub> O	Goma	PEG	H <sub>2</sub> O
1	21	13	66	9,74	16,29	73,97	40,58	7,26	52,16
2	22,5	13,8	63,7	6,76	18,86	74,38	53,48	3,67	42,85

TABELA 20- Composição das fases do sistema PEG 4000-Policaju a 40°C ± 2°C, pH 7,0

PEG 4000	Composição Total			Composição			Composição		
	do Sistema (% p/p)			da Fase Superior (%p/p)			da Fase Inferior (%p/p)		
Tie-line	Goma	PEG	H <sub>2</sub> O	Goma	PEG	H <sub>2</sub> O	Goma	PEG	H <sub>2</sub> O
1	18	9	73	10,00	11,78	78,22	37,75	2,16	60,09
2	20	11	69	3,00	17,75	79,25	54,07	1,11	53,82
3	22	13	65	2,00	20,73	77,27	49,44	1,80	48,76

TABELA 21- Composição das fases do sistema PEG 8000-Policaju a 40°C ± 2°C, pH 7,0

PEG 8000	Composição Total			Composição			Composição		
	do Sistema (% p/p)			da Fase Superior(%p/p)			da Fase Inferior (% p/p)		
Tie-line	Goma	PEG	H <sub>2</sub> O	Goma	PEG	H <sub>2</sub> O	Goma	PEG	H <sub>2</sub> O
1	16	9	75	4,22	15,28	80,50	30,84	1,21	67,95
2	18	11	71	2,08	17,24	80,68	43,84	1,08	55,08
3	20	13	67	0,79	21,25	77,96	47,46	1,25	51,29

### 5.2.2. Propriedades reológicas dos sistemas bifásicos aquosos

As propriedades reológicas dos SBA's estudados, viscosidade e densidade, estão apresentadas nas TABELAS 22 e 23.

TABELA 22- Propriedades reológicas das fases dos diferentes SBA em estudo a 25°C ± 2°C

Sistema ("tie-line")	pH	Fase superior		Fase inferior	
		Densidade (g/mL)	Viscosidade (cP)	Densidade (g/mL)	Viscosidade (cP)
13%PEG1500-21%Policaju	6,0	1,058	157,3	1,173	675,0
13,8%PEG1500-22,5%Policaju		1,052	154,0	1,086	nd
9%PEG4000-18%Policaju		1,049	201,5	1,128	nd
11%PEG4000-20%Policaju		1,047	225,0	1,203	nd
13%PEG4000-22%Policaju		1,040	301,5	1,248	nd
9%PEG8000-16%Policaju		1,036	267,0	1,135	nd
11%PEG8000-18%Policaju		1,025	378,5	1,214	nd
13%PEG8000-20%Policaju		1,028	540,7	1,275	nd
13%PEG1500-21%Policaju	7,0	1,051	200,0	1,160	800,00
13,8%PEG1500-22,5%Policaju		1,036	168,7	1,233	nd
9%PEG4000-18%Policaju		1,026	242,5	1,199	nd
11%PEG4000-20%Policaju		1,036	244,0	1,208	nd
13%PEG4000-22%Policaju		1,006	316,2	1,313	nd
9%PEG8000-16%Policaju		1,032	291,6	1,160	nd
11%PEG8000-18%Policaju		1,000	388,3	1,289	nd
13%PEG8000-20%Policaju		0,989	550,5	1,401	nd
13%PEG1500-21%Policaju	8,0	1,042	208,1	1,179	nd
13,8%PEG1500-22,5%Policaju		1,032	178,6	1,267	nd
9%PEG4000-18%Policaju		1,038	273,6	1,156	nd
11%PEG4000-20%Policaju		1,037	250,7	1,223	nd
13%PEG4000-22%Policaju		1,002	299,8	1,295	nd
9%PEG8000-16%Policaju		1,016	316,2	1,240	nd
11%PEG8000-18%Policaju		1,024	393,2	1,206	nd
13%PEG8000-20%Policaju		0,993	545,6	1,358	nd

nd- não determinado (&gt; 983 cP)

TABELA 23- Propriedades reológicas das fases dos diferentes SBA em estudo a  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 

Sistema (tie-line)	pH	Fase superior		Fase inferior	
		Densidade (g/mL)	Viscosidade (cP)	Densidade (g/mL)	Viscosidade (cP)
13%PEG1500-21%Policaju	7,0	1,071	1,04	1,202	350,00
13,8%PEG1500-22,5%Policaju		1,084	1,11	1,154	380,00
9%PEG4000-18%Policaju		1,081	1,58	1,177	357,20
11%PEG4000-20%Policaju		1,064	1,58	1,268	611,10
13%PEG4000-22%Policaju		1,059	2,56	1,208	nd
9%PEG8000-16%Policaju		1,063	3,22	1,065	468,00
11%PEG8000-18%Policaju		1,047	3,43	1,173	810,00
13%PEG8000-20%Policaju		1,048	5,50	1,235	nd

nd- não determinado (> 983 cP)

Para as fases superiores, o aumento do comprimento da "tie-line" provocou o aumento da viscosidade devido ao aumento da concentração do sistema, com exceção dos sistemas PEG1500-Policaju. Com relação ao peso molecular do PEG, a viscosidade das fases superiores é menor para o PEG 1500, seguida dos PEG's 4000 e 8000, respectivamente.

Analisando-se a variação da viscosidade com o pH para as "tie-lines" estudadas, observou-se um aumento da viscosidade das fases superiores com o aumento do pH

Não foi possível estudar as viscosidades da maioria das fases inferiores já que as mesmas ultrapassaram a faixa de leitura do equipamento utilizado (ver item 4.2.4.2.). Por outro lado, observou-se visualmente o mesmo comportamento para a fase inferior, ou seja, o aumento da viscosidade com o aumento da "tie-line" e do pH.

Uma das características de polissacarídeos contendo grupos carboxilas é a alteração da viscosidade de suas soluções com a mudança do pH. A alteração da viscosidade da fase inferior (rica em Policaju) em função do pH pode ser explicada pela variação da densidade de carga na molécula do Policaju. A redução do pH acarreta uma menor densidade de carga, ou seja, repulsão entre os grupos  $\text{RCOO}^-$  do ácido glucurônico, possibilitando que as cadeias se enovem, diminuindo assim a viscosidade intrínseca.

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

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

As viscosidades das fases dos sistemas PEG-Policaju na temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) são superiores às de outros sistemas polímero-polímero como PEG-Dextrana e PEG-Maltodextrina (TJERNELD *et al.*, 1986; SZLAG & GIULIANO, 1988), encontrando comparações nos sistemas Klucel-L-Pluronic P105 (SKUSE *et al.*, 1992) e PEG-Hidroxipropilamido bruto (VENÂNCIO *et al.*, 1993).

### 5.2.3. Razão de fases e tempos de separação dos sistemas bifásicos aquosos

A razão de fases e o tempo de separação dos SBA testados estão apresentadas na TABELA 24.

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

Com relação a partição, se considera que a concentração do material a se particionar tem um efeito bastante reduzido na distribuição resultante. Este fator contribui para se considerar que o coeficiente de partição de um soluto em sistemas bifásicos em equilíbrio é praticamente independente dos volumes das fases em sistemas polímero-polímero (KULA, 1986).

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

TABELA 24- Razão de fases e tempo de separação das fases dos diferentes SBA em estudo

Sistema ("tie-line")	pH	Temperatura (°C)	Razão de fases	Tempo de separação das fases (segundos)
13%PEG1500-21%Policaju	6,0	25 ± 2	1,8	18
13,8%PEG1500-22,5%Policaju			2,0	15
9%PEG4000-18% Policaju			2,1	45
11%PEG4000-20%Policaju			2,0	90
13%PEG4000-22% Policaju			1,9	180
9%PEG8000-16% Policaju			2,6	100
11%PEG8000-18%Policaju			2,1	140
13%PEG8000-20%Policaju			2,0	360
13%PEG1500-21% Policaju	7,0		2,0	25
13,8%PEG1500-22,5%Policaju			1,7	13
9%PEG4000-18%Policaju			3,3	45
11%PEG4000-20%Policaju			2,1	100
13%PEG4000-22%Policaju			1,9	165
9%PEG8000-16%Policaju			3,1	110
11%PEG8000-18%Policaju			2,3	180
13%PEG8000-20%Policaju			2,1	330
13%PEG1500-21%Policaju	8,0		2,1	25
13,8%PEG1500-22,5%Policaju			2,0	15
9%PEG4000-18%Policaju			3,7	50
11%PEG4000-20%Policaju			2,0	100
13%PEG4000-22%Policaju			2,0	120
9%PEG8000-16%Policaju			3,7	110
11%PEG8000-18% Policaju			2,6	155
13%PEG8000-20%Policaju			2,1	320

Continuação Tabela 24....

13%PEG1500-21%Policaju	7,0	40 ± 2	1,5	15
13,8%PEG1500-22,5%Policaju			1,6	20
9%PEG4000-18%Policaju			2,1	40
11%PEG4000-20%Policaju			1,8	40
13%PEG4000-22%Policaju			1,8	105
9%PEG8000-16%Policaju			2,9	60
11%PEG8000-18%Policaju			2,2	160
13%PEG8000-20%Policaju			2,0	220

De um modo geral, o aumento da "tie-line" aumentou o tempo de separação das fases para todos os casos estudados devido ao aumento da viscosidade (TABELA 22), com o aumento da concentração do sistema.

Observa-se também que o tempo de separação das fases diminui com a redução do peso molecular do PEG.

O aumento da temperatura para  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , como discutido anteriormente, reduziu a viscosidade das fases (TABELA 23) e conseqüentemente o tempo de separação.

A aplicação em larga escala de sistemas bifásicos aquosos está muito condicionada ao requerimento relativamente alto de reagentes químicos. Por outro lado, o tempo reduzido requerido para a separação das fases que afeta diretamente os custos de energia consiste no maior fator do baixo custo operacional destes sistemas. Desta forma, a análise do tempo de separação das fases dos sistemas estudados demonstrou que são necessários apenas poucos minutos para se atingir o equilíbrio de fases, independentemente dos comprimentos de "tie-line" e dos pH's testados. Uma vez que a rapidez do equilíbrio de fases é fundamental para o "scale up" de um processo (CABRAL & AIRES-BARROS, 1993), os sistemas PEG-Policaju parecem atender perfeitamente a esta condição, facilitando a viabilidade comercial não só da aplicação do sistema, mas também do equipamento necessário ao processo de separação.

### 5.3. ESTUDOS DE PARTIÇÃO EM BATELADA

Existem muitos parâmetros que influenciam a partição de uma determinada proteína tais como pH do sistema, tipo e concentração de sais presentes no sistema, peso molecular do polímero e concentração e propriedades da proteína, como estrutura, hidrofobicidade e peso molecular (ALMEIDA *et al.*, 1998; HACHEM *et al.*, 1996). Devido a complexidade dos fenômenos de partição, torna-se difícil prever o comportamento de uma determinada proteína e selecionar as condições de separação para se planejar um experimento (HACHEM *et al.*, 1996). Desta forma, a maioria dos estudos neste campo são empíricos e a purificação é alcançada pela variação sistemática de vários fatores.

Neste trabalho caracterizou-se o sistema PEG-Policaju e estudou-se sua aplicação através da partição de uma proteína modelo, a albumina de soro bovino (BSA). A influência de diversos parâmetros como peso molecular do PEG, comprimento da "tie-line", pH, adição de NaCl e temperatura foram estudados.

Para todas as condições experimentais estudadas, o coeficiente de partição da proteína foi menor que 1. Isto significa que a albumina de soro bovino se distribuiu predominantemente na fase rica em Policaju. Para os sistemas PEG 1500-Policaju, não houve formação de duas fases aquosas em equilíbrio após a adição da solução contendo a proteína para a menor "tie-line" no pH 8,0. Este mesmo comportamento foi observado por SARMENTO e colaboradores (1994) e PORTO (1998) para a partição de Citocromo b5 em sistemas PEG-Sais de fosfato.

#### 5.3.1. Influência do peso molecular do polietileno glicol (PEG) na partição da albumina de soro bovino

Analisando-se a influência do peso molecular do PEG no coeficiente de partição da proteína, não foi possível estabelecer uma correlação entre o coeficiente de partição e o peso molecular do PEG no sistema PEG-Policaju, ou seja, não houve uma tendência geral no comportamento de partição da albumina, a qual permaneceu na fase inferior rica em Policaju (FIGURAS 28, 29 e 30). Resultados similares foram observados para a partição de BSA em

sistemas PEG-Arabinogalactana (CHRISTIAN *et al.*, 1998) e PEG-Maltodextrina (ALVES *et al.*, 1999). Nestes sistemas, a proteína permaneceu na fase inferior para todas as condições estudadas.

Estudos realizados para a partição de cutinase em sistemas PEG-Hidroxipropilamido bruto e PEG-Reppal PES100 (um Hidroxipropilamido purificado) indicaram que o sistema foi apenas ligeiramente influenciado pelo peso molecular do PEG, uma vez que os coeficientes de partição não demonstraram uma tendência regular e foram similares em todos os casos, permanecendo menores que 1 (ALMEIDA *et al.*, 1998). Os resultados obtidos para o sistema PEG-Policaju, assim como para os acima citados são similares aos obtidos para a maioria dos sistemas PEG-Polissacarídeos descritos na literatura. Por outro lado, comportamentos geralmente esperados, ou seja, o aumento do coeficiente de partição com a redução do peso molecular do PEG também são observados em sistemas PEG-Polissacarídeos. Estudos realizados por TJERNELD e colaboradores (1986) em sistemas PEG-Hidroxipropilamido e por HUSTEDT e colaboradores (1978) em sistemas PEG-Dextrana demonstraram um aumento do coeficiente de partição de diferentes enzimas com a redução do peso molecular do PEG.

A solubilidade das proteínas em solução de PEG tem sido interpretada por vários autores em termos dos efeitos do volume excluído do polímero (ATHA & INGHAM, 1981; POLSON *et al.*, 1964). O PEG é um polímero composto por grupos  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$  ligados entre si por uma ligação éter. Segundo a teoria desenvolvida por estes autores, as proteínas são excluídas estericamente de zonas do solvente ocupadas pelo polímero, sendo as solubilidades proporcionais ao volume de solvente disponível (solvente sem PEG). Assim, quanto maior for o volume excluído do polietileno glicol menor é o volume de solvente disponível, o que implica uma diminuição de solubilidade das proteínas na fase rica em polímero e conseqüentemente uma diminuição do coeficiente de partição. Ainda, sendo o PEG um polímero que possui um grupo hidroxila ( $-\text{OH}$ ) ligado a cada um dos grupos  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$  terminais, é de se esperar que, para uma determinada concentração, a sua hidrofobicidade diminua com a diminuição da massa molecular, uma vez que aumenta a representação daqueles grupos hidrofílicos terminais (KULA, 1985).

Desta forma, devido ao efeito do volume excluído, a tendência geralmente esperada seria um aumento nos coeficientes de partição com a diminuição do peso molecular do PEG. Contudo, é importante considerar que a alteração do peso molecular do polímero torna necessário alterar a concentração do mesmo (Exemplo: uma maior quantidade de PEG 1000 será necessária para

formar um SBA do que para o PEG 8000), podendo assim induzir a variações na composição das duas fases em equilíbrio, afetando a partição de materiais biológicos o que pode influenciar o coeficiente de partição de uma dada molécula no sentido contrário.

A importância do peso molecular da proteína também deve ser considerada, uma vez que o efeito da massa molecular do polímero está muito relacionado com a massa molecular do biomaterial. De fato, a partição do aminoácido ou proteínas de baixa massa molecular não é muito influenciada por variações da massa molecular dos polímeros, não acontecendo o mesmo com proteínas de maior massa molecular (ALBERTSSON, 1986).

Proteínas com alta massa molecular são mais influenciadas por mudanças na massa molecular dos polímeros do que proteínas de pequena massa molecular; pode-se ter, como exemplo, o coeficiente de partição do citocromo C e  $\beta$ -galactosidase no sistema Dextrana 40 (0,18 e 0,24, respectivamente) com o correspondente valor no sistema Dextrana 500 (0,17 e 1,59, respectivamente) (ALBERTSSON, 1986).

Em estudos realizados para a purificação de cutinase em sistemas PEG-Hidroxiopilamido já descritos anteriormente, a proteína particionou-se basicamente na fase inferior para os PEG's, "tie-lines" e pH's testados demonstrando claramente um efeito reduzido das propriedades do sistema na partição (ALMEIDA et al., 1998). Uma vez que a partição é muito mais sensível ao peso molecular do polímero para proteínas com peso molecular maior do que 50.000 Da, a baixa massa molecular da cutinase (22.000 Da) poderia ser a responsável pelas pequenas alterações observadas. Embora a Albumina de soro bovino tenha um peso molecular elevado (65.000 - 67.000 Da), a partição da proteína também não sofreu alterações significativas com a variação do peso molecular do PEG, como discutido anteriormente. Provavelmente, outros fatores, que não a massa molecular, predominaram sobre a distribuição da proteína.

Estudos de partição do citocromo b5 em sistemas PEG-Sais de fosfato demonstraram um aumento no coeficiente de partição com a diminuição do peso molecular do PEG (SARMENTO et al., 1994). HUDDLESTON e colaboradores (1991) estudaram o coeficiente de partição de proteínas de *Saccharomyces cerevisiae* (levedura do pão) em sistemas PEG-Sais de fosfato, observando para PEG 400 e 1000 uma preferência das proteínas pela fase superior. Para o PEG

3350, no entanto, a maioria das proteínas se concentrou na fase inferior, mostrando o efeito pronunciado do peso molecular do PEG no coeficiente de partição.

A partição de proteínas do leite de ovelhas foi estudada em sistemas PEG-Sais. A redução do peso molecular do PEG aumentou o coeficiente de partição de todas as proteínas testadas (HARRIS *et al.*, 1991). A solubilidade das proteínas e de outros materiais em PEG's de vários pesos moleculares foi explicada pelo modelo de partição de FLORY-HUGGINS (1941), a qual atribui a influência do peso molecular do PEG na partição ao aumento do número dos grupos hidrofílicos terminais em PEG's de menor peso molecular, os quais possuem o efeito de reduzir a hidrofobicidade total da fase PEG e também ao efeito do volume excluído, que aumenta com o aumento da massa molecular do polímero, conforme discutido anteriormente.

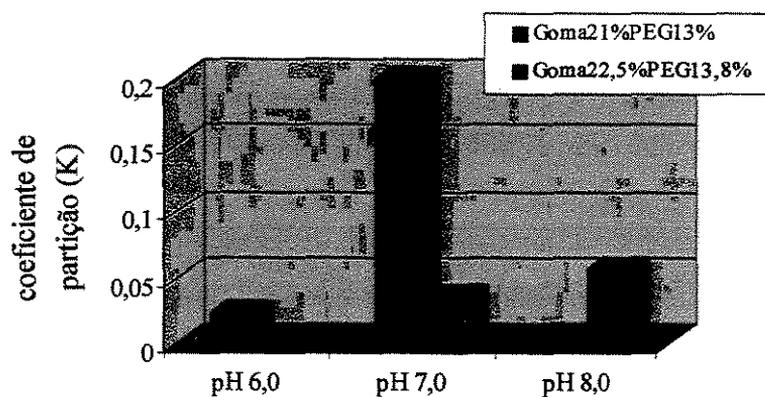


FIGURA 28- Influência do comprimento da "tie-line" e do pH no coeficiente de partição da albumina de soro bovino em sistema PEG1500-Policaju a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$

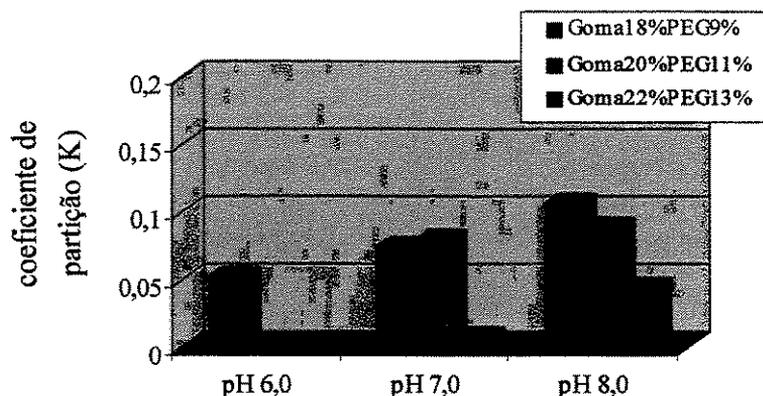


FIGURA 29- Influência do comprimento da "tie-line" e do pH no coeficiente de partição da albumina de soro bovino em sistema PEG4000-Policaju a  $25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$

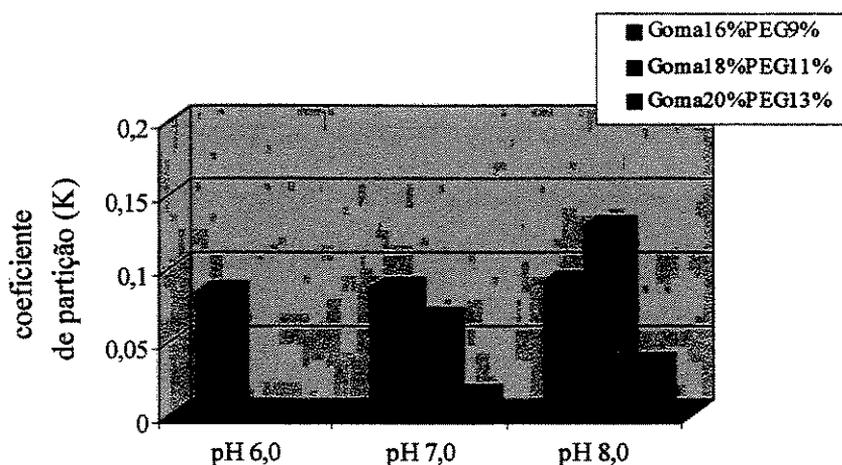


FIGURA 30- Influência do comprimento da "tie-line" e do pH no coeficiente de partição da albumina de soro bovino em sistema PEG8000-Policaju a  $25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$

Estudos realizados por SCHIMIDT e colaboradores (1994) sobre a correlação entre o efeito da concentração de proteína total e o comportamento da partição das proteínas (amiloglicosidase, subtilisina e inibidor de tripsina) em sistemas PEG-Sais de fosfato demonstraram que a solubilidade das proteínas em solução de PEG é governada pelo efeito de

exclusão estérico e pela interação hidrofóbica entre proteína e o grupo etileno do PEG, o qual é provavelmente responsável pela alta solubilidade na fase rica em PEG de muitas proteínas hidrofóbicas.

### 5.3.2. Influência do comprimento da "tie-line" na partição da albumina de soro bovino

Analisando-se a influência do comprimento da "tie-line" no coeficiente de partição da albumina, observou-se para todos os PEG's testados, uma tendência a diminuição do coeficiente de partição com o aumento da "tie-line" para os três valores de pH testados, ou seja, o aumento da "tie-line" provocou uma redução no coeficiente de partição (FIGURAS 28, 29 e 30).

Perto do ponto crítico de um sistema bifásico as duas fases em equilíbrio têm composições muito semelhantes, pelo que o coeficiente de partição de biomoléculas é aproximadamente igual a 1. Pelo contrário, aumentando a concentração dos polímeros, ou seja, afastando-os do ponto crítico, aumenta-se a diferença entre as duas fases de modo que as biomoléculas distribuem-se de forma desigual entre as duas fases, podendo acumular-se preferencialmente nas fases de cima ou de baixo (ALBERTSSON, 1986).

Os resultados da influência da "tie-line" no coeficiente de partição encontrados na literatura para sistemas polímero-polímero parecem seguir o mesmo perfil. Estudos realizados com a cutinase em sistema PEG-Hidroxipropilamido bruto e PEG-Reppal PES100 demonstraram um leve decréscimo do coeficiente de partição com o aumento da "tie-line". Este aumento da partição se deve ao aumento da concentração de PEG que causa a exclusão molecular da proteína da fase superior, conforme discutido anteriormente (ALMEIDA et al., 1998). O estudo da partição da  $\alpha$ -lactoalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina em sistemas PEG-Hidroxipropilamido demonstrou que o aumento da "tie-line" provocou uma maior afinidade das proteínas para fase inferior diminuindo o coeficiente de partição (ORTIN et al., 1991). STURESSON e colaboradores (1990) estudaram o efeito da concentração do polímero na partição da glicose 6-P-desidrogenase e lactatodesidrogenase em sistemas PEG-Aquaphase PPT. Assim como no sistema PEG-Dextrana as enzimas se concentraram preferencialmente na fase inferior com o aumento da "tie-line". Estudos mais recentes com a BSA em sistemas PEG-Arabinogalactana (CHRISTIAN et al., 1998)

e com mioglobina em sistemas Poli(NVA)(polivinil acetamida)-Dextrana (KISHIDA et al., 1998) também demonstraram a redução do coeficiente de partição com o aumento da "tie-line".

Vale salientar entretanto, que um comportamento contrário a este descrito acima pode ocorrer devido a influência de outros fatores envolvidos. Por exemplo, além do efeito da exclusão do PEG, deve ser considerado também a afinidade da proteína pela fase hidrofóbica e este efeito pode ser mais pronunciado, levando a um comportamento inesperado na partição (ALMEIDA et al., 1998).

Analisando os sistemas polímero-sais observa-se um comportamento contrário frente aos sistemas polímero-polímero. Estudos de partição do citocromo b5 em sistemas PEG-Sais de fosfato demonstraram um aumento da partição com o aumento do comprimento da "tie-line" (SARMENTO et al., 1994). VIDEIRA & AIRES-BARROS (1994) estudando a partição de ácido clavulânico e RITO-PALOMARES & HERNANDEZ (1998) as proteínas do soro de queijo em sistemas PEG-Sais de fosfato também observaram o aumento do coeficiente de partição com o comprimento da "tie-line" para estes sistemas.

O efeito do comprimento da "tie-line" no volume livre em sistemas de PEG-Sais de fosfato foi investigado por HUDDLESTON e colaboradores (1991). Abaixo do ponto crítico o volume livre da mistura PEG-Sais de fosfato é aproximadamente igual à soma dos volumes livres das soluções individuais daqueles componentes. Acima do ponto crítico, o volume livre da fase de cima, rica em Polietileno glicol, permanece relativamente constante, enquanto que o volume livre da fase de baixo, rica em fosfatos, diminui rapidamente em resposta ao aumento da concentração dos componentes do sistema. Comparando estes resultados com os obtidos para as soluções individuais de Polietileno glicol e de fosfatos pode concluir-se que o aumento do comprimento da "tie-line" promove um aumento da concentração de fosfatos na fase rica em sal, enquanto que na fase rica em Polietileno glicol esta permanece relativamente constante e igual ao seu limite de solubilidade em soluções daquele polímero. Na prática, isto resulta no "salting-out" das proteínas da fase rica em sal para a fase rica em PEG e conseqüentemente num aumento do coeficiente de partição até que os limites de solubilidade das proteínas na fase rica em sal, motivada pelo aumento da concentração de fosfatos, dá origem à transferência daquelas para a fase rica em

polímero. O coeficiente de partição de proteínas é então um parâmetro que depende das suas solubilidades relativas em cada uma das fases.

### 5.3.3. Influência do pH na partição da albumina de soro bovino

Analisando-se os diferentes pH's (6,0, 7,0 e 8,0), observou-se que o aumento do pH provocou uma leve tendência ao aumento do coeficiente de partição para a albumina de soro bovino para todos os sistemas estudados (FIGURAS 28, 29 e 30).

VENÂNCIO e colaboradores (1995) realizaram estudos de partição de albumina de soro bovino em sistemas PEG-Goma de Guar, em condições semelhantes às descritas neste trabalho, para dois PEG's (4000 e 8000) nos pH's 6,0 6,8 e 8,0. Os resultados demonstraram um leve aumento no coeficiente de partição com o aumento do pH em todos os sistemas testados. CHRISTIAN e colaboradores (1998) observaram um aumento do coeficiente de partição da BSA com o pH (5,0, 6,0, 7,0 e 8,0) em sistemas PEG-Arabinogalactana. STURESSON e colaboradores (1990) também observaram um aumento do coeficiente de partição da BSA e da imunoglobulina com o aumento do pH (6,0, 7,0 e 8,0) para sistemas PEG-Aquaphase PPT. Para o sistema PEG-Hidroxipropilamido bruto estudado por ALMEIDA e colaboradores (1998), em diferentes pH's (4,0, 6,0, 8,0, 9,0), o coeficiente de partição da cutinase ( $pI=7,8$ ) demonstrou pouca alteração com a variação do pH, embora um leve aumento deste parâmetro foi detectado com o aumento do pH de 4,0 para 8,0 porém, em pH 9,0, o coeficiente de partição foi menor do que em pH 8,0. Isto pode ser explicado com base nas propriedades hidrofóbicas do PEG, que pode se ligar aos resíduos hidrofóbicos da proteína. FORCINITI e colaboradores (1992) reportaram que as interações hidrofóbicas são maiores no pH perto do ponto isoelétrico da proteína.

### 5.3.4. Influência da adição de NaCl na partição da albumina de soro bovino

A escolha do sal é muito importante para os experimentos de partição. Se as proteínas a serem particionadas exibem carga positiva ou negativa (pH diferente do seu  $pI$ ), a pequena mas

significante adição de sais ou eletrólitos ao sistema afetará a partição da mesma. A explicação comumente utilizada é que os cátions e ânions do sal possuem diferentes afinidades pelas fases, resultando numa distribuição desigual (de acordo com o requerimento da eletroneutralidade nas fases) do sal e criando uma diferença de potencial eletrostático sobre a interface (ALBERTSSON, 1986). Diferentes sais promovem diferentes diferenças de potencial, tornando possível direcionar a partícula carregada para uma das fases pela escolha do par de íons adequado.

Para se obter uma maior e melhor caracterização do sistema bifásico PEG-Policaju, estudou-se o efeito da adição de 0,1M e 1M de NaCl na partição da albumina de soro bovino.

Os resultados obtidos para o sistema PEG 8000-Policaju (FIGURAS 37, 38 e 39) demonstraram de forma geral uma redução do coeficiente de partição com o aumento da concentração de NaCl em todos os pH's testados. Para os sistemas PEG 1500-Policaju (FIGURAS 31, 32 e 33) e PEG 4000-Policaju (FIGURAS 34, 35 e 36) a redução do coeficiente de partição não foi necessariamente proporcional a concentração de NaCl. Em alguns casos, o coeficiente de partição diminuiu apenas para uma dada concentração do sal.

Para o sistema PEG 4000-Policaju no pH 6,0, a adição de 0,1M de NaCl provocou a redução do coeficiente de partição, embora a concentração de 1M tenha aumentado o mesmo. Um comportamento semelhante foi observado para o sistema PEG 1500-Policaju a pH's 6,0 e 7,0. Para o pH 7,0 em sistemas PEG 4000-Policaju, a adição do sal nas duas concentrações testadas provocou de modo geral, a redução do coeficiente de partição da BSA, enquanto que para o pH 8,0 em sistemas PEG 4000-Policaju e PEG 1500-Policaju, a adição de 0,1M de NaCl provocou o aumento do coeficiente de partição, embora a concentração de 1 M tenha reduzido o mesmo.

Recentemente, GÜNDÜZ (1999) estudou a partição de BSA em sistemas PEG-Dextrana a diferentes pH's e concentrações de NaCl. Neste trabalho observou-se que o coeficiente de partição da proteína diminuiu até concentrações de 0,2M e aumentou a concentrações maiores do que esta para sistemas com pH 4,2, 5,0, 7,0 e 9,0. Para o pH 9,8 o coeficiente de partição da albumina tornou-se mínimo a partir da concentração de 0,1M do sal.

Estudos realizados por VENÂNCIO e colaboradores (1993) com sistemas PEG-Hidroxipropilamido demonstraram que a adição de NaCl a 0,1M reduziu o coeficiente de partição de proteínas carregadas negativamente. Assim como em outros sistemas (ALBERTSSON, 1986), espera-se que os sais não se distribuam de modo uniforme entre as fases e que uma pequena

predominância do ânion cloreto na fase superior possa ocorrer. A fase superior torna-se então negativamente carregada e repele as proteínas carregadas negativamente para a fase inferior. O mesmo comportamento foi observado para a partição de BSA em sistemas EO30/PO70-Dextrana T500 para a adição de NaCl nas concentrações de 0,01M e 0,1M (JOHANSSON et al., 1996). Os resultados obtidos para o sistema PEG-Policaju podem ser comparados aos descritos acima para baixas concentrações de sal (0,1M), uma vez que na maioria dos casos, a albumina de soro bovino, cujo pI está em torno de 5,1 e encontra-se negativamente carregada na faixa de pH testada, apresentou uma redução no coeficiente de partição.

A partição da BSA em sistemas PEG-Arabinogalactana (CHRISTIAN et al., 1998) e em sistemas PEG-Aquaphase PPT e PEG-Dextrana T500 (STURESSON et al., 1990) e de catalase e  $\beta$ -galactosidase em sistemas PEG-Aquaphase PPT (TJERNELD et al., 1986) diminuiu após a adição de 0,1M de NaCl para sistemas a pH 7,0. Por outro lado, em sistemas PEG-Dextrana T500 a pH 7,8, o aumento da concentração de NaCl até concentrações de 0,2 M, no qual a enzima encontra-se negativamente carregada, diminuiu o coeficiente de partição da fosforilase, enquanto que para concentrações além destas o coeficiente de partição aumentou (HUSTEDT et al., 1978). ALMEIDA e colaboradores (1998) estudaram a partição de cutinase em sistemas PEG-Reppal PES após adição de 0,1M e 1M de NaCl a pH's nos quais a enzima encontrava-se positivamente carregada. A variação do coeficiente de partição não foi necessariamente proporcional a concentração de NaCl.

O efeito de sais na partição de moléculas é dependente da carga do material a particionar, conforme discutido acima. Sendo a carga destes materiais extremamente dependente do pH é possível prever que o efeito da presença de sais seja maior quanto maior for a distância entre o pH e o pI, ou seja, o efeito do sal diminui com a proximidade do pI da proteína. Para os sistemas PEG-Policaju, tal comportamento regular não foi observado nas condições estudadas. Resultados obtidos por VENÂNCIO e colaboradores (1995) em sistemas PEG-Goma de Guar para a partição de BSA na presença de 0,1M de KCl demonstraram que o aumento do pH de 6,8 para 8,0 tornou o efeito do sal mais pronunciado, levando a redução do coeficiente de partição da proteína. Por outro lado, quando as proteínas são particionadas no seu pI, elas não possuem carga líquida e conseqüentemente, a repulsão/atração eletrostática tenderá a um mínimo e as interações hidrofóbicas na superfície da proteína serão mais pronunciadas.

Observou-se também, visualmente, que a dição de cloreto de sódio reduziu consideravelmente a viscosidade da fase inferior do sistema PEG-Policaju.

A redução da viscosidade foi detalhadamente estudada através do efeito da concentração crescente de NaCl sobre soluções de polissacarídeo de palma gigante e pectina (REYES, 1978).

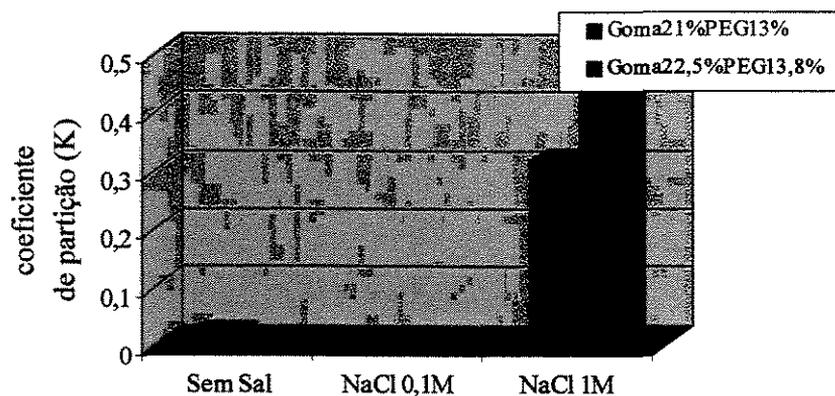


FIGURA 31- Influência da adição de NaCl no coeficiente de partição da albumina de soro bovino em sistema PEG1500-Policaju no pH 6,0 a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$

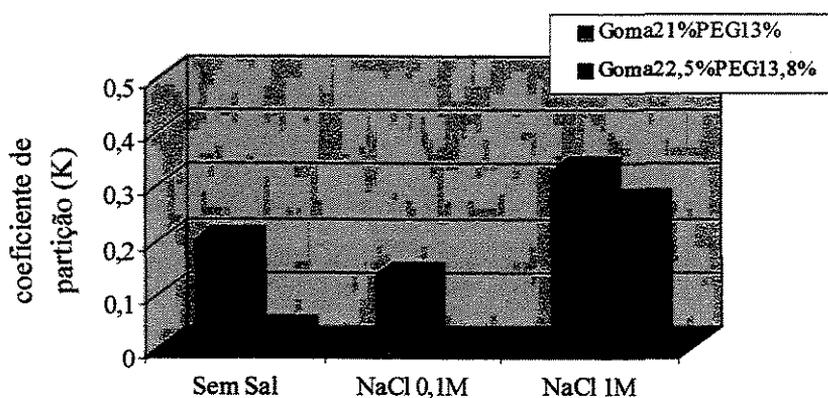


FIGURA 32- Influência da adição de NaCl no coeficiente de partição da albumina de soro bovino em sistema PEG1500-Policaju no pH 7,0 a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$

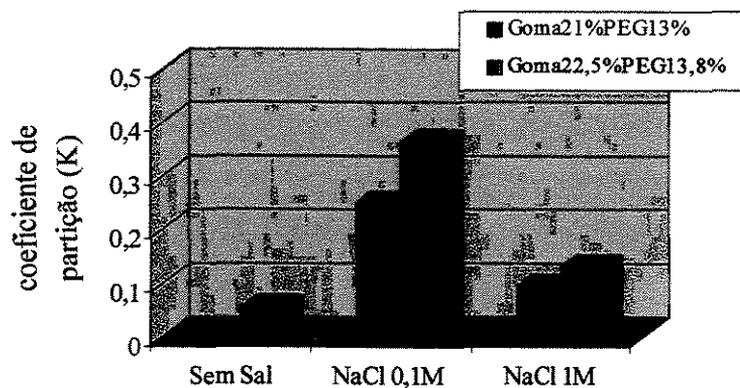


FIGURA 33- Influência da adição de NaCl no coeficiente de partição da albumina de soro bovino em sistema PEG1500-Policaju no pH 8,0 a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$

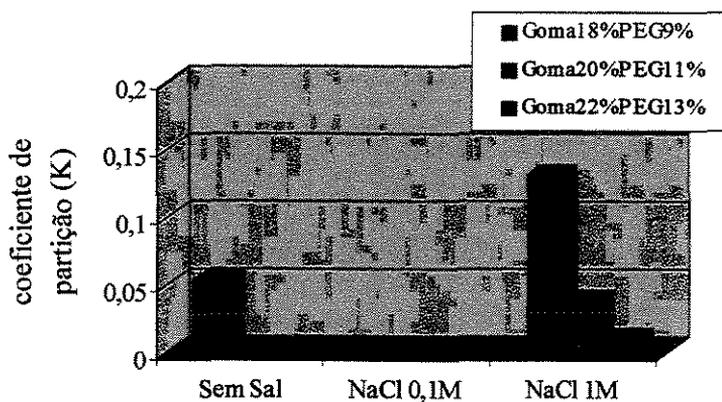


FIGURA 34- Influência da adição de NaCl no coeficiente de partição da albumina de soro bovino em sistema PEG4000-Policaju no pH 6,0 a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$

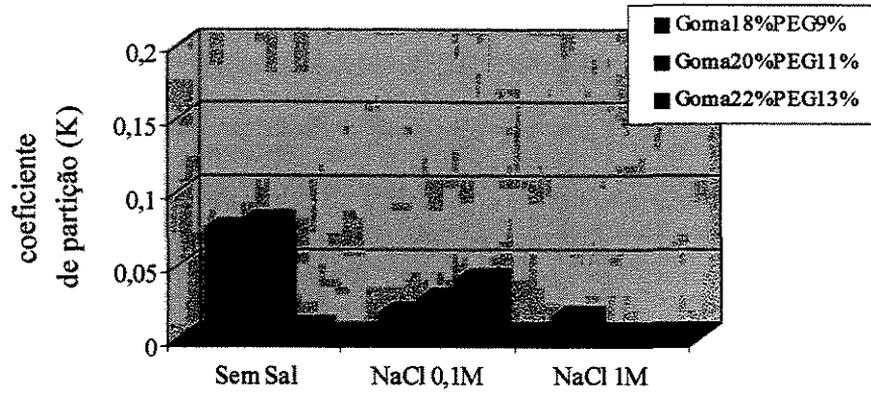


FIGURA 35- Influência da adição de NaCl no coeficiente de partição da albumina de soro bovino em sistema PEG4000-Policaju no pH 7,0 a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$

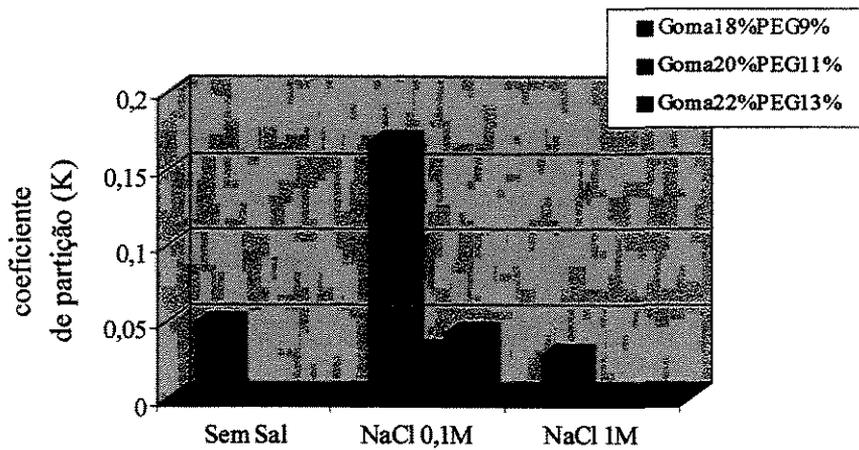


FIGURA 36- Influência da adição de NaCl no coeficiente de partição da albumina de soro bovino em sistema PEG4000-Policaju no pH 8,0 a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$

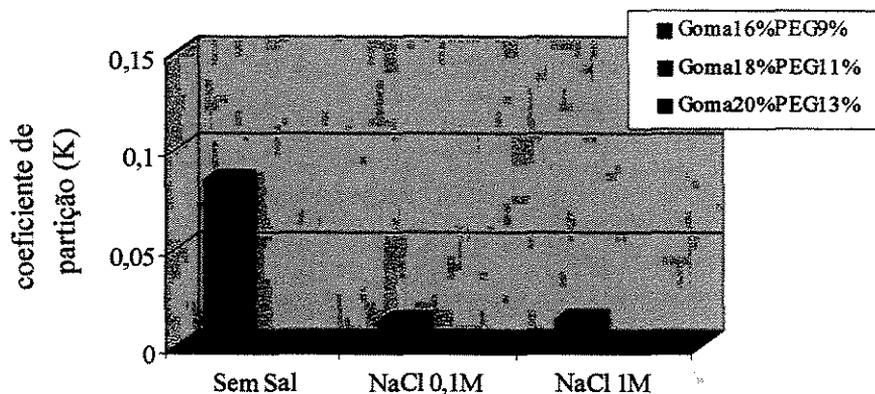


FIGURA 37- Influência da adição de NaCl no coeficiente de partição da albumina de soro bovino em sistema PEG8000-Policaju no pH 6,0 a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$

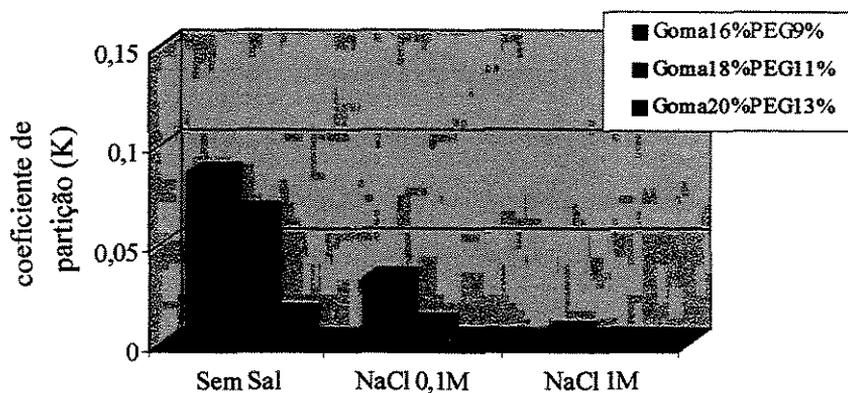


FIGURA 38- Influência da adição de NaCl no coeficiente de partição da albumina de soro bovino em sistema PEG8000-Policaju no pH 7,0 a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$

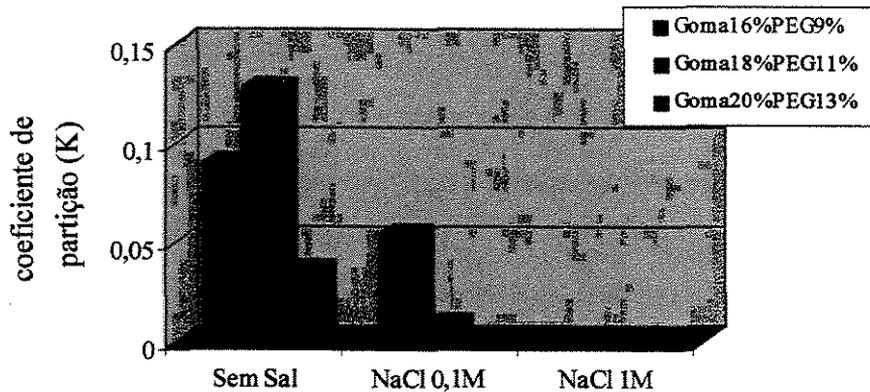


FIGURA 39- Influência da adição de NaCl no coeficiente de partição da albumina de soro bovino em sistema PEG8000-Policaju no pH 8,0 a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

### 5.3.5. Influência da temperatura na partição da albumina de soro bovino

O efeito da temperatura sobre o coeficiente de partição é bastante complexo devido a sua influência na composição das fases em equilíbrio, assim como sobre a estrutura da proteína. Alguns trabalhos relatam um aumento do coeficiente de partição com a temperatura (JOHANSSON *et al.*, 1983; TJERNELD *et al.*, 1985); enquanto outros descrevem que não há relação entre o coeficiente de partição e a temperatura (JOHANSSON *et al.*, 1973; TJERNELD *et al.*, 1985), demonstrando a necessidade de estudos mais aprofundados para se esclarecer o efeito deste parâmetro sobre a partição.

Os resultados obtidos para a influência da temperatura no coeficiente de partição da BSA em sistemas PEG-Policaju demonstraram, de modo geral, uma diminuição do coeficiente de partição com o aumento da temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  para  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  para todos os PEG's testados (FIGURAS 40, 41 e 42). Pode-se observar também, de modo geral, que quanto maior o comprimento da "tie-line", mais pronunciado é o efeito da temperatura sobre o coeficiente de partição. Vários estudos consideram a influência da alteração da temperatura na composição das fases, levando a alteração do comprimento da "tie-line". Para os sistemas PEG-Policaju, este efeito pode ser desconsiderado uma vez que a alteração da temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  para  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

não provocou alterações significativas no diagrama de fases (FIGURAS 25, 26 e 27 e TABELAS 13, 14 e 15 e 19, 20 e 21).

Estudos realizados por FORCINITI e colaboradores (1991) com sistemas PEG-Dextrana para diferentes proteínas demonstraram, embora com algumas exceções, uma tendência para o aumento do coeficiente de partição com o aumento da temperatura de 4°C para 25°C e de 25°C para 40°C. Estes autores observaram que os coeficientes de partição para a lisozima e quimiotripsinogênio aumentaram cerca de 40% com a temperatura, enquanto que os coeficientes de partição da albumina de soro bovino e da catalase foram apenas ligeiramente afetados. O efeito da temperatura foi mais pronunciado para maiores comprimentos da "tie-line" para a lisozima e quimiotripsinogênio e para menores comprimentos da "tie-line" para a catalase.

Em resumo, a influência da temperatura parece ser altamente dependente do tipo de proteína particionada e do comprimento da "tie-line".

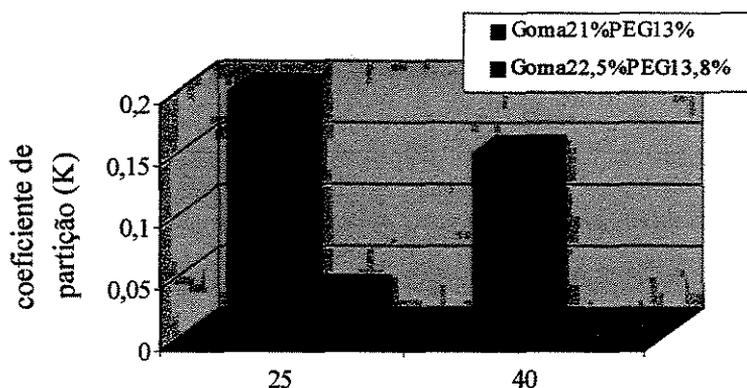


FIGURA 40- Influência da temperatura no coeficiente de partição da albumina de soro bovino em sistema PEG1500-Policaju no pH 7,0

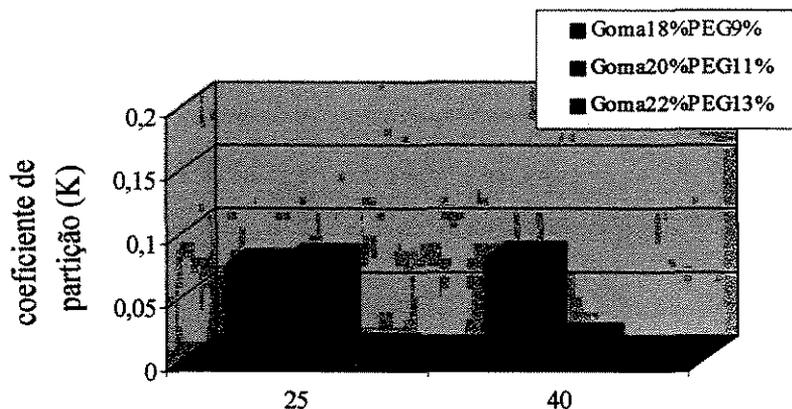


FIGURA 41- Influência da temperatura no coeficiente de partição da albumina de soro bovino em sistema PEG4000-Policaju no pH 7,0

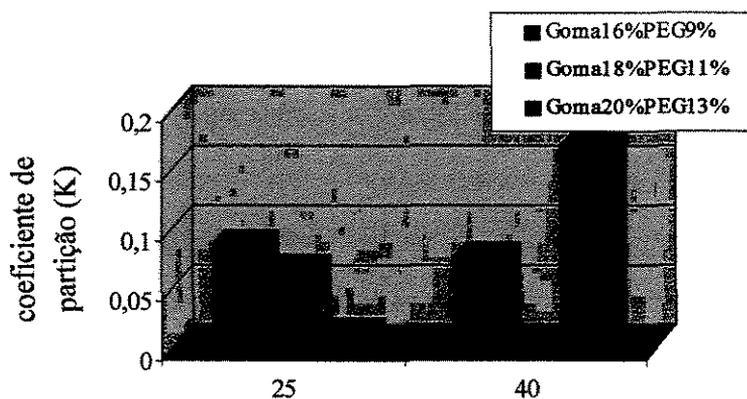


FIGURA 42- Influência da temperatura no coeficiente de partição da albumina de soro bovino em sistema PEG8000-Policaju no pH 7,0

#### 5.4. EXTRAÇÃO CONTÍNUA UTILIZANDO COLUNA DE DISCOS PERFURADOS ROTATIVOS (PRDC)

A seleção de sistemas de extração líquido-líquido para aplicações em larga escala implica o recurso a regras convencionais bem definidas em processos de engenharia química: diferenças de densidade entre as fases superiores a 5% são desejáveis, a viscosidade de ambas as fases deve ser inferior a 10 mPas e a tensão superficial deve situar-se entre 1 a 50 mPam. Estas condições são desejadas para a formação de uma dispersão de fases adequada (CUSACK et al., 1991). Os SBA possuem propriedades físicas que os tornam diferentes dos sistemas convencionais orgânico-aquoso empregues em engenharia química. Nos sistemas aquosos, a fase pesada exibe valores de viscosidade superiores a 10 mPas e a tensão interfacial é sempre inferior a 1 mPam. A diferença de densidade entre as fases constitui o único parâmetro que se encontra dentro dos limites referidos anteriormente.

Apesar das dificuldades, os sistemas bifásicos têm sido aplicados com sucesso a processos de extração líquido-líquido em larga escala. De modo geral, as colunas de extração, pela sua simplicidade de construção e operação, constituem uma alternativa atrativa quando se deseja misturar, equilibrar e separar duas fases líquidas imiscíveis. A grande vantagem no recurso a colunas é a eliminação do emprego de dispendiosas centrífugas, uma vez que a separação de fases é promovida pela gravidade.

Poucos sistemas bifásicos aquosos têm sido testados em colunas de extração líquido-líquido. Os trabalhos encontrados na literatura referem-se a sistemas PEG-Dextrana (SAWANT et al., 1990), sistemas PEG-Maltodextrina (RAGHAV-RAO et al., 1991) e a sistemas PEG-Sais (JAFARABAD et al., 1992a e b; PORTO et al., 1997; 1999).

Dada a escassez de resultados encontrados na literatura, especialmente no que se refere à aplicação de sistemas bifásicos aquosos formados por dois polímeros e a utilização destes em extração contínua, torna-se necessário desenvolver novos e menos dispendiosos sistemas para processamento em grande escala.

A utilização de SBA em colunas tipo Spray (JAFARABAD et al., 1992a e b) e no extrator Graesser (COIMBRA et al., 1994) tem sido mencionada.

São muito poucos os SBA testados em colunas de discos perfurados rotativos (PRDC). Os resultados se referem apenas a extração de cutinase em sistemas micelares (CARNEIRO-da-CUNHA *et al.*, 1994) e sistemas bifásicos aquosos PEG-Sais (PORTO *et al.*, 1997; 1999) o que motivou as investigações no sentido de caracterizar hidrodinamicamente este novo sistema neste tipo de coluna.

A necessidade em se desenvolver sistemas mais econômicos e aplicáveis em processos de larga escala torna também a PRDC como um candidato atrativo quando se deseja estudar a transferência de massa já que é de fácil construção e não necessita manutenções dispendiosas.

Assim, após a caracterização do sistema bifásico em batelada, procedeu-se com os experimentos em contínuo em colunas de discos perfurados rotativos. O sistema selecionado foi o PEG4000-Policaju, pelas propriedades físicas e análise econômica favoráveis, funcionando a fase rica em Policaju como fase contínua e fase rica em PEG como a fase dispersa.

Inicialmente, caracterizou-se hidrodinamicamente a coluna através do estudo do efeito da velocidade de rotação, da velocidade da fase dispersa e do número de discos na fração retida da fase dispersa (“hold up”). Em seguida, a transferência da albumina de soro bovino da fase dispersa para a fase contínua foi estudada, analisando-se os mesmos parâmetros, ou seja, efeito da velocidade de rotação, da velocidade da fase dispersa e do número de discos no coeficiente de transferência de massa e no índice de recuperação. Estes parâmetros constituem fatores determinantes para a transferência da proteína e desempenho do equipamento para possível utilização em larga escala.

#### **5.4.1. CARACTERIZAÇÃO HIDRODINÂMICA DO EQUIPAMENTO**

Um parâmetro muito importante para a caracterização hidrodinâmica de um equipamento de extração consiste na fração retida de uma das fases, que está disponível para a transferência de massa dentro do equipamento, ou seja, o “hold up”. Neste trabalho, o “hold up” se refere a fração retida da fase rica em PEG. Significa portanto o percentual da fase rica em Policaju presente no equipamento capaz de extrair a albumina de soro bovino da fase rica em PEG. Tal medida consiste em uma informação valiosa para a estimativa da qualidade da transferência de massa de uma

unidade de extração sob condições pré-definidas (COIMBRA, 1995), já que o desempenho de uma unidade de extração em processo contínuo é altamente dependente da quantidade de solvente que está presente no equipamento para remover o soluto da alimentação.

O “hold up” é um parâmetro que depende do equipamento selecionado, das condições operacionais empregadas e das propriedades físicas das fases.

O “hold up” está diretamente relacionado com a quantidade de gotas existentes no interior da coluna, para uma dada condição operacional. A formação de gotas não é um processo simples e está diretamente ligada às condições de agitação, isto é, a velocidade de rotação imposta às fases no interior do equipamento (SOUZA, 1997).

#### **5.4.1.1. Efeito da velocidade de rotação na fração retida da fase dispersa (hold up)**

Nos últimos anos, novos tipos de equipamentos de extração têm sido desenvolvidos para se obter uma melhor flexibilidade operacional, entre as quais se destacam as colunas com elemento rotatório, já que nestes tipos de colunas de extração, o contato entre as duas fases depende primeiramente da velocidade de rotação. O ajuste desta variável independente pode atingir as condições mais favoráveis num processo de extração.

A influência da velocidade de rotação na fração retida da fase dispersa foi avaliada em PRDC através da operação em contínuo utilizando os seguintes valores de velocidade de rotação: 60, 140 e 220 rpm.

Os resultados obtidos (FIGURAS 43 e 44) mostram que há um aumento do “hold up” com o aumento da velocidade de rotação para a "tie-line" 1 (9%PEG4000-18%Policaju).

Estudos iniciais com o contador de discos rotativos (RDC) com sistemas ácido acético-água-metil isobutil cetona também demonstraram o aumento do “hold up” com o aumento da velocidade de rotação (VERMIJS & KRAMERS, 1954).

Os resultados obtidos por PORTO (1998) para extração de citocromo b5 com uma PRDC de mesmas dimensões com sistemas PEG-Sais de fosfato operando a velocidades de 35, 140 e 220 rpm demonstraram que para valores até 140 rpm houve um aumento na fração retida da fase

dispersa, contudo para valores acima desta velocidade ocorreu uma discreta diminuição no “hold up”.

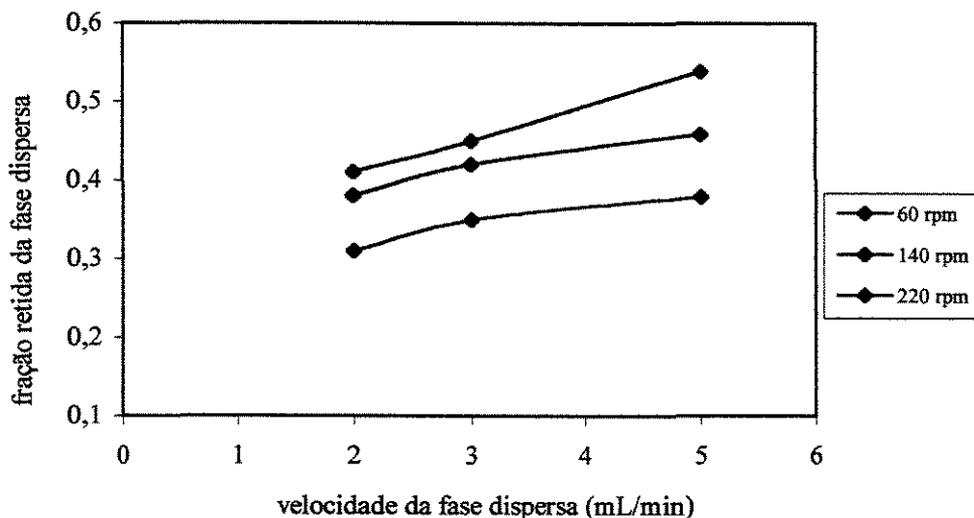


FIGURA 43- Efeito da velocidade de rotação e da velocidade da fase dispersa sobre a fração retida da fase dispersa em PRDC com 03 discos rotativos para o sistema 9%PEG4000-18%Policaju, pH 6,0

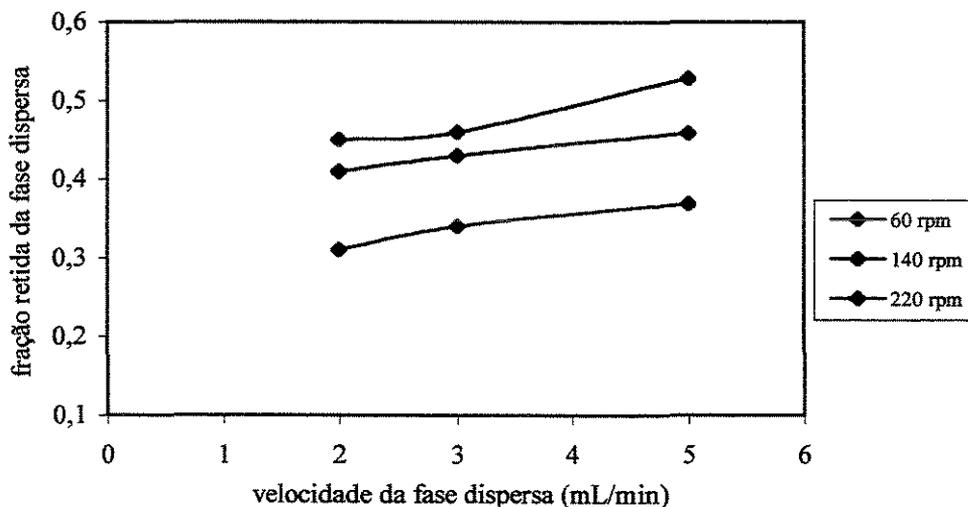


FIGURA 44- Efeito da velocidade de rotação e da velocidade da fase dispersa sobre a fração retida da fase dispersa em PRDC com 04 discos rotativos para o sistema 9%PEG4000-18%Policaju, pH 6,0

Para o extrator de palhetas rotativas utilizando o sistema ácido acético-água-butanol, observou-se um aumento na fração retida da fase dispersa com o aumento da velocidade de rotação de 1 rps a 4 rps (SOUZA, 1997).

Em processos de extração utilizando sistemas de duas fases aquosas PEG-Sais de fosfatos com extrator Graesser para a separação de proteínas do soro de queijo observou-se uma independência da fração retida da fase dispersa em relação a velocidade de rotação (COIMBRA et al., 1994).

Estudos realizados por CARNEIRO-da-CUNHA e colaboradores (1994) para extração de cutinase utilizando PRDC com sistemas micelares verificaram que elevados valores de velocidade de rotação (360 rpm) provocaram a formação de uma emulsão estável, não sendo possível obter a separação de fases.

Para a "tie-line" 2 (11%PEG4000-20%Policaju) não foi possível determinar a influência deste parâmetro sobre o "hold up" pois para as velocidades de 60 e 140 rpm ocorreu inundação do equipamento. Segundo REMAN (1951) as condições de inundação dependem das características físicas do sistema. Provavelmente, a viscosidade da fase Policaju para a "tie-line" 2 dificultou a mistura das fases assim como o baixo grau de agitação dos discos perfurados não possibilitou uma mistura adequada a fim de permitir a ascensão da fase dispersa através da fase contínua até o topo da coluna.

#### **5.4.1.2. Efeito da velocidade da fase dispersa na fração retida da fase dispersa (hold up) para diferentes composições do sistema bifásico PEG-Policaju**

O efeito da velocidade da fase dispersa foi investigado para valores de velocidade de 2,0, 3,0 e 5,0 mL/min, mantendo-se a velocidade da fase contínua constante a 1 mL/min. A fração retida da fase dispersa aumentou com o aumento da velocidade da fase dispersa e diminuiu com o aumento da composição do sistema (FIGURA 45).

KUMAR & HARTLAND (1982) relataram que o tamanho da gota diminui com o aumento da velocidade da fase dispersa, embora este aumento provoque o aumento do número de gotas, resultando num aumento dos valores da fração retida da fase dispersa. Efeitos similares

foram observados para a extração de albumina de soro bovino em colunas Spray (SAWANT et al., 1990; PAWAR et al., 1997; VENÂNCIO & TEIXEIRA, 1995) e em PRDC (PORTO et al., 1999).

O aumento do comprimento da "tie-line" de 9%PEG4000-18%Policaaju para 11%PEG4000-20%Policaaju levou a redução da fração retida da fase dispersa, embora tenha se observado um aumento na viscosidade da fase contínua (item 5.2.2). Resultados similares foram obtidos para a extração de albumina de soro bovino em colunas Spray com sistemas polímero-polímero como o sistema PEG-Dextrana (SAWANT et al., 1990) e PEG-Reppal PES (VENÂNCIO & TEIXEIRA, 1995), para extração de enzimas com sistemas PEG-Sais (PAWAR et al., 1997) e para a extração de citocromo b5 e albumina de soro bovino com sistemas PEG-Sais de fosfato em colunas PRDC semelhantes a estudada neste trabalho (PORTO et al., 1997; PORTO et al., 1999).

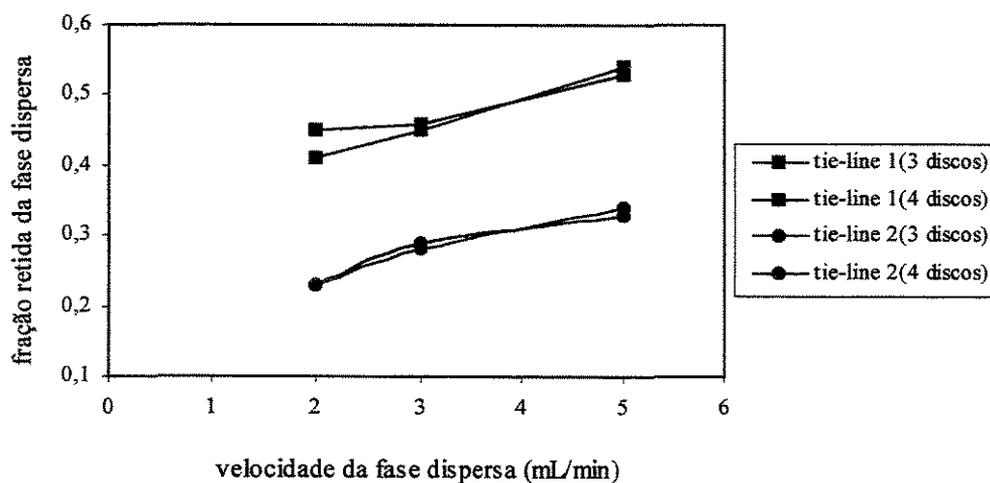


FIGURA 45- Efeito da velocidade da fase dispersa e do número de discos sobre a fração retida da fase dispersa em PRDC para velocidade de rotação de 220 rpm para os sistemas 9%PEG4000-18%Policaaju e 11%PEG4000-20%Policaaju, pH 6,0

Segundo CLIFT e colaboradores (1978), a medida em que se aumenta a concentração do sistema, ocorre um aumento da tensão interfacial e como resultado, o diâmetro da gota aumenta,

assim como aumenta a diferença de densidade e viscosidade. O efeito combinado destas propriedades é que o tamanho médio das gotas e a velocidade da gota aumentem e a fração retida da fase dispersa diminua. Com o aumento da velocidade com que a gota sobe o tempo de residência da gota do PEG diminui, reduzindo a fração retida da fase dispersa (RAGHAV-RAO et al., 1991).

Os valores da fração retida da fase dispersa obtidos para o sistema PEG-Policaju em PRDC foram similares aos obtidos para os sistemas PEG-Sais na mesma coluna (PORTO et al., 1999) e em uma coluna Spray modificada para a obtenção de valores mais elevados de "hold up" (PAWAR et al., 1997) e muito superiores aos descritos para colunas Spray utilizando SBA polímero-polímero (SAWANT et al., 1990; VENÂNCIO & TEIXEIRA, 1995).

#### **5.4.1.3. Efeito do número de discos na fração retida da fase dispersa (hold up) para diferentes composições do sistema bifásico PEG-Policaju**

A influência do número de discos sobre a fração retida da fase dispersa foi investigada para 03 e 04 discos perfurados rotativos. Não houve uma variação significativa da fração retida da fase dispersa com o número de discos para os dois comprimentos da "tie-line" (9%PEG4000-18%Policaju e 11%PEG4000-20%Policaju) estudados, sendo os valores bastante semelhantes (FIGURA 45).

Não foi possível determinar a fração retida da fase dispersa para 07 discos rotativos devido a inundação da coluna, provavelmente devido ao elevado número de discos que representou um obstáculo à ascensão da fase dispersa.

#### **5.4.2. TRANSFERÊNCIA DE MASSA**

O estudo da transferência de massa no interior de colunas de extração líquido-líquido é de fundamental importância para o conhecimento dos seus limites de operação. Em PRDC este estudo foi realizado para os mesmos parâmetros avaliados para a fração retida da fase dispersa, ou

seja, valores de velocidade de rotação, velocidade da fase dispersa, composição do sistema e número de discos. A influência de cada parâmetro sobre a transferência da proteína e sobre a eficiência de extração, expressa como índice de recuperação de KAWASE (1990), foi avaliada individualmente, mantendo-se constante as demais variáveis.

#### **5.4.2.1. Efeito da velocidade de rotação no coeficiente de transferência de massa (Kda)**

Quando duas fases imiscíveis estão em contato na extração em contra-corrente, o tamanho e a quantidade de gotas que surgem na zona de contato são governadas principalmente pela velocidade do rotor. Uma baixa velocidade resulta em grandes gotas, proporcionando pequenas áreas interfaciais e baixas transferência de massa. Uma alta velocidade de rotação permite a formação de pequenas gotas esféricas, levando altas taxas de transferência de massa devido ao aumento da área interfacial (STRAND et al., 1962).

Na FIGURA 46 pode-se observar o aumento do coeficiente de transferência de massa com o aumento da velocidade de rotação, sendo este aumento mais evidenciado entre 140 e 220 rpm. O aumento da velocidade de rotação melhora a mistura entre as fases e aumenta a área interfacial por diminuir o tamanho médio das gotas, promovendo com isso o aumento na taxa de transferência de massa, que é diretamente proporcional a área interfacial.

Os resultados obtidos por PORTO e colaboradores (1997) para extração de citocromo b5 em PRDC de mesmas dimensões com sistemas PEG-Sais de fosfato demonstraram que o coeficiente de transferência de massa foi independente da velocidade de rotação.

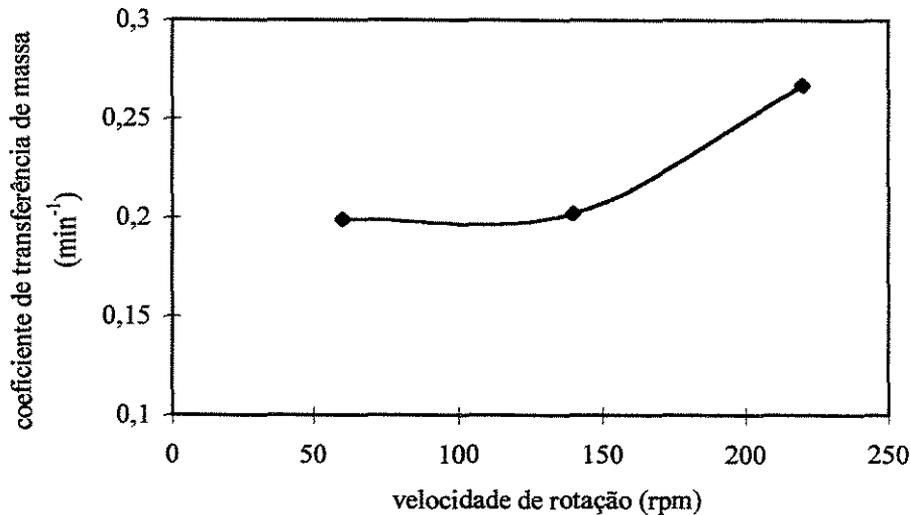


FIGURA 46- Efeito da velocidade de rotação no coeficiente de transferência de massa de albumina de soro bovino em PRDC com sistema 9%PEG4000-18%Policaaju, pH 6,0

#### 5.4.2.2. Efeito da velocidade da fase dispersa no coeficiente de transferência de massa (Kda)

O efeito da velocidade da fase dispersa no coeficiente de transferência de massa está ilustrado na FIGURA 47. Os resultados obtidos demonstraram um aumento do coeficiente de transferência de massa com a velocidade da fase dispersa.

Resultados obtidos em coluna Spray por vários autores (JAFARABAD et al., 1992 a e b; RAGHAV-RAO et al., 1991; PAWAR et al., 1997; VENÂNCIO & TEIXEIRA, 1995) com SBA também demonstraram um aumento do coeficiente de transferência de massa com o aumento da velocidade da fase dispersa, já que o tamanho das gotas a altas velocidades é menor e produz altas áreas de transferência de massa. Pelo contrário, os resultados obtidos em coluna PRDC com sistemas PEG-Sais de fosfato demonstraram uma independência do coeficiente de transferência de massa com a velocidade da fase dispersa (PORTO et al., 1999).

Estudos realizados por SAWANT e colaboradores (1990) para a extração de albumina de soro bovino com sistemas PEG-Dextrana em coluna Spray demonstraram um aumento do coeficiente de transferência de massa com o aumento da velocidade da fase dispersa. A construção do gráfico da taxa de transferência de massa por unidade de “hold up” versus a velocidade da fase

dispersa, no entanto, demonstrou que esta taxa apresentou-se independente da velocidade da fase dispersa, indicando a independência do verdadeiro coeficiente de transferência de massa com este parâmetro.

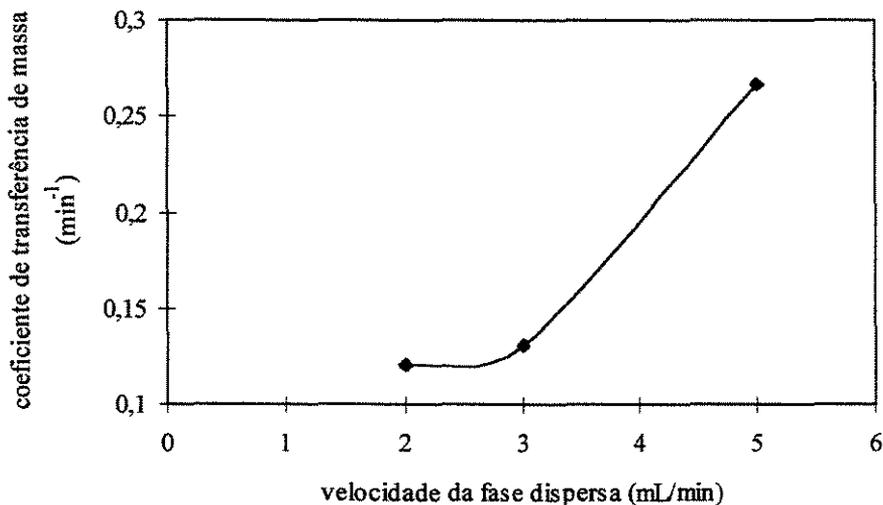


FIGURA 47- Efeito da velocidade da fase dispersa no coeficiente de transferência de massa de albumina de soro bovino em PRDC com sistema 9%PEG4000-18%Policaju, pH6,0

#### 5.4.2.3. Efeito da composição do sistema no coeficiente de transferência de massa (Kda)

O efeito da composição do sistema no coeficiente de transferência de massa foi avaliado para dois comprimentos de "tie-line" para o sistema PEG4000-Policaju, pH 6,0. Os resultados obtidos demonstraram um coeficiente de transferência de massa de  $0,267 \text{ min}^{-1}$  para a "tie-line" 1 (9%PEG4000-18%Policaju) e de  $0,239 \text{ min}^{-1}$  para a "tie-line" 2 (11%PEG4000-20%Policaju), ou seja, o coeficiente de transferência de massa diminuiu com o aumento do comprimento da "tie-line". Resultados similares foram obtidos para a extração de albumina de soro bovino com o sistema PEG-Reppal PES (VENÂNCIO et al., 1995) em coluna Spray e PEG-Sais em coluna PRDC (PORTO et al., 1999) e Spray (JAFARABAD et al., 1992 a).

De acordo com FORCINITI e colaboradores (1990), a tensão interfacial aumenta com o aumento da concentração do polímero e o efeito total do aumento da viscosidade das fases resulta

na redução da difusibilidade da proteína e no aumento da espessura da camada limite entre as fases comprometendo a transferência de massa. Como consequência, o coeficiente de transferência de massa é menor para "tie-lines" maiores.

Estudos realizados por RAGHAV-RAO e colaboradores (1991) para a extração de albumina de soro bovino em sistema PEG-Maltodextrina com coluna Spray demonstraram que sistemas que apresentavam maiores valores de viscosidade apresentavam menores valores de coeficiente de transferência de massa.

Os valores obtidos para o coeficiente de transferência de massa para a PRDC com o sistema PEG-Policaju foram semelhantes aos encontrados para sistemas PEG-Sais de fosfato para a mesma coluna (PORTO, 1998) e superiores aos encontrados na literatura para colunas Spray e York-Scheibel (JAFARABAD et al., 1992a e b; PAWAR et al., 1997; SAWANT et al., 1990; VENÂNCIO & TEIXEIRA, 1995).

#### **5.4.2.4. Efeito da velocidade de rotação no Índice de Recuperação**

Analisando-se a FIGURA 48, observa-se que o índice de recuperação da albumina de soro bovino foi praticamente o mesmo para as velocidades de 60 e 140 rpm, aumentando um pouco mais para a velocidade de 220 rpm.

COIMBRA (1991) realizou um estudo da eficiência de extração em PRDC na purificação de ácido láctico. O sistema utilizado foi ácido láctico-água-álcool isoamílico. A autora observou um aumento do índice de recuperação do soluto com a velocidade de rotação.

Para o extrator de palhetas rotativas utilizando o sistema ácido acético-água-butanol estudado por RABELO (1995), o aumento da velocidade de rotação das palhetas também provocou o aumento do índice de recuperação de KAWASE (1990).

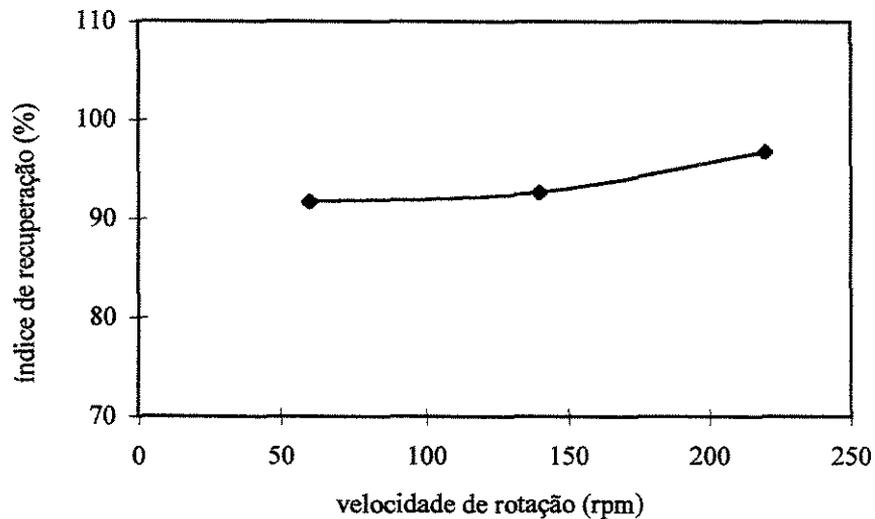


FIGURA 48- Efeito da velocidade de rotação no índice de recuperação de albumina de soro bovino em PRDC com sistema 9%PEG4000-18%Policaju, pH6,0

#### 5.4.2.5. Efeito da velocidade da fase dispersa no Índice de Recuperação

A FIGURA 49 mostra o efeito da velocidade da fase dispersa no índice de recuperação da albumina de soro bovino. Pode-se observar que o índice de recuperação foi bastante elevado para as condições testadas e não mostrou tendência regular com o aumento da velocidade da fase dispersa.

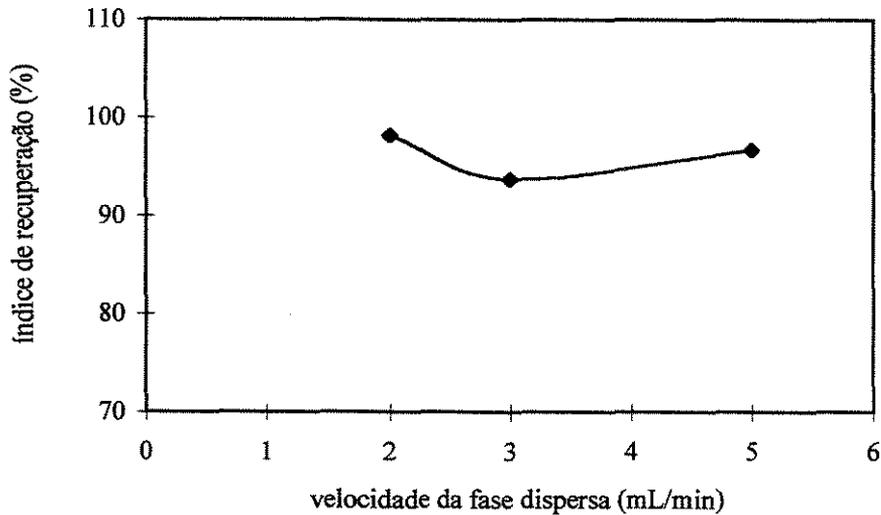


FIGURA 49- Efeito da velocidade da fase dispersa no índice de recuperação de albumina de soro bovino em PRDC com sistema 9%PEG4000-18%Policaju, pH6,0

#### 5.4.2.6. Efeito da composição do sistema no Índice de Recuperação

O efeito da composição do sistema no índice de recuperação da albumina de soro bovino foi avaliado para dois comprimentos de "tie-line" para o sistema PEG4000-Policaju, pH 6,0. Os resultados obtidos demonstraram índices de recuperação bastante semelhantes, 96,7% para a "tie-line" 1 (9%PEG4000-18%Policaju) e de 95,7% para a "tie-line" 2 (11%PEG4000-20%Policaju).

#### 5.4.2.7. Efeito do número de discos no coeficiente de transferência de massa (Kda) e no Índice de Recuperação

O coeficiente de transferência de massa e o índice de recuperação da albumina de soro bovino em PRDC foi maior para 03 discos perfurados rotativos ( $0,267 \text{ min}^{-1}$  e 96,7%) do que para 04 discos ( $0,235 \text{ min}^{-1}$  e 94,5%). Seria de se esperar que um maior grau de agitação permitisse maiores taxas de dispersão das fases e maior área interfacial para a transferência de massa.

TAMBOURGI & PEREIRA (1993) estudando PRDC com sistema ácido acético-água-butanol obtiveram uma maior eficiência de separação para 07 discos do que para 05 discos.

Provavelmente, o aumento do número de discos tenha constituído um obstáculo, ou seja, um aumento na resistência imposta ao escoamento, retardando a ascensão da fase dispersa até o topo da coluna, prejudicando a transferência de massa e conseqüentemente a recuperação da proteína.

### **5.4.3. PERFIL DO COMPORTAMENTO DA TRANSFERÊNCIA DE MASSA EM EXTRAÇÃO CONTÍNUA UTILIZANDO COLUNA DE DISCOS PERFURADOS ROTATIVOS**

Nesta seção estão resumidas todas as condições operacionais e geométricas estudadas para a transferência de massa com o sistema selecionado PEG4000-Policaju, pH 6,0. Para facilitar a compreensão dos resultados, cada operação de transferência de proteína para as diferentes variáveis geométricas e operacionais foi designada como “corrida”. Ao total, foram realizadas 7 corridas para otimização dos resultados.

As FIGURAS 50-56 apresentam o perfil da extração contínua da albumina de soro bovino em PRDC. Pode-se verificar um aumento da quantidade de proteína transferida a partir dos primeiros 10 minutos da fase rica em PEG (refinado) para a fase rica em Policaju (extrato) até o final da extração, após 55 minutos de operação e conseqüente diminuição na fase rica em PEG para todas as corridas realizadas. Embora para todas as corridas os resultados para o índice de recuperação da albumina tenham sido superiores a 90%, a maior transferência foi obtida para a corrida 5 (FIGURA 54), ou seja, para o sistema 9%PEG4000-18%Policaju em PRDC com 03 discos rotativos a velocidade de 220 rpm e velocidade da fase dispersa de 2 mL/min, onde se obteve 98,2 % de recuperação da albumina.

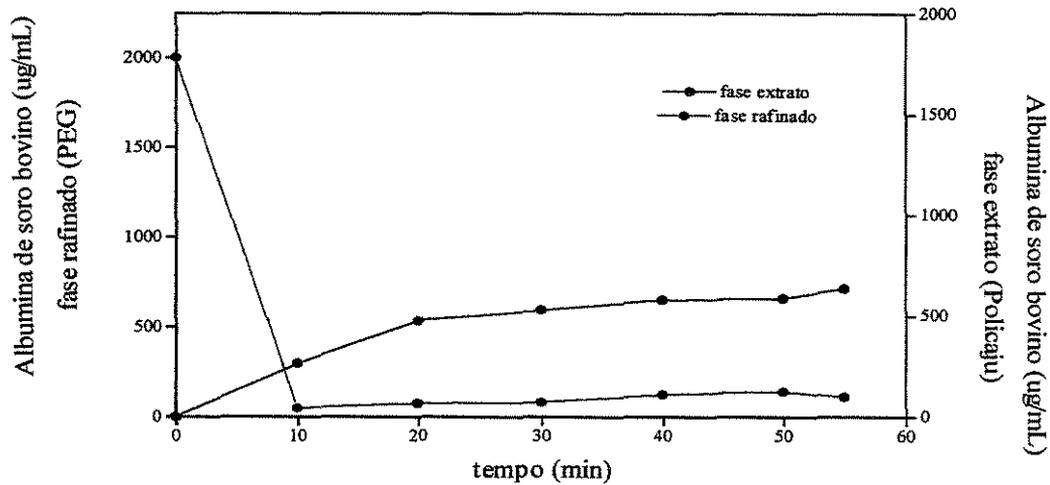


FIGURA 50- Transferência de albumina da fase rica em PEG (refinado) para a fase rica em Policaaju (extrato) - sistema 9%PEG4000-18%Policaaju em PRDC com 04 discos rotativos a velocidade de rotação de 220 rpm e velocidade da fase dispersa de 5 mL/min (corrida 1)

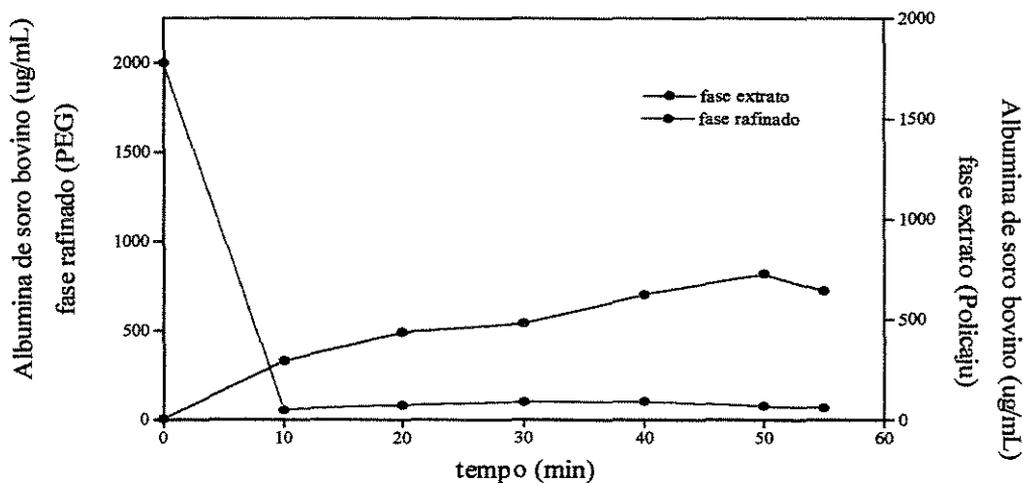


FIGURA 51- Transferência de albumina da fase rica em PEG (refinado) para a fase rica em Policaaju (extrato) - sistema 9%PEG4000-18%Policaaju em PRDC com 03 discos rotativos a velocidade de rotação de 220 rpm e velocidade da fase dispersa de 5 mL/min (corrida 2)

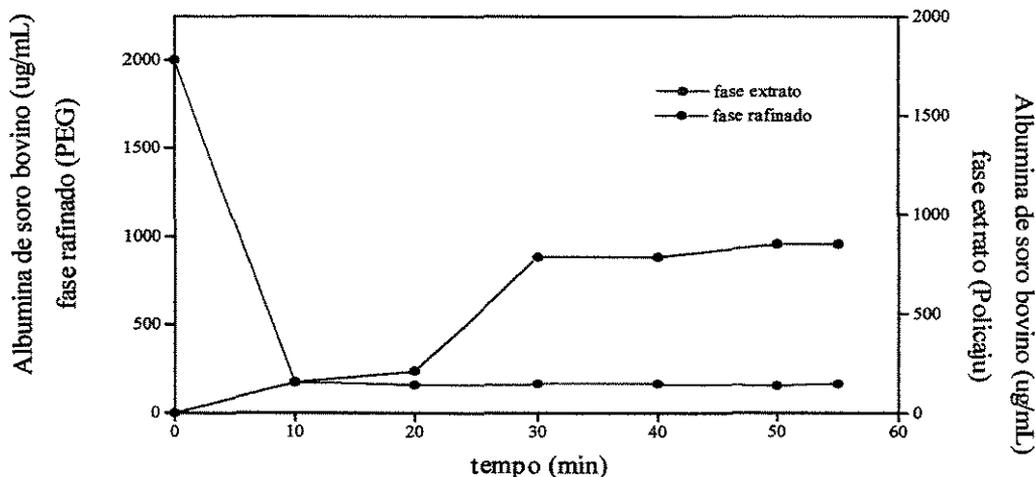


FIGURA 52- Transferência de albumina da fase rica em PEG (refinado) para a fase rica em Policaju (extrato) - sistema 9%PEG4000-18%Policaju em PRDC com 03 discos rotativos a velocidade de rotação de 60 rpm e velocidade da fase dispersa de 5 mL/min (corrida 3)

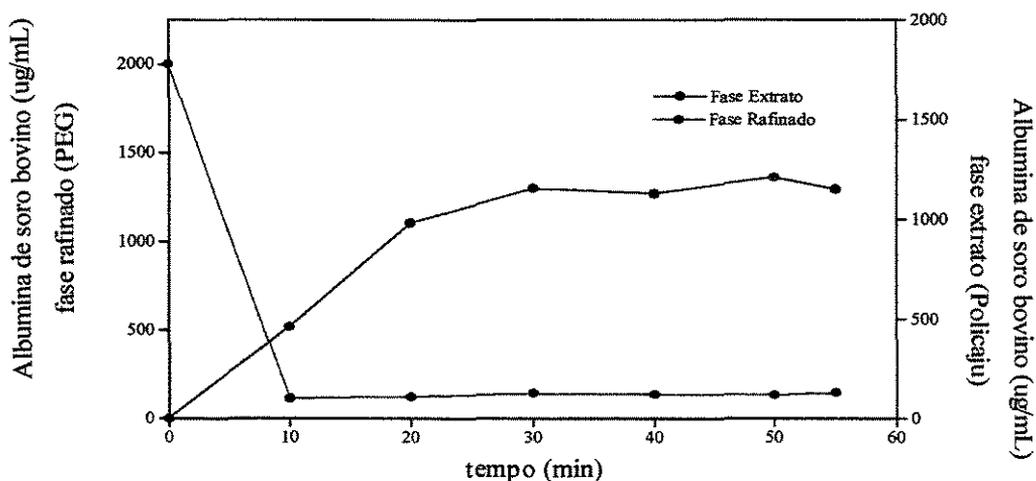


FIGURA 53- Transferência de albumina da fase rica em PEG (refinado) para a fase rica em Policaju (extrato) - sistema 9%PEG4000-18%Policaju em PRDC com 03 discos rotativos a velocidade de rotação de 140 rpm e velocidade da fase dispersa de 5 mL/min (corrida 4)

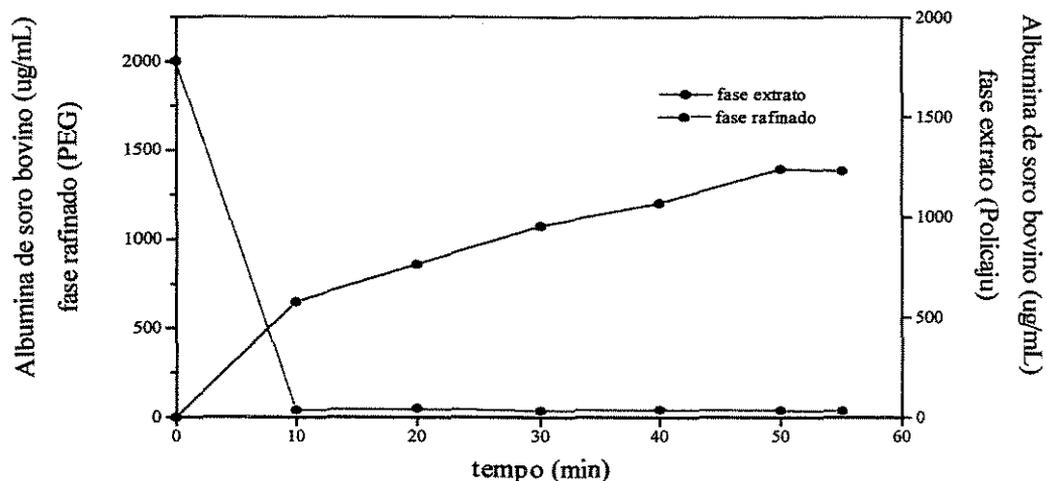


FIGURA 54- Transferência de albumina da fase rica em PEG (refinado) para a fase rica em Policaaju (extrato) - sistema 9%PEG4000-18%Policaaju em PRDC com 03 discos rotativos a velocidade de rotação de 220 rpm e velocidade da fase dispersa de 2 mL/min (corrida 5)

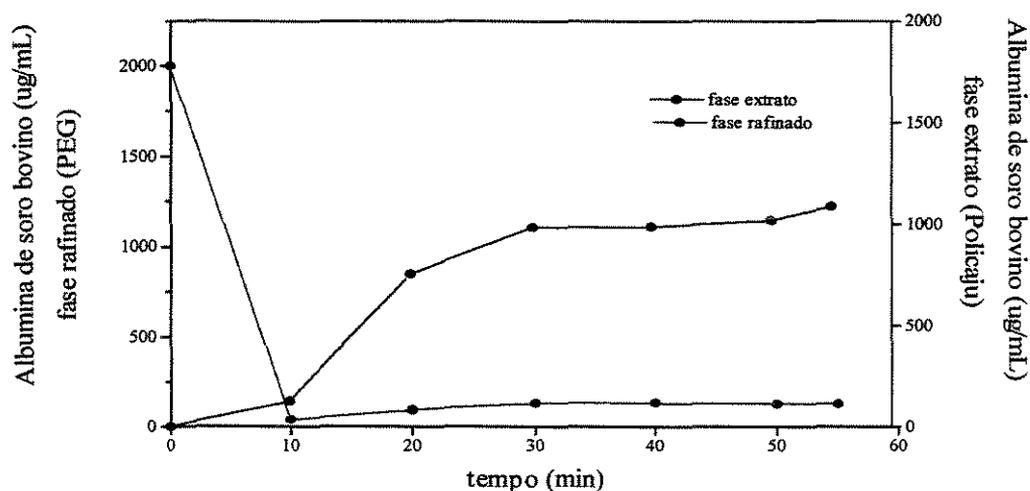


FIGURA 55- Transferência de albumina da fase rica em PEG (refinado) para a fase rica em Policaaju (extrato) - sistema 9%PEG4000-18%Policaaju em PRDC com 03 discos rotativos a velocidade de rotação de 220 rpm e velocidade da fase dispersa de 3 mL/min (corrida 6)

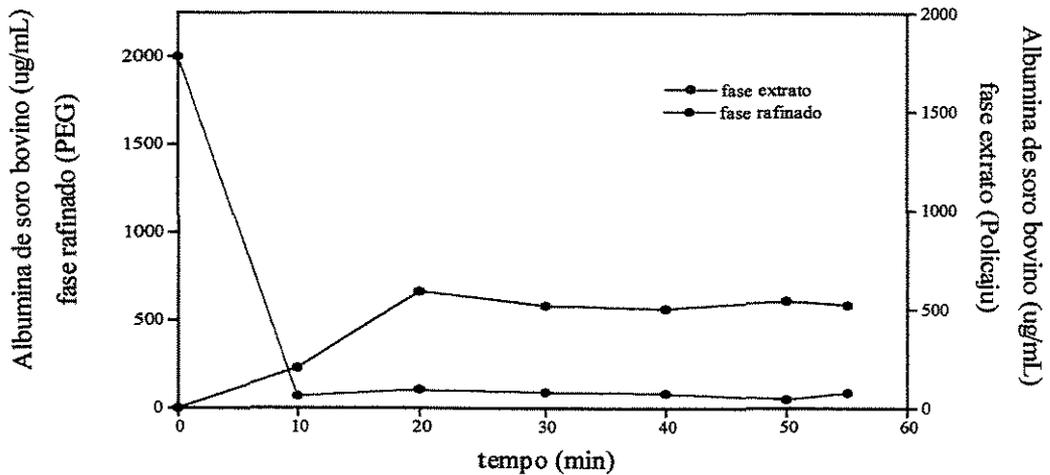


FIGURA 56- Transferência de albumina da fase rica em PEG (refinado) para a fase rica em Policaaju (extrato) - sistema 11%PEG4000-20%Policaaju em PRDC com 03 discos rotativos a velocidade de rotação de 220 rpm e velocidade da fase dispersa de 5 mL/min (corrida 7)

## 5.5. ANÁLISE ECONÔMICA DO SISTEMA

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

O consumo de reagentes químicos pode tornar-se o fator determinante no impacto econômico de processos em grande escala, pois enquanto os custos com equipamentos aumentam numa potência de 0,6 com o aumento da escala, o consumo de reagentes aumenta linearmente (PAPAMICHAEL & HUSTEDT, 1994). Segundo DATAR, (1986), o custo dos reagentes pode chegar a representar até 74% do custo total da produção. Por estes fatos, torna-se fundamental reduzir substancialmente os custos dos reagentes químicos, quer pelo recurso a novos reagentes, quer pela implementação de técnicas de recirculação dos mesmos.

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

TABELA 25- Preço por quilograma de polímeros empregadas para a formação de SBA

Polímero	Preço (\$/Kg)	Referência
Dextrana T500	500,00	Sigma Chemical Co., EUA
Dextrana bruta	58,00	Sigma Chemical Co., EUA
Policaju	9,00	EMPRAPA, Brasil
Hidroxipropilcelulose (Kluce L)	13,00	Aqualon, EUA
Arabinogalactana	65,00	Larex Inc., EUA
Hidroxipropilamido (Reppal PES)	20,00	Reppal PES, Reppe Glyckos AB, Suécia
Hidroxipropilamido (Aquaphase PPT)	21,00	Perstorp AB, Suécia
Maltodextrina	0,98-2,40	SZLAG & GIULIANO, 1988

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

A TABELA 25 apresenta o custo de 1Kg de alguns polímeros empregues em SBA e a TABELA 26 apresenta a comparação dos custos de 1Kg de alguns SBA usados ao longo dos anos. Estes custos foram determinados para uma composição média (apresentada na mesma TABELA) obtida a partir das composições empregues por diferentes autores para cada caso. Para o cálculo dos custos dos reagentes, os mesmos foram obtidos a partir de empresas que comercializam tais produtos ou a partir das referências bibliográficas para cada sistema. Para se obter uma comparação mais precisa, os cálculos foram realizados para preços fixos de Polietileno glicol (PEG), obtidos pela Sigma Chemical Co., EUA.

Pode-se observar que o custo do Policaju é bastante competitivo, apresentando um preço compatível com os demais polímeros avaliados, especialmente com os derivados do amido (TABELA 25). O novo sistema caracterizado também apresenta um custo viável frente aos demais sistemas estudados na literatura (TABELA 26).

TABELA 26- Custo associado a um quilograma de diferentes SBA

Sistema	Custo (\$/Kg)	Referência
5%PEG8000-7%Dextrana T500	36,63	ALBERTSSON, 1986
5%PEG8000-7%Dextrana bruta	5,7	KRONER et al., 1982
9%PEG4000-18% Policaju	4,2	-----
9%PEG8000-16% Policaju	4,3	-----
4% Hidroxipropilcelulose (Kluce L)-10% PEG-PPG(propileno glicol)Pluronic P105	4,0	SKUSE et al., 1992
5%PEG8000-16%Arabinogalactana	12,0	CHRISTIAN et al., 1998
4%PEG8000-14%Hidroxipropilamido (Reppal PES)	4,1	JOHANSSON & JOELSSON, 1985
4%PEG8000-14%Hidroxipropilamido (Aquaphase PPT)	4,24	TJERNELD et al., 1986
4%PEG8000-22%Maltodextrina	1,52-1,84	SZLAG & GIULIANO, 1988

Assim, demonstrou-se que o polissacarídeo do cajueiro (Policaju) tem potencial como uma alternativa a Dextrana fracionada e outros polímeros empregues em SBA. Além de ser de fácil obtenção e baixo custo, o sistema PEG-Policaju proposto apresentou boa aplicabilidade em processos de separação, possibilitando o desenvolvimento de estudos futuros para aplicações em larga escala.

## 5.6. PERSPECTIVAS PARA OS SISTEMAS BIFÁSICOS AQUOSOS

Os sistemas bifásicos aquosos constituem um ambiente singular altamente suave para estruturas protéicas e oferecem uma poderosa tecnologia de separação. O rápido desenvolvimento dos estudos demonstram que, num futuro breve, partições com sistemas bifásicos aquosos poderão ser calculadas para um grande leque de condições. O desenvolvimento de um modelo termodinâmico para a partição de proteínas, no entanto, torna-se mais difícil devido aos inúmeros parâmetros de equilíbrio existentes. Os processos poderão ser otimizados, podendo-se prever o comportamento da partição de diferentes estruturas biológicas. Este objetivo não parece estar distante, havendo necessidade, porém, do empenho científico dentro desta área. Até que se alcance este objetivo, teremos que se basear em regras semi-empíricas e modelos experimentais para estes processos de purificação (ANDREWS et al., 1999).

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

como tecnologia de separação nos estágios iniciais, especialmente no que se refere a escala de operação, economia de tempo, níveis de purificação dos produtos e operação em contínuo. Ainda, tem a capacidade de ser facilmente integrada a outras tecnologias de separação, caso necessário (ANDREWS *et al.*, 1999; ASENJO, 1990).

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

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados experimentais obtidos permitiram as seguintes conclusões:

- Nos estudos para a determinação dos diagramas de fases do sistema PEG-Policaju observou-se um deslocamento da binodal no sentido de menores concentrações de polímeros para a formação de fases com o aumento do peso molecular do PEG. Por outro lado, não houve um deslocamento significativo da binodal com a variação do pH e da temperatura.
- O estudo das propriedades físicas do sistema PEG-Policaju demonstraram que os tempos de separação das fases foram bastante curtos, tornando o novo sistema bastante atrativo para aplicações em larga escala. As densidades e viscosidades dos sistemas foram comparáveis às de outros sistemas polímero-polímero descritos na literatura.
- Para os estudos de partição em batelada utilizando a albumina de soro bovino não foi possível estabelecer uma correlação entre o coeficiente de partição da proteína e o peso molecular do PEG, enquanto que o aumento do comprimento da "tie-line", assim como a diminuição do pH, provocou a redução no coeficiente de partição. Os resultados obtidos para a adição de NaCl demonstraram uma tendência a redução do coeficiente de partição com o aumento da concentração do sal, embora em alguns casos o coeficiente de partição tenha diminuído apenas para uma dada concentração do sal, dependendo do sistema estudado e do pH. O aumento da temperatura demonstrou uma tendência a redução no coeficiente de partição para os sistemas testados.
- Os estudos de extração contínua com coluna de discos perfurados rotativos utilizando o sistema PEG4000-Policaju selecionado a partir dos estudos em batelada demonstraram um aumento da fração retida da fase dispersa, do coeficiente de transferência de massa e do índice de recuperação com o aumento da velocidade de rotação. Os mesmos efeitos foram observados para o aumento da velocidade da fase dispersa, com exceção sobre o índice de recuperação, o qual não apresentou uma tendência regular com o aumento da velocidade da

fase dispersa. O aumento da composição do sistema reduziu o “hold up” e a transferência de massa, embora não tenha demonstrado um efeito significativo sobre o índice de recuperação. A variação do número de discos não teve um efeito pronunciado sobre a fração retida da fase dispersa, embora o coeficiente de transferência de massa e o índice de recuperação tenham sido maiores para 03 discos do que para 04. A análise do perfil de extração contínua da albumina de soro bovino demonstrou que a maior transferência de proteína foi obtida para o sistema 9%PEG4000-18%Policaju para 03 discos rotativos a velocidade de 220 rpm e velocidade da fase dispersa de 2 mL/min.

- A análise econômica demonstrou que o Policaju tem grande potencial como um polímero alternativo a Dextrana fracionada e que o novo sistema é competitivo com outros sistemas polímero-polímero descritos na literatura.

## 7. SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS

Uma vez que é difícil a obtenção de um trabalho totalmente completo, torna-se importante a apresentação de algumas sugestões que possam contribuir para aprofundar a caracterização do novo sistema, o conhecimento das variáveis envolvidas na partição de biomoléculas e um melhor esclarecimento da hidrodinâmica da coluna de discos perfurados rotativos com sistemas bifásicos aquosos, e em especial, com o sistema PEG-Policaju. Assim, como continuação do trabalho efetuado, propõe-se:

- Realizar estudos para modificação estrutural do polímero, como a utilização de ligantes específicos;
- Estudar a adição de diferentes sais para redução da viscosidade da fase Policaju e consequente variação do coeficiente de partição;
- Estudar a partição de outros bioprodutos no sistema caracterizado;
- Avaliar novas variáveis operacionais e geométricas de modo a expandir o conhecimento do extrator;
- Estudar o mecanismo de formação de gotas dentro do extrator, já que a transferência de massa ocorre entre as gotas da fase dispersa e contínua e sabe-se que o comportamento das gotas é de fundamental importância na transferência de massa;
- Desenvolver estudos sobre a reciclagem dos reagentes neste tipo de extrator a fim de se obter uma aplicação mais econômica;
- Estudar formas de recuperação dos produtos de interesse separados pelo sistema.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTSSON, P-A. **Partition of cell particles and macromolecules**. New York, Wiley, 3 ed, 1986.
- ALBERTSSON, P-A . JOHANSSON, G., TJERNELD, F. Aqueous two-phase separation. In: ANSENJO, J. A. (ed), **Separation Process in Biotechnology**, New York; Marcel dekker, p. 287-326, 1990.
- ALMEIDA, M.C., VENÂNCIO, A., TELXEIRA, J.A., AIRES-BARROS, M. R. Cutinase purification on poly(ethylene glycol)-hydroxypropil starch aqueous two-phase systems, **Journal of Chromatography B**, v. 711, p. 151-159, 1998.
- ALRED, P. **Biomolecule purification using temperature-induced phase separation and affinity partitioning**. Lund, 1993. Tese de Doutorado Universidade de Lund, Suécia, 1993.
- ALSOP, R. M. Industrial production of dextrans. **Progress Industrial Microbial**, v.18, p.1-44, 1983.
- ALVES, J. G. L. F., CHUMPITAZ, L. D .A., SILVA, L. D. A., L. H. M. da, FRANCO, T. T., MEIRELLES, A. J. A. Partitioning of whey proteins, bovine serum albumin and insulin in aqueous two-phase systems. **11<sup>th</sup> International Conference on Partitioning in Aqueous Two-phase Systems**, Gulf Shores, Alabama, USA, June27-july 2, 1999.
- ANDERSON, D. M. W.; BELL, P. C.; MILLAR, J. R. A. Composition of gum exudatos from *Anacardium occidentale*. **Phytochemistry**, v.13, p. 2189-2193, 1974.
- ANDERSON, D. M. W.; BELL, P. C. Structural analysis of the gum polysaccharide from *Anacardium occidentale*, **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 79, p. 185-197, 1975.

- ANDREWS, B. A., HUENUPI, E., ASENJO, J. A. Industrial prospects of aqueous two-phase processes. **11<sup>th</sup> International Conference on Partitioning in Aqueous Two-phase Systems**, Gulf Shores, Alabama, USA, June 27-july 2, 1999.
- ASENJO, J. A . The rational design of large scale protein separation processes. **Separations for Biotechnology**, v. 2, p. 519-528, 1990.
- ASPINNAL, G. O. Gums and mucilages. In: WOLFROM, M. L., TIPSON, R. S. (eds), **Advances in Carbohydrate Chemistry**, New York; Academic Press, v. 24, p. 333-379, 1969.
- ATHA, D. H., INGHAM, K.C. Mechanism of precipitation of proteins by polyethylene glycols. Analyses in terms of excluded volume. **Journal of Biological Chemistry**, v. 256, p. 12108-12117, 1981.
- BASKIR, J. N., HATTON, T. A., SUTER, U. W. Protein partitioning in two-phase aqueous polymer systems, **Biotechnology and Bioengineering**, v. 34, p. 541-558, 1989.
- BOLAND, J. M. Extraction of proteins from animal tissue using multiphase aqueous systems. **Bioseparation**, v. 1, p. 293-304, 1990.
- BOLAND M. J.; HESSELINK P. G. M.; PAPAMICHAEL, N.; HUSTEDT, H. Extractive purification of enzymes from animal using aqueous two-phase systems: Pilot scale studies. **Journal of Biotechnology**, v. 19, p. 19-34, 1991.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, vol. 72, p. 248-254, 1976.

- BUITELAAR, R. M., LEENEM, E. J. T. M., TRAMPER, J. Growth and secondary metabolite production by hairy roots of *Tagetes patula* in aqueous two-phase systems. **Biocatalysis**, v. 06, p. 73-80, 1992.
- CABRAL, J. M. S., AIRES-BARROS, M.R. Liquid-liquid extraction of biomolecules using aqueous two-phase systems. In: JOHN WILEY & SONS Ltd (eds), **Recovery process for biological materials**, New York; p. 273-301, 1993.
- CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G., AIRES-BARROS, M. R., E.B. TAMBOURGI, J. M. S. CABRAL. Recovery of a recombinant cutinase with reversed micelles in a continuous perforated rotating disc contactor. **Biotechnology Techniques**, v. 8, p. 413-418, 1994.
- CASCONE, O., ANDREWS, B. A., ANSEJO, J. A. Partitioning and purification of thaumatin in aqueous two-phase systems. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 13, p. 629-635, 1991.
- CHRISTIAN, T. J. MANLEY-HARRIS, M., RICHARDS, G, N. A preliminary study of the use of larch arabinogalactan in aqueous two-phase systems, **Carbohydrate Polymers**, v. 35, p. 7-12, 1998.
- CLIFT, R., GRACE, J. R., WEBER, M. E. **Bubbles, drops and particles**. New York, Academic Press, 1978.
- COIMBRA, J. R. **Análise da eficiência de extração em colunas de discos perfurados rotativos na purificação de ácido láctico**. Campinas, 1991. Tese de Mestrado em Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas-SP, 1991.
- COIMBRA, J. R. **Desempenho de um extrator tipo Graesser na separação de proteínas do soro de queijo usando sistemas aquosos bifásicos**. Campinas, 1995, 129p. Tese de

- Doutorado em Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas-SP, 1995.
- COIMBRA, J. R., THOMMES, J., KULA, M-R. Continuous separation of whey proteins with aqueous two-phase systems in a Graesser contactor. **Journal of Chromatography A**, v. 668, p. 85-94, 1994.
- COIMBRA, J. R., THOMMES, J., MEIRELLES, A.J., KULA, M-R. Performance of a Graesser contactor in the continuous extraction of whey proteins: mixing, mass transfer and efficiency. **Bioseparation**, v. 5, p. 259-268, 1995.
- CUSACK, R. W., FREMEAUX, P., GLATZ, D. Though basically simple, the technique has a surprise wide range of useful variation. **Chemical Engineering**, p. 66-76, 1991.
- DATAR, R. Economics of primary separation steps in relation to fermentation and genetic engineering. **Process Biochemistry**, v. 21, p. 19-26, 1986.
- DIAMOND, A. D., HSU, J. T. Fundamental studies of biomolecules partitioning in aqueous two-phase systems, **Biotechnology and Bioengineering**, v. 34, p. 1000-1014, 1989.
- DIAMOND, A. D., HSU, J. T. Aqueous two phase systems for biomolecule separation. **Advances in Biochemistry Engineering**, v. 47, p. 89-135, 1992.
- EITMAN, M. A. Prediction partition coefficients of multi-charged solutes in aqueous two-phase systems, **Journal of Chromatography** , v. 668, p. 21-30, 1994.
- EITMAN, M. A., GAINER, J. L. Peptide hydrophobicity and partitioning in polyethylene glycol-magnesium sulfate aqueous two-phase systems. **Biotechnology Progress**, v. 06, p. 279-296, 1990.

- EITMAN, M. A., GAINER, J. L. A correlation for predicting partition coefficients in aqueous two-phase systems, **Separation Science and Technology**, v. 27, p. 325-339, 1992.
- FARKAS, T., STALBRAND, H., TJERNELD, F. Partitioning of  $\beta$ -mannanase and  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus niger* in Ucon/Reppal aqueous two-phase systems and using temperature-induced phase separation, **Bioseparation**, v.6, p. 147-157, 1996.
- FLORY, P. J. **J. Chem. Phys.**, v. 9, p. 660, 1941.
- FLORY, P. J. **Principles of polymer Chemistry**, cap. 13, Cornell University Press, New York, 1953.
- FORCINITI, D., HALL, C. K., KULA, M-R. Interfacial tension of polyethylene glycol-dextran-water systems: influence of temperature and polymer molecular weight, **Journal of Biotechnology**, v.16, p. 279-296, 1990.
- FORCINITI, D., HALL, C. K., KULA, M-R. Temperature dependence of the partition coefficient of proteins in aqueous two-phase systems, **Bioseparation**, v. 2, p. 115-128, 1991.
- FORCINITI, D., HALL, C. K., KULA, M-R. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 26, p. 986-994, 1992.
- FRANCO, T. T. **Use of modified proteins in aqueous two-phase systems. Effect of surface hydrophobicity and charge**, 1992, 184p. Thesis submitted to the University of Reading, Faculty of Agriculture and Food , Department of food Science and Technology, University of Reading, 1992.
- GROßMAN, P. D., GAINER, J. L. Correlation of aqueous two-phase partitioning of proteins with changes in free volume, **Biotechnology Progress**, v. 4, p. 6-11, 1988.

- GROßMANN, C., TINTINGER, R., ZHU, J. MAURER, G. Partitioning of low molecular combination peptides in aqueous two-phase systems of poly(ethylene glycol) and dextran in the presence of small amounts of  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$  buffer at 293 K; experimental results and predictions, **Biotechnology and Bioengineering**, v. 60, p. 699-711, 1998.
- GÜNDUZ, U. Bovine serum albumin partitioning in aqueous two-phase system: effect of pH and sodium chloride concentration. **11<sup>th</sup> International Conference on Partitioning in Aqueous Two-phase Systems**, Gulf Shores, Alabama, USA, June 27-july 2, 1999.
- HACHEM, F., ANDREWS, B. A., ASENJO, J. A. Hydrophobic partitioning of proteins in aqueous two-phase systems, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, p. 507-517, 1996.
- HANSON, C. Recent research in solvent extraction. **Chemical Engineering**, v. 9, p. 135-142, 1968.
- HANSON, C. **Recent advances in liquid-liquid extraction**. New York, Pergamon Press, 1971.
- HARRIS, J. M. **Poly(ethylene glycol) chemistry - Biotechnical and Biomedical applications**, New York, Phemun Press, 1992.
- HARRIS, J. M., YALPANI, M. Polymer-ligands used in affinity partitioning and their synthesis. In: WALTER, H., BROOKS, D. E., FISHER, D. (eds.), **Partition in aqueous two-phase systems**. Academic press, Orlando, Fla, p. 589-625, 1985.
- HUDDLESTON, J. G., OTTOMAR, K. W., NGONYANI, D. M., LIDDIATT, A. Influence of system and molecular parameters upon fractionation of intracellular proteins from *Saccharomyces* by aqueous two-phase partition. **Enzyme Microbiology and Biotechnology**, v. 13, p. 24-32, 1991.
- HUGGINS, M. L. **J. Chem. Phys.**, v. 9, p. 440, 1941.

- HUMPRHEY, J. L., ROCHA, J. A., FAIR, J. R. The essentials for extraction. **Chemical Engineering**, v.17, p. 76-95, 1984.
- HUSTEDT, H., KRONER, K. H., PAPAMICHAEL, N. Continuous cross-current aqueous two-phase extraction from biomass automated recovery in production scale, **Process Biochemistry**, v.23, p. 129-137, 1988.
- HUSTEDT, H., KRONER, K. H., STACH, W., KULA, M-R. Procedure for the simultaneous large-scale isolation of pullulanase and 1,4- $\alpha$ -glucan phosphorylase from *Klebsiella pneumoniae* involving liquid-liquid separations, **Biotechnology and Bioengineering**, v. 20, p. 1989-2005, 1978.
- JAFARABAD, K. R., SAWANT, S. B., JOSHI, J. B., SIKDAR, S. K. Enzyme and protein mass transfer coefficient in aqueous two-phase system. I- Spray extraction columns. **Chemical and Engineering Science**, v. 47, p. 57-68, 1992a.
- JAFARABAD, K. R., SAWANT, S. B., JOSHI, J. B., SIKDAR, S. K. Enzyme and protein mass transfer coefficient in aqueous two-phase system. II- York-Scheibel extraction columns. **Chemical and Engineering Science**, v. 47, p. 69-73, 1992b.
- JOHANSSON, G. Affinity partitioning of enzymes. In: FISHER, D., SUTHERLAND, I.A. (eds), **Separations using aqueous phase systems**, London; Phenum Press, p. 7-14, 1989.
- JOHANSSON, G., ANDERSON, M., AKERLUND, H-E., Counter current distribution of yeast enzymes with polymer-bound triazine dye affinity ligands, **Journal of Chromatography**, v. 289, p. 483-493, 1984.
- JOHANSSON, G., HARTMAN, A., ALBERTSSON, P-A. Partition of proteins in two-phase systems containing charged poly(ethylene glycol), **Europeum Journal of Biochemistry**, v. 33, p. 379-386, 1973.

- JOHANSSON, G., JOELSSON, M. Preparation of Cibacron blue F3GA (polyethylene glycol) in large scale for use in affinity partitioning, **Biotechnology and Bioengineering**, v. 27, p. 621-625, 1985.
- JOHANSSON, G., KOPPERSCHLÄGER, G., ALBERTSSON, P-A. Affinity partitioning of phosphofructokinase from baker's yeast using polymer-bound Cibacron Blue F3GA, **Europeum Journal of Biochemistry**, v. 131, p. 589-594, 1983.
- JOHANSSON, H-O., LUNDH, G., KARLSTRÖM, G., TJERNELD, F. Effects of ions on partitioning of serum albumin and lisozyme in aqueous two-phase systems containing ethylene oxide/propylene oxide co-polymers, **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1290, p. 289-298, 1996.
- JONES, J.K.N., SMITH, F. Plant gums and mucilages. In: WOLFROM, M. L., TIPSON, R. S. (eds), **Advances in Carbohydrate Chemistry** , New York; Academic Press, v. 4, p. 243-251, 1949.
- KAWASE, Y. Dispersed-phase holdup and mass transfer in a rotating disc contactor with perforated skirts. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 48, p. 247-260, 1990.
- KING, R., BLANCH, H. W., PRAUSNITZ, J. M. Molecular thermodynamics of aqueous two-phase systems for the phase separations, **Analytical I. Engineering Chemical Journal**, v. 34, p. 1585-1594, 1988.
- KISHIDA, A., NAKANO, S., KIKUNAGA, Y., AKASHI, M. Synthesis and funcionalities of poly(N-vinylalkylamide). VII. A novel aqueous two-phase systems based on poly(N-vinylacetamide) and Dextran, **Journal of Applied Polymer Science**, v. 67, p. 255-258, 1998.

- KRONER, K. H., HUSTEDT, H., KULA, M-R. Extractive enzyme recovery: economic considerations, **Process Biochemistry**, v. 19, p. 179-189, 1984.
- KRONER, K. H., STACH, W., SCHUTTE, H. KULA, M-R. Scale-up of formate dehydrogenase isolation by partition. **Journal of Chemistry Technology and Biotechnology**, v. 32, p. 130-137, 1982.
- KULA, M-R. In: C. L. COONEY, A. E. HUMPREY (eds), **Comprehensive Biotechnology**, New York; Pergamon Press, v. 02, p. 451-471, 1985.
- KULA, M-R. Application of aqueous two-phase systems for the extraction of biologically active proteins from biomass. ISEC86, **International Solvent Conference**, v. III, P. 567-576, 1986.
- KULA, M-R. Trends and future prospects of aqueous two-phase extraction. **Bioseparation**, v. 1, p. 181-189, 1990.
- KULA, M-R., KRONER, K. H.; HUSTED, T. H. Purification of enzymes by liquid-liquid extraction. **Advances in Biochemical Engineering**, v. 24, p. 73-118, 1982.
- KULA, M-R., KRONER, K. H., HUSTEDT, H. Large scale protein recovery using aqueous phase systems. In: FISHER, D. E.; SUTHERLAND, I. A. (eds.) **Separations using aqueous phase systems**. London; Phenum press, p. 295-298, 1989.
- KUMAR, A., HARTLAND, S. **Trans. Instn. Engrs**, v.60, p. 35-39, 1982.
- KUNG, E. Y., BECKMAN, R. B. Dispersed phase holdup in a rotating disk extraction column. **Analytical I Chemical Engineering Journal**, v. 7, p. 319-324, 1961.

- LADDHA, G. S., DEGALEESAN, T. E., KANNAPPAN, R. Hydrodynamics and mass transport in rotary disk contactors. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 56, p. 137-150, 1978.
- LI, M., ZHU, Z-Q., MEI, L-H. Partitioning of amino acids by aqueous two-phase systems combined with temperature-induced phase formation, **Biotechnology Progress**, v. 13, p. 105-108, 1997.
- LIN, D-Q., ZHU, Z-Q., MEI, L-H. Affinity extraction of lactate dehydrogenase by aqueous two-phase systems using free triazine dyes. **Biotechnology techniques**, v.10, p. 41-46, 1996.
- LIN, D-Q.; ZHU, Z-Q., YAO, S-J., MEI, L-H. Modelling of protein partitioning in aqueous polymer two-phase systems. **11<sup>th</sup> International Conference on Partitioning in Aqueous Two-phase Systems**, Gulf Shores, Alabama, USA, June 27-july 2, 1999.
- LOGSDAIL, D. H., THORNTON, J. D., PRATT, H. R. C. Liquid-liquid extraction part XII: flooding rates and performance data for a rotary disc contactor. **Trans. Instn Chem. Engrs.**, v. 35, p. 301-315, 1957.
- MARQUES, M. R., XAVIER,-FILHO, J. Enzymatic and inhibitory activities of Cashew tree gum exudate. **Phytochemistry**, Oxford, v. 30, p.1431-1433, 1991.
- MATIASSON, B., LING, T. G. I. Extraction in aqueous two-phase systems for biotechnology. In: VENAL, N. S., HUDSON, M.J. (eds), **Biochemistry and Biotechnology**, p. 270-292, 1987.
- MENESTRINA, J. M., IACOMINI, M., JONES, C., GORIN, P. A. J. Similarity of monosaccharide, oligosaccharide and polysaccharide structures in gum exudate of *Anacardium occidentale*, **Phytochemistry**, v. 47, p. 715-721, 1998.

- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.
- MURAKAMI, A ., MISONOU, A ., INOUE, K. Dispersed phase holdup in a rotating disc extraction column. **International Chemical Engineering**, v. 18, p. 16-22, 1978.
- NGUYEN, A .L., GROTHE, S., LUONG, H. T. Applications of pullulan in aqueous two-phase systems for enzyme production, purification and utilization. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 341-346, 1988.
- ORTIN, A., CEBRIAN, J. A., LÓPEZ-PÉREZ, M. J., JOHANSSON, G. An aqueous hydroxypropilstarch-poly(ethylene glycol) two-phase system for extraction of  $\alpha$ -lactoalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin from bovine whey. **Bioseparation**, v. 2, p. 197-205, 1991.
- PAPAMICHAEL, N., BORNER, B., HUSTEDT, A. Continuous aqueous-phase extraction of proteins - automated processing and recycling of process chemicals. **Journal of Chemistry Technology and Biotechnology**, v. 54, p. 47-55, 1992.
- PAPAMICHAEL, N., HUSTEDT, A. In: WALTER, H., JOHANSSON, G. (eds), **Enzyme recovery by continuous crosscurrent extraction**, New York; Academic Press, p. 590-599, 1994.
- PATHAK, S. P., SUDHA, S., SAWANT, S. B., JOSHI, J. B. New salt-polyethylene-glycol systems for two-phase aqueous extraction. **The Chemical Engineering Journal**, v.46, p. B31-B34, 1991.
- PATIL, T. A., JAFARABAD, K. R., SAWANT, S. B., JOSHI, J. B. Enzyme mass transfer coefficient in aqueous two-phase system using a Packed extraction column, **Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 69, p. 548-556, 1991.

- PAULA, R. C. M., RODRIGUES, J. F. Composition and rheological properties of cashew tree gum, the exudate polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. **Carbohydrate polymers**, v. 26, p. 177-181, 1995.
- PAWAR, P. A., PARASU-VEERA, U., SAWANT, S. B., JOSHI, J. B. Enzyme mass transfer coefficient in aqueous two-phase systems: modified spray extractions columns. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 75, p. 751-758, 1997.
- PERSSON, J., JOHANSSON, H-O., TJERNELD, F. Thermoseparating water/polymer system: a novel one-polymer aqueous two-phase system for protein purification. **11<sup>th</sup> International Conference on Partitioning in Aqueous Two-phase Systems**, Gulf Shores, Alabama, USA, June 27-july 2, 1999.
- POLSON, A., POTGIETE, G. M. LARGIER, J. F., MEARS, G. E. F., JOUBERT, F. J. **Biochemical and Biophysical Acta**, v. 82, p. 463, 1964.
- POLYAKOV, V. I.; GRINGBERG, V., TOLSTOGUZOV, V. B. Application of phase-volume-ratio method for determining the phase diagram of water-casein-soybean globulins system. **Polymer Bulletin**, v. 2, p. 757-760, 1980.
- POPE, B. J., SHAH, N. R. An improved contactor for liquid-liquid extraction. **International Solvent Extraction Conference**, p. 699-710, 1971.
- PORTO, A. L. F. **Extração líquido-líquido de proteínas utilizando sistemas de duas fases aquosas em coluna de discos perfurados rotativos**. Campinas, 1998, 98p. Tese de Doutorado em Engenharia Química, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas-SP, 1998.
- PORTO, A. L. F., LIMA-FILHO, J. L., AIRES-BARROS, M. R., CABRAL, J. M. S., TAMBOURGI, E. B. Extraction of recombinant cytochrome b5 from disrupted *Escherichia*

- coli cells with an aqueous two-phase system in a continuous perforated rotating disc contactor. **Biotechnology Techniques**, v. 11, p. 641-643, 1997.
- PORTO, A. L. F., SARUBBO, L. A., LIMA-FILHO, J. L., AIRES-BARROS, M. R., CABRAL, J. M. S., TAMBOURGI, E. B. Hydrodynamics and mass transfer in two-phase aqueous extraction using a perforated rotating disc contactor, **Bioprocess Engineering** (no prelo), 1999.
- RABELO, A. P. B. **Estudo da eficiência de separação numa coluna de extração líquido-líquido mecanicamente agitada por palhetas rotativas**. Campinas, 1995, 166p. Tese de Mestrado em Engenharia Química, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas-SP, 1995.
- RAGHAV-RAO, K. S. M. S., SZLAG, D. S., SIKDAR, S. K., JOSHI, J. B., SAWANT, S. B. Protein extraction in a column using a polyethylene glycol-maltodextrin two-phase polymer system. **Chemical and Engineering Journal**, v. 46, p. B75-B81, 1991.
- REMAN, G. H. A new efficient extraction apparatus: the rotating disc contactor. **Proceedings Third World Petroleum Congress**, p. 121-131, 1951.
- REMAN, G. H., VAN DE VUSSE, J. G. **Petroleum Refiner**, v. 34, p. 129, 1955.
- REYES, F. G. R. **Polissacarídeo da Palma Gigante (*O puntia ficus indica*, Mill): Propriedades e estrutura**. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas-São Paulo, 1978.
- RINAUDO, M., MILAS, M. "**Polieletrólitos**", ed R.A.M.C. Groote e A.A.S. Curvelo, USP, São Carlos, 1991.

- RITO-PALOMARES, M., HERNANDEZ, M. Influence of system and process parameters on partitioning of cheese whey proteins in aqueous two-phase systems, **Journal of Chromatography B**, v. 711, p. 81-90, 1998.
- RITO-PALOMARES, M., HUDDLESTON, J. G. LYDDIAT, A. PEG-phosphate aqueous two phase partition- polymer recycling in practical implementation, **Trans I. ChemE.**, v. 72C, p. 11-13, 1994.
- ROD, V. Calculating mass transfer with longitudinal mixing. **British Chemical Engineering**, v.2, n. 6, p. 483-487, 1966.
- RODRIGUES, J. F.; PAULA, R. C. M.; COSTA, S. M. O. Métodos de isolamento de gomas naturais: comparação através da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale L.*), **Polímeros: ciência e tecnologia**, ano III, nº1, p. 31-36, 1993.
- ROLLER, S., DEA, I. C. M. Biotechnology in the production and modification of biopolymers for foods. **Critical Reviews in Biotechnology**, Cleveland, v. 12, n. 3, p. 261-277, 1992.
- SANCHEZ-FERRER, A., PEREZ-GILABENT, M., NÚÑEZ, E., BRU, R., GARCICARMONE, F. Triton-114 phase partitioning implant protein purification. **Journal of Chromatography A**, v. 668, p. 75-83, 1994.
- 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.
- SASAKAWA, S., WALTER, H. Partition behavior of native proteins in aqueous dextran-poly(ethylene glycol)-phase systems. **Biochemistry**, v. 11, p. 2760-2765, 1972.

- SASAKAWA, S., WALTER, H. Partition behavior of amino acids and small peptides in aqueous dextran-poly(ethylene glycol)-phase systems. **Biochemistry**, v. 13, p. 29-33, 1974.
- SAWANT, S. B., SIKDAR, S. K. JOSHI, J. B. Hydrodynamics and mass transfer in two-phase aqueous extraction using spray column. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 36, p. 109-115, 1990.
- SCHIMIDT, A. S., VENTOM, A. M., ASENJO, J. A. Partitioning and purification of  $\alpha$ -amylase in aqueous two-phase systems. **Enzyme Microbiology and Biotechnology**, v. 16, p. 131-142, 1994.
- SEBASTIÃO, M. J., CABRAL, M. S., AIRES-BARROS, R. Partitioning of recombinant *Fusarium solani pisi* cutinase in polyethylene glycol-aqueous salt solution two-phase systems. **Journal of Chromatography A**, v. 668, p. 139-144, 1994.
- SKOOG, B. Determination of polyethylene glycols 4000 and 6000 in plasma protein preparations. **Journal of Blood Transfusion and Immunopathology**, v. 37,n. 6, p. 345-349, 1979.
- SKUSE, D. R., NORRIS-JONES, R., YALPANI, M., BROOKS, D. E. Hydroxypropil cellulose / poly(ethylene glycol)-co-poly(propylene glycol) aqueous two-phase systems: system characterization and partition of cells and proteins, **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 14, p. 785-790, 1992.
- SMITH, F., MONTGOMERY, R. **The chemistry of plant gums and mucilages**. New York, Reinhold Publishing Corporation, p. 1-13, 1959.
- SPECIAL REPORT - A FOCUS ON GUMS. **Food Technology**, Washington, v., 45, p. 116-131, 1991.

- SOUZA, R. R. **Estudo e desenvolvimento de um extrator de palhetas rotativas**. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas-São Paulo, 1997.
- STEINER, L. **Rchenerische erfassung der arbeitsweise vom fluessing-fluessing extraktionskolonnen**, Reihe 3: Verfahrenstechnik, Nr 154, VDI Verlag, Dusseldorf, 1988.
- STEPHEN, A. M. Other plants polysaccharides. In: ASPINALL, G. O. (ed), **The polysaccharides**, New York; Academic Press, v. 2, p. 97-180, 1983.
- STRAND, C. P. OLNEY, R. B., ACKERMAN, G. H. Fundamental aspects of rotating disk contactor performance, **Analytical I. Engineering Chemical Journal**, v. 08, p. 252-261, 1962.
- STURESSON, S.; TJERNELD, F.; JOHANSSON, G. Partition of macromolecules and cell particles in aqueous two-phase systems based on hydroxypropyl starch and poly(ethylene glycol), **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.3, p. 281-295, 1990.
- SVENSSON, M., BERGGREN, K., VEIDE, A., TJERNELD, F. Aqueous two-phase systems containing self-association block copolymers- partitioning of hydrophilic and hydrophobic biomolecules, **Journal of Chromatography A**, v. 839, p. 71-83, 1999.
- SZLAG, D. C., GIULIANO, K. A. A low cost aqueous two-phase system for enzyme extraction. **Biotechnology Techniques**, v.2, p. 277-282, 1988.
- TAMBOURGI, E. B. **Estudo da hidrodinâmica de uma coluna de discos rotativos**. Tese de Doutorado em Engenharia Química-Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989.

- TAMBOURGI, E. B., PEREIRA, J. A. F. R. The efficiency of a rotating disc contactor. **Latin American Applied Research**, v. 23, p. 257-260, 1993.
- TINTINGER, R., ZHU, J., GROßMANN, C., MAURER, G. Partitioning of some amino acids and low molecular mass peptides in aqueous two-phase systems of poly(ethylene glycol) and dextran in the presence of small amounts of  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$  buffer at 293 K; experimental results and predictions, **Journal of Chemical Engineering Data**, v. 42, p. 975-984, 1997.
- TJERNELD, F., BERNER, S., CAJARVILLE, A. E., JOHANSSON, G. New aqueous two-phase system based on hydroxypropil starch useful in enzyme purification. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 8, p. 417- 423, 1986.
- TJERNELD, F., JOHANSSON, G. Aqueous two-phase systems for biotechnical use. **Bioseparation**, v. 1, p. 255-263, 1990.
- TJERNELD, F., JOHANSSON, G., JOELSSON, M. Affinity liquid-liquid extraction of lactate dehydrogenase in large scale, **Biotechnology and Bioengineering**, v.30, p. 809-816, 1987.
- TJERNELD, F., PERSSON, I., ALBERTSSON, P-A. Enzymatic hydrolysis of cellulose in aqueous two-phase systems. I. Partition of cellulases from *Trichoderma reesei*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 27, p. 1036-1043, 1985.
- TREYBAL, R. E. **Liquid extraction**, New York; McGraw-Hill, 2 ed., 1963.
- VEIDE, A., SMEDS, A. L. ENFORS, S. O. A process for large-scale isolation of  $\beta$ -galactosidase from *Escherichia coli* in an aqueous two-phase system. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 25, p. 1789-1800, 1983.

- VENÂNCIO, A. A. D. **Caracterização de novos sistemas para partição bifásica aquosa de biomoléculas**. Minho, 1996, 145p. Tese de Doutorado em Engenharia Biológica. Escola de Engenharia, Universidade do Minho-Portugal, 1996.
- VENÂNCIO, A. A. D., ALMEIDA, C., DOMINGUES, L., TEIXEIRA, J. A. Protein partition on a derivative guar gum based aqueous two-phase system, **Bioseparation**, v.5, p. 253-258, 1995.
- VENÂNCIO, A. A. D., TEIXEIRA, J. A. Protein mass transfer studies on Spray column using the PEG-Reppal PES 100 aqueous two-phase system, **Bioprocess Engineering**, v. 13, p. 251-255, 1995.
- VENÂNCIO, A. A. D., TEIXEIRA, J. A., MOTA, M. Evaluation of crude hydroxypropil starch as a bioseparation aqueous two-phase-forming polymer. **Biotechnology Progress**, v. 09, p. 635-639, 1993.
- VERMIJS, H., J. A., KRAMERS, S. H. Liquid-liquid extraction in a "rotating disc contactor", **Chemical Engineering Science**, v. 3, p. 55-64, 1954.
- VIDEIRA, M., AIRES-BARROS, M. R. Liquid-liquid extraction of clavulanic acid using an aqueous two-phase system of polyethylene glycol and potassium phosphate. **Journal of Chromatography A**, n. 668, p. 237-240, 1994.
- WALTER, H., JOHANSSON, G. Partitioning in aqueous two-phase systems; an overview. **Analytical Biochemistry**, v. 155, p. 215-242, 1986.
- WALTER, H., JOHANSSON, G. **Aqueous two-phase systems**. Academic Press, New York, 1994.
- WESTERTEP, K. R., LANDSMAN, P. Axial mixing in a rotating disk contactor-I Apparent longitudinal diffusion. **Chemical Engineering Science**, v. 17, p. 363-372, 1962.

ZASLASVSKY, B. Y. **Aqueous two-phase partitioning - Physical Chemistry and Bioanalytical Applications**, New York, Mercel Dekker, 695p. 1995.

ZASLASVSKY, B. Y., BAGIROV, T. O., BOROVS KAYA, A. A., GASANOVA, G. Z., GULAEVA, N. D., LEVIN, V. Y., MASIMOV, E. A., MAHMUDOV, A. U., MESTECHKINA, N. M., MIHEEVA, L. M., OSIPOV, N. N. ROGOZHIN, S. V. Aqueous biphasic systems formed by nonionic polymers II: Concentrations effects of inorganic salts on phase separation, **Colloid & Polymer Science**, v. 265, p. 548, 1987.

ZASLASVSKY, B. Y. BAGIROV, T. O., BOROVS KAYA, A. A., GULAEVA, N. D., MIHEEVA, L. M., MAHMUDOV, A. U., RODNIKOVA, M. N. **Polymer**, v. 30, p. 2104, 1989.

ZASLASVSKY, B. Y., MAHMUDOV, A. U., BAGIROV, T. O., BOROVS KAYA, A. A., GASANOVA, G. Z., GULAEVA, N. D., LEVIN, V. Y., MESTECHKINA, N. M., MIHEEVA, L. M., RODNIKOVA, M. N. Aqueous biphasic systems formed by nonionic polymers I: effects of inorganic salts on phase separation, **Colloid & Polymer Science**, v. 264, p. 1066, 1986.

## 9. ADENDO

Os resultados obtidos neste trabalho foram submetidos para publicação em revistas nacionais e internacionais e apresentados em congressos nacionais e internacionais:

SARUBBO, L. A., OLIVEIRA, L. A., VIEIRA, L. F. D., PORTO, A. L. F., PIMENTEL, M. C. B., CAMPOS-TAKAKI, G. M., TAMBOURGI, E. B. Partition behaviour of bovine serum albumin in a new aqueous two-phase system based on cashew-nut tree gum and poly(ethylene glycol). **II Congresso de Engenharia de Processos do Mercosul**, 30 de agosto a 02 de setembro de 1999, Florianópolis, Santa Catarina- Brasil, p. 711-712.

SARUBBO, L. A., OLIVEIRA, L. A., VIEIRA, L. F. D., PORTO, A. L. F., PIMENTEL, M. C. B., CAMPOS-TAKAKI, G. M., TAMBOURGI, E. B. Partition behaviour of bovine serum albumin in a new aqueous two-phase system based on cashew-nut tree gum and poly(ethylene glycol). **Latin American Applied Research** (no prelo), 2000.

SARUBBO, L. A., OLIVEIRA, L. A., PORTO, A. L. F., DUARTE, H. S., CARNEIRO-LEÃO, A. M. A., LIMA-FILHO, J. L., CAMPOS-TAKAKI, G. M., TAMBOURGI, E. B. New aqueous two-phase system based on cashew-nut tree gum and polyethylene glycol. **11<sup>th</sup> International Conference on Partitioning in Aqueous Two-phase Systems**, Gulf Shores, Alabama, USA, June 27-july 2, 1999.

SARUBBO, L. A., OLIVEIRA, L. A., PORTO, A. L. F., DUARTE, H. S., CARNEIRO-LEÃO, A. M. A., LIMA-FILHO, J. L., CAMPOS-TAKAKI, G. M., TAMBOURGI, E. B. New aqueous two-phase system based on cashew-nut tree gum and polyethylene glycol. **Journal of Chromatography B**, 1999.

SARUBBO, L. A., OLIVEIRA, L. A., VIEIRA, L. F. D., PORTO, A. L. F., CAMPOS-TAKAKI, G. M., TAMBOURGI, E. B. Partição de albumina de soro bovino em um novo sistema bifásico aquoso constituído por goma de cajueiro e polietileno glicol. **Revista Symposium**, ano 3, n. 2, p.48-52.

L.A. SARUBBO, L.A. OLIVEIRA, A.L.F. PORTO, J.L. LIMA-FILHO, G.M. CAMPOS-TAKAKI, E.B. TAMBOURGI Protein mass transfer studies on a perforated rotating disc contactor using the PEG-Cashew nut tree gum aqueous two-phase system (submetido para publicação em **Chemical Engineering and Process**).

OLIVEIRA, L. A., SARUBBO, L. A., PORTO, A. L. F., LIMA-FILHO, J. L., MENESTRINA, J. M. L., CAMPOS-TAKAKI, G. M., TAMBOURGI, E. B. Preliminary study of a new aqueous two-phase system based on cashew-nut tree gum and polyethylene glycol. **Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular-SBBq, XXVIII Reunião Anual**, Minas Gerais - Caxambu, 22 a 25 de Maio de 1999.

PORTO, A. L. F., SARUBBO, L. A., LIMA-FILHO, J. L., AIRES-BARROS, M. R., CABRAL, J. M. S., TAMBOURGI, E. B. Hydrodynamics and mass transfer in two-phase aqueous extraction using a perforated rotating disc contactor. Submetido para publicação em **Bioprocess Engineering** (no prelo), 2000.

PORTO, A. L. F., SARUBBO, L. A., OLIVEIRA, L. A., VIEIRA, L. F. D., LIMA-FILHO, J. L., TAMBOURGI, E. B. Mass transfer and separation efficiency studies using a perforated rotating disc contactor. **ICheaP-4, The Fourth Italian Conference on Chemical and Process Engineering**, Florence- Italy, 2-5 may, 1999, p. 493-496.

PORTO, A. L. F., SARUBBO, L. A., OLIVEIRA, L. A., VIEIRA, L. F. D., LIMA-FILHO, J. L., TAMBOURGI, E. B. Behaviour of proteins in continuous extraction with aqueous two-phase system. **ICheaP-4, The Fourth Italian Conference on Chemical and Process Engineering**, Florence- Italy, 2-5 may, 1999, p. 507-510.



**T022 - Partition Behaviour of Bovine Serum Albumin in a New Aqueous Two-Phase System Based on Cashew-Nut Tree Gum and Poly(Ethylene Glicol)**

L.A. Sarubbo<sup>1</sup>, L.A. Oliveira<sup>1</sup>, L.F.D. Vieira<sup>2</sup>, A.L.F. Porto<sup>2,3</sup>, M.C.B<sup>2</sup>, Pimentel, G.M. Campos-Takaki<sup>4</sup> and E.B. Tambourgi<sup>1</sup>

Departamento de Sistemas Químicos e de Informática-UNICAMP<sup>1</sup>, CP-6066-CEP13081-Campinas-SP-Brasil-E-mail:elias@desq.feq.unicamp.br, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, LIKA-UFPE<sup>2</sup>, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal-UFRPE<sup>3</sup>, Departamento de Química-UNICAP<sup>4</sup>

**Abstract:**

Aqueous two-phase systems have found widespread use in biochemical research for separation and purification of macromolecules, cells and cell particles. In recent years the aqueous two-phase systems have also found applications in various areas of biotechnology. The two-phase systems are obtained by combining aqueous solutions of two (water-soluble) polymers, differing in their chemical structure, or by addition of an organic salt (e.g. sulphate or phosphate), at high concentration, to a solution of a polymer. For separation purposes in the laboratory the polymer-polymer type of systems has been almost exclusively used, preferentially those consisting of fractionated dextran and poly(ethylene glycol) (PEG). For the large scale isolation of enzymes the inexpensive PEG-salt systems have been used. This choice has been indicated by economic reasons due to the high cost of fractionated dextran. However, the properties of the PEG-salt systems strongly limit their usefulness for applications in biotechnology mainly due to the high concentration of salt. The polymer-polymer systems are much more generally useful and allow processes to be carried out at low salt concentrations. Therefore, new polymers have been introduced to reduce the costs. A new aqueous two-phase system based on cashew-nut tree gum and poly(ethylene glycol) is described. The exsudate gum from *Anacardium occidentale* L. is a branched acidic heteropolisaccharide found in all brazilian north-western. It's employed locally as a substitute for arabic gum in pharmaceutical uses. In the present work we have studied the partitioning of a model protein, Bovine Serum Albumin (BSA) in this new system. Crude gum was collected as natural exsudate from cultivated trees in Pernambuco state, Brazil. Clear nodules free of bark were selected



to be isolated via ethanol precipitation. Phase diagrams were provided for cashew-nut tree gum and PEG molecular weight of 4000 and 8000 at pH 7,  $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Three different tie-lines for each phase diagram were studied. Influence of poly(ethylene glycol) molecular weight and tie-line length on protein partition were analysed. The partition coefficient (K) was defined as the ratio between BSA in the upper (PEG) and lower (cashew-nut tree gum) phases. Protein partition coefficient showed a small increase with decrease in polymer molecular mass and tie-line length also decreased the partition. Results indicate that this is a potentially useful aqueous two-phase system for protein extraction.

# PARTITION BEHAVIOUR OF BOVINE SERUM ALBUMIN IN A NEW AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM BASED ON CASHEW-NUT TREE GUM AND POLY(ETHYLENE GLYCOL)

L.A. SARUBBO<sup>\*\*</sup>, L.A. OLIVEIRA<sup>\*\*</sup>, L.F.D. VIEIRA<sup>\*\*\*</sup>, A.L.F. PORTO<sup>\*\*\*</sup>, M. C. B. PIMENTEL<sup>\*\*\*</sup>, G.M. CAMPOS-TAKAKI<sup>\*\*\*\*</sup> and E.B. TAMBOURGI<sup>\*</sup>

*Departamento de Sistemas Químicos e de Informática-UNICAMP<sup>\*\*\*</sup>, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, UFPE Recife-PE-Brasil<sup>\*\*\*</sup>, Departamento de Química/Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais- NPCIAMB-UNICAP, Recife-PE-Brasil<sup>\*\*\*\*</sup>*

**Key-words:** aqueous two-phase system, protein purification, liquid-liquid extraction, cashew-nut tree gum, bovine serum albumin

## Abstract

In the present work we have studied the partitioning of a model protein, Bovine Serum Albumin (BSA) in a new system based on cashew-nut tree gum and poly(ethylene glycol) (PEG). Phase diagrams were provided for cashew-nut tree gum and PEG molecular weight of 1500 and 8000 at pH 7,  $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Different tie-lines for each phase diagram were studied. Influence of poly(ethylene glycol) molecular weight, tie-line length and presence of NaCl on protein partition were analyzed. The partition coefficient (K) was defined as the ratio between BSA in the upper (PEG) and lower (cashew-nut tree gum) phases. Protein partition coefficient was only slightly influenced by the PEG molecular mass. The increase in the tie-line length and the presence of NaCl led to a decrease of K. Results indicate that this is a potentially useful aqueous two-phase system for protein extraction.

## 1. Introduction

The partitioning of biomolecules in aqueous polymer two-phase systems has been studied extensively during the last decades (Albertsson, 1986; Walter and Juhansson, 1994). A lot of interest has been focused on protein partitioning. The use of aqueous polymer two-phase systems can offer a mild and low cost separation method for the purification of a protein from a cell homogenate. For this purpose PEG-dextran and PEG-phosphate system are the most frequently used (Walter *et al.*, 1985; Tjerneld, 1992). Although inexpensive, the high salt concentration in both phases of this system limits its usefulness. The PEG-salt phase forms only at rather high ionic strength, which may cause the denaturation of sensitive biological structures (Kula *et al.*, 1989). As a consequence, there is a need to

develop new aqueous two-phase systems suitable for large-scale processes. By allowing processes to be carried out at low salt concentrations, polymer-polymer systems may be more useful than PEG-salt systems. Since polymers and salts used to generate two-phase systems alone account for as much as 75% of the total production cost of an aqueous-phase extraction (Datar, 1986), it is necessary to find inexpensive substitutes for fractionated dextran. Several polymers (Kroner *et al.*, 1982; Tjerneld *et al.*, 1986; Szlag & Giuliano, 1988) have already been tested as an alternative to fractionated dextran.

The exsudate gum from *Anacardium occidentale* L. is a branched acidic heteropolysaccharide found in all Brazilian north-western. It's employed locally as a

substitute for arabic gum in pharmaceutical uses (Paula and Rodrigues, 1995).

In this work we describe the partition behaviour of BSA in a new aqueous biphasic system. The capacity of cashew gum as a phase forming polymer is evaluated.

## 2. Materials and methods

### 2.1 Polymers

Crude gum was collected as natural exsudate from cultivated *Anacardium occidentale* trees of various localities in Pernambuco state, Brazil. Common-type plants about 20 years old yellow cashew producers were utilized. Poly(ethylene glycol) (PEG 8000), number average molecular weight of  $(7-9) \times 10^3$  and PEG 1500 number average molecular weight of  $(1,3-1,6) \times 10^3$ , were obtained from Sigma Chemical Co (St. Louis, Mo, USA).

### 2.2 Proteins

Bovine serum albumin (BSA, isoelectric point 5.1) with a molecular weight of 67500 Da was obtained from Sigma Chemical Co.

All other chemicals were analytical grade.

### 2.3 Purification of Gum

Clear nodules free of bark were selected to be purified via ethanol by the use of the Rinaudo-Milas (1991) method.

### 2.4 Phase Diagrams

The binodal of the phase diagrams, the demarcation between cashew nut tree gum/PEG compositions showing monophasic and biphasic behaviour was obtained by direct observation of two phase formation for a large number of systems containing varying concentrations of PEG and cashew-nut tree gum. These solutions were compounded by weighed quantities of PEG and gum in phosphate buffer at pH 7.0. Systems that displayed a distinct phase/phase interface were considered biphasic. Phase diagrams were determined at room temperature. After

preparation systems, the polymer composition of the top and bottom phases was analyzed. PEG concentration was determined according to Skoog, (1979). Polysaccharide concentration was determined by measuring reducing sugars (DNS method, Miller, 1959) concentration after an hydrolysis step with sulfuric acid.

### 2.5 Two-phase systems

The systems (total mass 4g) were prepared from stock solutions of the polymers in phosphate buffer (pH 7.0). Concentrations of 70% and 50% (w/w) were prepared for PEG 1500 and 4000, respectively. A 30% (w/w) stock solution of cashew-nut tree gum was also prepared by dissolving the powder in phosphate buffer.

For system preparation, polymer solutions were weighed and mixed with buffer and 400  $\mu$ l of a 2 mg/ml BSA solution. Systems containing salt were prepared by adding the correct amount of powdered salt to the previous mixture.

In all systems, the buffer concentration was 15 mM and the temperature for phase separation was  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Phase separation was achieved by centrifugation, 5 minutes at 500 rpm.

### 2.6 Phase Partition Coefficient

The partition of protein between the two phases was determined according to Bradford (1976). Partition coefficient (K) was defined as the ratio between upper and bottom phase concentrations.

It was not possible, in some cases, to collect a sample from the bottom phase due to its viscosity. In these cases, protein concentration in bottom phase was calculated by mass balance. All partition coefficient values were determined after three independent experiments performed in duplicate.

### 3 Results and Discussion

#### 3.1 Phase diagrams

The phase diagrams for PEG 8000/Cashew-nut tree gum and PEG1500/cashew-nut tree gum are shown in Fig. 1. These diagrams confirms that Polyethylene glycol and cashew gum mixtures form two-phase systems when compounded such that the concentrations of PEG and Cashew gum exceed the set of concentrations defined by the binodal. It can be observed from the graphic that the concentration of PEG 1500 required to form two phases with cashew nut tree gum is greater than that of PEG 8000. The phase diagram is therefore shifted toward the right as the PEG molecular weight decreases. This effect of PEG molecular weight on the binodal is in accordance with Albertsson (1986).

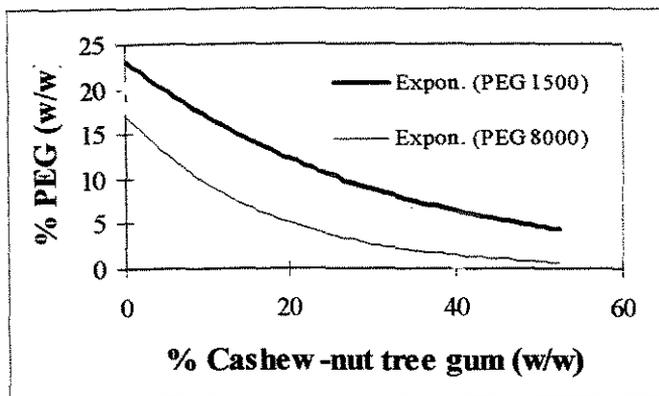


Figure 1. Phase diagrams for PEG 1500/Cashew-nut tree gum and PEG 8000/Cashew-nut tree gum at  $25^{\circ}\text{C}\pm 2$ , pH 7.0.

#### 3.2 Protein Partition

Several biphasic systems formed by PEG 1500 or PEG 8000 and Cashew nut tree gum were tested for the ability to extract BSA. Polymer compositions of tested systems are shown in table 1.

Table 1. Compositions (w/w) of PEG-cashew nut tree gum system with PEG 1500 and PEG 8000

System	Tie-line	PEG (%)	Gum (%)
PEG 1500	1	13	21
	2	22,5	13,8
PEG 8000	1	9	16
	2	11	18
	3	13	20

For each system, the following effects were studied: PEG average molecular mass (1500 and 8000) and tie-line length. The presence of sodium chloride (0.1 M) on BSA partition was also assayed at a fixed pH (7.0).

#### 3.2.1 PEG Molecular Mass

The results showed in Fig. 2 indicate that the system studied is slightly influenced by the PEG molecular mass. The partition coefficients show no regular tendency for all the cases studied. Due to an excluded volume effect, the general tendency expected would be an increase of the partition coefficients as the PEG molecular mass decreases. However, when the polymer molecular mass changes, it is necessary to alter the polymer concentration (e. g., for PEG 1500 a greater amount of the polymer is needed to form aqueous two-phase systems than for PEG 8000), which influences the partition coefficients in the opposite way. Results obtained by Almeida *et al.*, 1998 with system cutinase in PEG-hydroxypropyl by system show the same behaviour as the PEG molecular mass is increased.

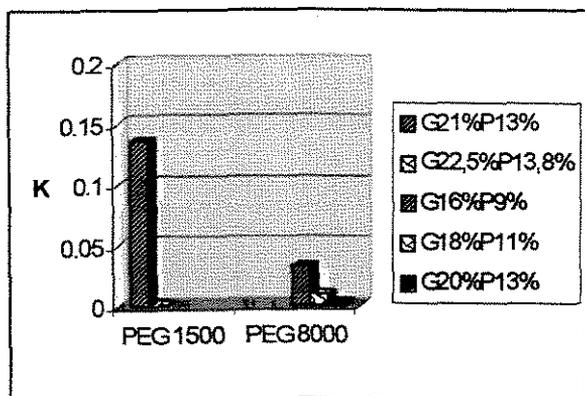


Figure 2. Influence of PEG molecular mass and tie-line length in Bovine Serum Albumin partition coefficient in PEG/Cashew-nut tree gum system at  $25^{\circ}\text{C}\pm 2$ , pH 7.0.

### 3.2.2 Effect of Tie-line Length

Three tie-lines length for PEG 8000 and two for PEG 1500 were analyzed. The increase of the tie-line length leads, (Table 1) to a decrease of K (Fig. 2). This increase is due to the increasing PEG concentration which causes a molecular exclusion of the BSA from the top to the bottom phase. These results are in accordance with the data presented by Sturesson *et al.* (1990) with two different proteins in phase systems based on PEG-Hydroxypropyl starch and Almeida *et al.* (1998) with cutinase in also PEG-Hydroxypropyl starch systems.

### 3.2.3 Effect of Salt Addition

It is known that salt concentrations alter the protein partition in aqueous two-phase systems. To obtain a more complete characterization of protein partition, the effect of the addition of sodium chloride to the system was studied. It can be seen from Fig. 3 that the presence of this salt decreased the partition coefficient of BSA. As in other systems (Albertsson, 1986), it might be expected that salts do not distribute evenly between the two phases and that a slight predominance of the chloride anion in the

upper phase may occur. The upper phase becomes negatively charged and repels negatively charged proteins to the lower phase. Once the isoelectric point of BSA is 5.1, the protein is negatively charged at pH 7.0.

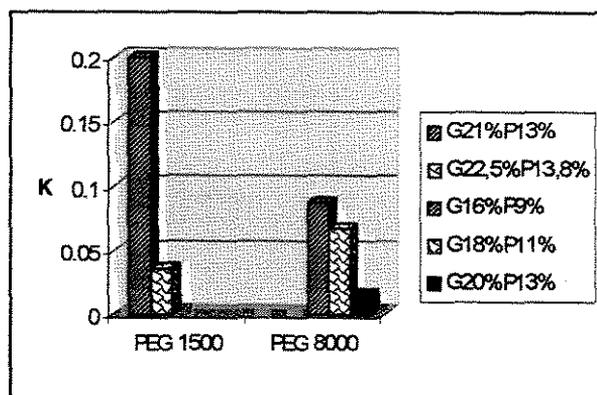


Figure 3. Influence of NaCl addition in Bovine Serum Albumin partition coefficient in PEG/Cashew-nut tree gum system at  $25^{\circ}\text{C}\pm 2$ , pH 7.0.

## 4. Conclusions

The initial study of the PEG-Cashew - nut tree gum system shows that this new system can be used successfully as a separation method applied to protein purification. Molecular weight of PEG, total polymer concentration and the addition of salts can be used to manipulate the partition of molecules between the phases.

## Acknowledgments

We would like to thank FAPESP for financial support.

\* Author to whom correspondence should be addressed

Departamento de Sistemas Químicos e de Informática-UNICAMP, Campinas-SP-Brasil CP-6066-CEP13081

## References

- Albertsson, P.-A., *Partition of cell particles and macromolecules*, 3 ed, Wiley, New York (1986).
- Almeida, M.C., Venâncio, A., Teixeira, J.A. and Aires-Barros, M.R., "Cutinase purification on poly(ethylene glycol)-hydroxypropyl starch aqueous two-phase systems", *J. Chromatog. B*, **711**, 151-159 (1998)
- Bradford, M. M., "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal. Biochem.* **72**, 248-254 (1976).
- Datar, R., "Economics of primary separation steps in Relation to fermentation and Genetic Engineering", *Process Biochem.* **21**, 19-26 (1986).
- Kroner, K.H., Stach, W., Schutte, H. and Kula, M-R., "Scale-up of formate dehydrogenase isolation by partition", *J. Chem. Technol. and Biotechnol.* **32**, 130-137 (1982).
- Kula, M. R., Kroner, K. H. and Hustedt, H., "Large scale protein recovery using aqueous phase systems". In: Fisher, D. E.; Sutherland, I. A. (Eds.) *Separations using aqueous phase systems*, Plenum press, London (1989).
- Milas, R., *Polieletrólitos*, R. A. M. C. Groote e <sup>aa</sup>S. Curvelo, USP, São Carlos, b) M. Rinaudo, *Comunicação Pessoal* (1991).
- Tjerneld, F., *Poly(ethyleneglycol) chemistry: biotechnical and biomedical applications*, J. M. Harris, Plenum Press, New York (1992).
- Miller, G.L., "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar", *Anal. Chem.* **31**, 426-428 (1959).
- Paula, R. C. M. and Rodrigues, J. F., "Composition and rheological properties of cashew tree gum, the exsudate polysaccharide from *Anacardium occidentale L.*", *Carbohyd. Polym.* **26**, 177-181 (1995).
- Skoog, B., "Determination of polyethylene glycols 4000 and 6000 in plasma protein preparations", *J. Blood Trans. Immunopathol.*, **37**, 345-349 (1979).
- Sturesson, S.; Tjerneld, F. and Johansson, G., "Partition of macromolecules and cell particles in aqueous two-phase systems based on hydroxypropyl starch and poly(ethylene glycol)", *Appl. Biochem. Biotechnol.* **26**, 281-295 (1990).
- Szlag, D. C. and Giuliano, K.A., "A low cost aqueous two-phase system for enzyme extraction", *Biotechnol. Techn.* **2**, 277-282 (1988).
- Tjerneld, F., *Poly(ethyleneglycol) chemistry: biotechnical and biomedical applications*, J. M. Harris, Plenum Press, New York (1992).
- Tjerneld, F., Berner, S., Cajarville, A. and Johansson, G., "New aqueous two-phase system based on hydroxypropyl starch useful in enzyme purification", *Enzyme Microb.* **8**, 447-423 (1986).
- Walter, H. and Juhansson, B., *Aqueous two phase systems*", Academic Press, New York (1994).
- Walter, H., Brooks, D. F. and Fisher, D., *Partitioning in aqueous two-phase systems: theory, methods, uses and applications to biotechnology*, Academic Press, New York, (1985).



ELSEVIER

Journal of Chromatography B, 1 (1999) 000-000

---



---

 JOURNAL OF  
 CHROMATOGRAPHY B
 

---



---

www.elsevier.com/locate/chromb

## New aqueous two-phase system based on cashew-nut tree gum and poly(ethylene glycol)

L.A. Sarubbo<sup>a</sup>, L.A. Oliveira<sup>a</sup>, A.L.F. Porto<sup>b,c</sup>, H.S. Duarte<sup>c</sup>, A.M.A. Carneiro-Leão<sup>c</sup>,  
 J.L. Lima-Filho<sup>b</sup>, G.M. Campos-Takaki<sup>d</sup>, E.B. Tambourgi<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>DESQ-FEQ, UNICAMP, Campinas-SP-Brasil CxP-6066-CEP13081, Brazil

<sup>b</sup>Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami-UFPE Recife-PE-Brasil, Brazil

<sup>c</sup>Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal-UFRPE, Recife-PE-Brasil, Brazil

<sup>d</sup>Departamento de Química-UNICAP, Recife-PE-Brasil, Brazil

### Abstract

The characterisation of a new system based on cashew-nut tree gum, a branched acidic heteropolysaccharide found in Brazil, and poly(ethylene glycol) (PEG) was studied. Phase diagrams are provided for the PEG-cashew-nut tree gum system. The influence of PEG molecular mass, tie-line length and pH on bovine serum albumin (BSA) partition was investigated. Protein partition coefficient was little influenced by changing PEG molecular mass. Increasing the tie-line length decreased the partition. Increasing the pH also raised the BSA partition coefficient. It is shown that systems formed by PEG and cashew-nut tree gum may be considered as an interesting alternative for use in protein purification. © 1999 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Aqueous two-phase systems; Cashew-nut tree gum; Poly(ethylene glycol)

### 1. Introduction

Aqueous two-phase systems (ATPSs) have found widespread use in biochemical research for separation and purification of macromolecules cells and cell particles [1]. In recent years the ATPSs have also found applications in various areas of biotechnology.

The two-phase systems are obtained by combining aqueous solutions of two (water-soluble) polymers, differing in their chemical structure, or by addition of an organic salt (e.g. sulphate or phosphate), at high concentration, to a solution of a polymer. For separation purposes in the laboratory the polymer-polymer type of system has been almost exclusively

used, preferentially those consisting of fractionated dextran and poly(ethylene glycol) (PEG) [1,2]. The properties of these systems are well studied but high cost of fractionated dextran prevents the use of this system in large-scale processes [3]. For the large-scale isolation of enzymes the inexpensive PEG-salt systems are used. This choice has been indicated by economic reasons due to the high cost of fractionated dextran. However, the properties of the PEG-salt systems strongly limit their usefulness for applications in biotechnology mainly due to the high concentration of salt, which may cause the denaturation of sensitive biological structures [4]. Another problem related to the use of PEG-salt systems is waste disposal. ATPSs based on dextran, starch and cellulose derivatives have the advantage of biodegradability [5]. As a consequence, there is a need to

\*Corresponding author.

65 develop new biphasic systems suitable for large-scale  
66 processes. So, it is necessary to find inexpensive  
67 substitutes for fractionated dextran with equivalent  
68 partition properties. Several polymers, such as starch  
69 derivatives [6], maltodextrin [7] and cellulose deriva-  
70 tives [8] have been tested as an alternative to  
71 fractionated dextran. The utilisation of polysac-  
72 charides may have a big impact in the development  
73 of two-phase systems for large-scale purification  
74 [6,9].

75 Exudate gum from *Anacardium occidentale* L. is a  
76 branched acidic heteropolysaccharide largely found  
77 in Brazil. The polysaccharide is produced in epitheli-  
78 al cells which border the gum ducts and is known to  
79 be part of the biochemical defences of the plant [10].  
80 The polysaccharide molecular mass ( $M_r$ ) is  
81  $\approx 110\ 000$  [11]. The gum contains galactose (73%),  
82 glucose (11%), glucuronic acid (6%), arabinose  
83 (5%), rhamnose (4%) and mannose (1%) [10]. Nut  
84 production in trees older than 25 years increases after  
85 gum extraction. Given the importance of cashew tree  
86 culture to some regions of Brazil, especially the

north-west, a study of the gum for biotechnological  
application is of potential industrial interest. A  
structural fragment of the gum is shown in Fig. 1.

In this work we report on the use of cashew-nut  
tree gum. The potential utilisation of this gum as an  
aqueous-phase-forming polymer, as well as its  
capacity for protein separation is evaluated.

2. Experimental

2.1. Chemicals

Crude gum was collected as a natural exudate  
from cultivated *Anacardium occidentale* trees in  
various localities in Pernambuco State, Brazil. Com-  
mon type plants about 20 years old, yellow cashew  
producers were utilised. PEG 8000 and PEG 4000  
were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA).  
All other chemicals were of analytical grade.

2.2. Protein

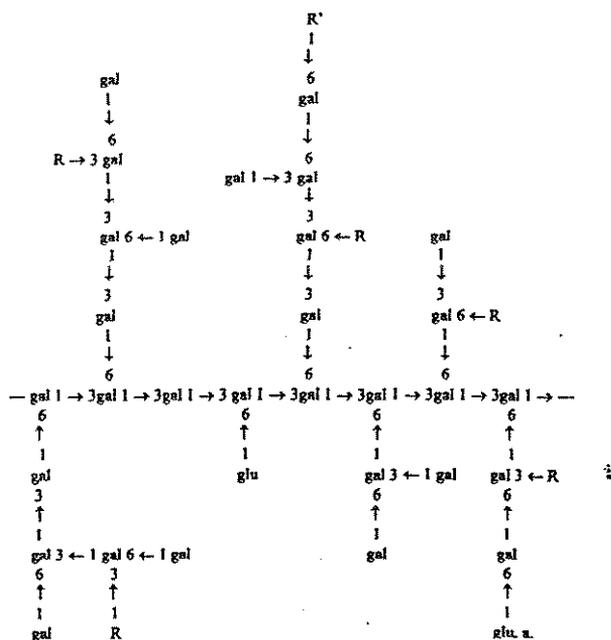
Bovine serum albumin (BSA) with an  $M_r$  of  
67 500 was obtained from Sigma.

2.3. Purification of gum

Clear nodules free of bark were selected to be  
purified via ethanol purification by use of the  
Rinaudo-Millas method as previously described [13].  
Precipitation with ethanol permitted the isolation of  
the polysaccharide from the monosaccharides and  
oligosaccharides, which remained in solution.

2.4. Phase diagrams

Phase diagrams were determined at room tempera-  
ture according to Albertsson's [1] procedure. The  
binodal of the phase diagram, the demarcation  
between PEG-cashew-nut tree gum compositions  
showing monophasic and biphasic behaviour was  
obtained by direct observation of two-phase forma-  
tion for a large number of solutions containing  
varying concentrations of PEG and cashew-nut tree  
gum. Systems that displayed a distinct phase-phase  
interface were considered biphasic. The polymer  
compositions of the top and bottom phases of various



61 Fig. 1. Structural fragment of cashew-nut tree gum. Gal=  
62 galactose, R=D-mannose, L-rhamnose, L-arabinose or arabinose  
63 chains with 1,2 linkage. R'=D-glucose (glu) or D-glucuronic acid  
64 (glu. a.) [12].

Table 1  
Tie-lines compositions (w/w) and system volume ratio ( $V_r$ ) of PEG 4000-cashew-nut tree gum system at pH 6.0

Tie-line length	System $V_r$	System composition % (w/w)			Top phase composition % (w/w)			Bottom phase composition % (w/w)		
		Gum	PEG	H <sub>2</sub> O	Gum	PEG	H <sub>2</sub> O	Gum	PEG	H <sub>2</sub> O
		1°	1.7	18	9	73	5.52	13.54	80.94	36.35
2°	1.6	20	11	69	1.66	19.23	79.11	43.22	0.63	56.15
3°	1.5	22	13	65	0.59	20.24	79.17	47.84	1.68	50.48

was performed at pH 6.0. The two curves, which represent the borderline between one and two phases, have the same shape but there is a parallel displacement between the two. This means that higher polymer concentrations are needed to obtain two phases with PEG 4000, which can be correlated to its lower molecular mass, compared with PEG 8000. This effect of PEG molecular mass on the binodal is in accordance with the results of Albertsson [1]. The same displacement of the binodals was observed by Venâncio et al. [9] for PEG-solbitose gum of ATPSs.

The polymer compositions and volume ratios ( $V_r$ ) of the tested systems are shown in Tables 1 and 2. It can be seen that this system forms two phases with high polymer concentrations. The cashew-nut tree gum is enriched in the denser bottom phase while PEG is found in the upper phase. The ratio between the volumes indicate a higher volume of the upper phase when compared to the bottom phase and that the volume ratio decreases as the TLL increases.

3.2. Protein partition

The partitioning of molecules between the two phases is a complex phenomenon because of the involvement of many factors in the interactions between the solute and the phase forming components. This makes the molecular mass and chemical properties of the polymer and the size and the

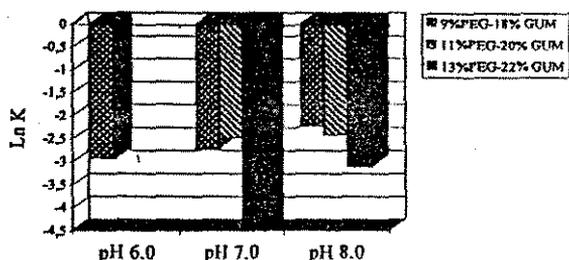


Fig. 3. Effect of tie-line length and pH on BSA partition coefficient in PEG 4000-cashew-nut tree gum system at 27±2°C. BSA partition coefficient was not determined for the second (11% PEG-20% cashew gum) and third (13% PEG-22% cashew gum) tie-lines since BSA concentrated in the cashew gum-rich bottom phase at pH 6.0. Typical uncertainty in the  $K$  values obtained from triple samples were approximately 4%.

chemical properties of the partitioned solute of extreme importance. Due to the complexity of the partitioning phenomenon, it is difficult to predict protein behaviour and select separation conditions for a rational planning of experiments [20].

3.2.1. Effect of PEG molecular mass

The molecular mass of PEG is an important factor in equilibrium distribution. Figs. 3 and 4 show the effect of TLL and pH on BSA partition coefficient for PEG 4000-cashew-nut tree gum and PEG 8000-cashew-nut tree gum, respectively. In all of the tested situations, BSA was mainly in the bottom phase

Table 2  
Tie-lines compositions (w/w) and system volume ratio ( $V_r$ ) of PEG 8000-cashew-nut tree gum system at pH 6.0

Tie-line length	System $V_r$	System composition % (w/w)			Top phase composition % (w/w)			Bottom phase composition % (w/w)		
		Gum	PEG	H <sub>2</sub> O	Gum	PEG	H <sub>2</sub> O	Gum	PEG	H <sub>2</sub> O
		1°	2.2	16	9	75	3.64	13.33	83.03	39.15
2°	1.9	18	11	71	1.33	19.39	79.28	43.88	0.85	55.27
3°	1.8	20	13	67	0.35	21.56	78.09	47.37	0.99	51.64

130 systems were analysed. PEG concentration was  
 131 determined according to Skoog [14]. Polysaccharide  
 132 concentration was determined by measuring reducing  
 133 sugars (DNS method [15] — concentration after a  
 134 hydrolysis step with sulphuric acid).

### 135 2.5. Two-phase systems

136 The systems (total mass 5 g) were prepared from  
 137 stock solutions of the polymers in water, 50% (w/w)  
 138 cashew-nut tree gum and 50% (w/w) PEG. The  
 139 polymers solutions were weighed out and mixed with  
 140 water and phosphate buffer (pH 6.0, 7.0 and 8.0), to  
 141 the desired pH. The buffer concentration was 15  
 142 mM. Visual estimates of the volumes of top and  
 143 bottom phases were made in graduated centrifuge  
 144 tubes. The volumes of the phases were then used to  
 145 estimate the volume ratio ( $V_t$  = volume of the top  
 146 phase/volume of the bottom phase). The partition  
 147 experiments were performed at room temperature  
 148 ( $27 \pm 2^\circ\text{C}$ ) by mixing systems with 500  $\mu\text{l}$  of a 2  
 149 mg/ml albumin solution. The systems were well  
 150 vortex-mixed for 5 min and then centrifuged at 236 g  
 151 for 5 min to obtain two clear phases.

152 The study of protein partitioning in PEG-cashew-  
 153 nut tree gum systems was carried out at pH 6.0, 7.0  
 154 and 8.0 with PEG 4000 and 8000 and for different  
 155 tie-line lengths (TLLs) by varying the PEG and gum  
 156 concentrations. The TLLs were measured directly  
 157 from the phase diagrams. The assays were performed  
 158 in triplicate.

### 159 2.6. Protein partition coefficient

160 Protein concentration on the top phase was de-  
 161 termined according to Bradford [16] and partition  
 162 coefficient ( $K$ ) was defined as the ratio between BSA<sub>2</sub>  
 163 in the upper (PEG) and lower (cashew-nut tree gum)  
 164 phases. Samples of the top phase were diluted in  
 165 water, when necessary, and the protein concentration  
 166 analysed. The protein concentration of the bottom  
 167 phase, due to its viscosity, was calculated from mass  
 168 balance, according to Venâncio et al. [6] and Al-  
 169 meida et al. [17]. The protein concentration of the  
 170 phases was determined for a set of three independent  
 171 systems.

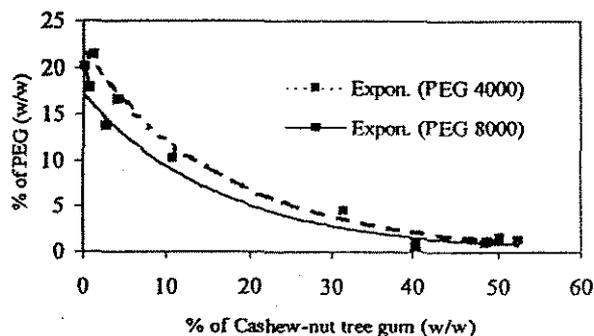
## 172 3. Results and discussion

173 In order to use polymer-polymer ATPS in large  
 174 scale biotechnical processes it is necessary to de-  
 175 velop low cost polymers, which can replace fraction-  
 176 ated dextran. Crude dextran has been used as phase-  
 177 forming polymer for enzyme extractions [20]. Crude  
 178 dextran, however, forms bottom phases with higher  
 179 viscosity compared to the corresponding phases with  
 180 dextran. Thus, crude dextran has to be hydrolysed in  
 181 order to be efficient. The PEG-salt systems, which  
 182 have been preferentially used for large-scale ex-  
 183 tractions [21], have several limitations. Most proteins  
 184 partition strongly to the salt-rich bottom phase and  
 185 the salt concentration in both phases is so high that it  
 186 may destroy sensitive biological structures. We have  
 187 studied a low-cost polymer, the cashew-nut tree gum,  
 188 with the aim of finding a new ATPS.

189 Several ATPSs formed by cashew-nut tree gum  
 190 and PEG were tested for their effectiveness in the  
 191 separation process. For each system, the following  
 192 effects were studied: pH (6.0, 7.0 and 8.0), PEG  
 193 average molecular mass (4000, 8000) and tie-line  
 194 length.

### 195 3.1. Phase diagrams

196 The molecular mass of PEG is an important factor  
 197 in equilibrium distribution. Phase diagrams for PEG-  
 198 cashew-nut tree gum with different molecular mass  
 199 PEG are displayed in Fig. 2. Once the binodal did  
 200 not show a significant displacement with pH changes  
 201 (data not shown), characterisation of phase diagrams



127  
 128 Fig. 2. Phase diagrams for PEG-cashew-nut tree gum systems at  
 129  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ , pH 6.0.

cashew-nut tree gum possesses an economic advantage. The PEG–cashew-nut tree gum system has a competitive price, almost the same of PEG–crude dextran system. Also, cashew-nut tree gum is a natural product largely found in Brazil, which facilitates its use in industries that require products free of chemical contaminants.

#### 4. Conclusions

Aqueous polymer phase diagram and biomolecule partitioning can be influenced by many factors including polymer concentration, molecular mass and pH.

It was observed that increasing polymer molecular mass from 4000 to 8000 led to lower polymer concentrations required for phase separation. The partition coefficient of BSA was little influenced by changing PEG average molecular mass. Increasing the TLL (polymer concentrations) promoted a decrease in partition coefficient of the protein. Increasing the pH also raised the BSA partition coefficient.

The initial characterisation of this new system based on cashew-nut tree gum and PEG showed that cashew gum is of potential utilisation as an aqueous-phase-forming polymer.

The availability of a new inexpensive polymer for phase partitioning makes it economically possible to use it together with PEG for the separation and purification of biomolecules. Research on the influence of other parameters on the protein partitioning in this system is in progress.

#### 5. Uncited references

[18,19]

#### Acknowledgements

We would like to thank FAPESP for financial support.

#### References

- |  |     |
|--|-----|
| [1] P.-A. Albertsson, Partition of Cell Particles and Macromolecules, 3rd Edition, Wiley, New York, 1986.  | 404 |
| [2] B.Y. Zaslavsky, Aqueous Two-phase Partitioning — Physical Chemistry and Bioanalytical Applications, Marcel Dekker, New York, 1995.                         | 405 |
| [3] K.H. Kroner, H. Hustedt, M.-R. Kula, Process Biochem. 19 (1984) 179–1894.  | 406 |
| [4] M.-R. Kula, K.H. Kroner, T.H. Husted, in: D.E. Fisher, I.A. Sutherland (Eds.), Separations Using Aqueous Phase Systems, Plenum, London, 1989, pp. 295–298. | 407 |
| [5] S. Stureson, F. Tjerneld, G. Johansson, Appl. Biochem. Biotechnol. 26 (1990) 281–295.  | 408 |
| [6] A. Venâncio, J.A. Teixeira, M. Mota, Biotechnol. Prog. 9 (1993) 635–638.   | 409 |
| [7] D.C. Szlag, K.A. Giuliano, Biotechnol. Tech. 2 (1988) 277–282.   | 410 |
| [8] D.R. Skuse, R. Norris-Jones, M. Yalpani, D.E. Brooks, Enzyme Microb. Biotechnol. 14 (1992) 785–790.  | 411 |
| [9] A. Venâncio, C. Almeida, L. Domingues, J.A. Teixeira, Bioseparation 5 (1995) 253–258.  | 412 |
| [10] R.C.M. Paula, J.F. Rodrigues, Carbohydr. Polym. 26 (1995) 177–181.  | 413 |
| [11] J.M. Menestrina, M. Iacomini, C. Jones, P.A.J. Gorin, Phytochemistry 47 (1998) 715–721.   | 414 |
| [12] D.M.W. Anderson, P.C. Bell, J.R. Millar, Phytochemistry 13 (1974) 2189–2194.  | 415 |
| [13] J.F. Rodrigues, R.C.M. Paula, S.M.O. Costa, Polímeros: ciência e tecnologia, ano III, No. 1, (1993) 31–36.  | 416 |
| [14] B. Skoog, J. Blood Trans. Immunopathol. 37 (1979) 345–349.  | 417 |
| [15] G.L. Miller, Anal. Chem. 31 (1959) 426–428.   | 418 |
| [16] M.M. Bradford, Anal. Biochem. 72 (1976) 48–251.   | 419 |
| [17] M.C. Almeida, A. Venâncio, J.A. Teixeira, M.R. Aires-Barros, J. Chromatogr. B 711 (1998) 151–159.   | 420 |
| [18] K.H. Kroner, W. Stach, H. Schutte, M.-R. Kula, J. Chem. Technol. Biotechnol. 32 (1982) 130–137.   | 421 |
| [19] M.-R. Kula, K.H. Kroner, T.H. Husted, Adv. Biochem. Eng. 24 (1982) 73–118.  | 422 |
| [20] F. Hachem, B.A. Andrews, J.A. Asenjo, Enzyme Microb. Technol. 19 (1996) 507–517.  | 423 |
| [21] M.-R. Kula, in: C.L. Cooney, A.E. Humphrey (Eds.), Comprehensive Biotechnology, Pergamon, New York, 1985, pp. 451–471.                                    | 424 |
| [22] T.J. Christian, M. Manley-Harris, G.N. Richards, Carbohydr. Polym. 35 (1998) 7–12.  | 425 |

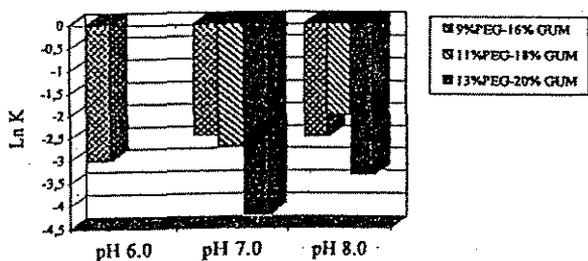


Fig. 4. Effect of tie-line length and pH on BSA partition coefficient in PEG 8000-cashew-nut tree gum system at 27±2°C. BSA partition coefficient was not determined for the second (11% PEG-18% cashew gum) and third (13% PEG-20% cashew gum) tie-lines since BSA concentrated in the cashew gum-rich bottom phase at pH 6.0. Typical uncertainty in the *K* values obtained from triple samples was ≈3.5%.

under the experimental conditions studied. It was not possible to determine BSA partition coefficient for the second and third tie lines at pH 6.0 for either PEG 4000 or 8000 since BSA was not detected in the PEG-rich upper phase.

The results indicate that the system studied is slightly influenced by the PEG molecular mass. The partition coefficients show no regular tendency and are similar in all cases.

The effect of polymer molecular mass is usually attributed to the increasing number of hydrophilic end groups on shorter PEG chains, which reduces the overall hydrophobicity [21], and to the excluded volume effects that increase with increasing polymer molecular mass. Due to these effects, the general tendency expected would be an increase of the partition coefficients as the PEG molecular mass decreases. However, it is important to bear in mind that by changing the polymer molecular mass, one needs to alter the polymer concentration, which influences the partition coefficients in the opposite way. Still, as the PEG molecular chain decreases, its hydrophilic character becomes stronger [7]. Therefore, and considering the hydrophilic character of albumin, PEGs of lower molecular mass should increase the protein affinity for the PEG-rich phase. However, this tendency was not observed for BSA partitioning, probably due to the charge of the cashew-nut tree gum. This fact could explain the little influence of variation of PEG molecular mass from 8000 to 4000 in the BSA partition coefficient. Christian et al. [22] also studied the influence of PEG molecular mass upon the partition coefficient of

BSA in PEG-arabinogalactan systems. Altering the molecular mass of the PEG had no very significant effect upon the partition coefficient.

3.2.2. Effect of tie-line length

This effect is related to the influence of the distance from the critical point on the partitioning behaviour of proteins in aqueous two-phase systems. Near the critical point, the *K* value should be close to 1 [1] which is confirmed by most of the results shown in Figs. 3 and 4. The increase of the TLL leads, in most cases, to a decrease of *K*. This increase is due to the increasing PEG concentration, which causes a molecular exclusion of the BSA from the top to the bottom phase. These results are in accordance with the data presented by Sturesson et al. [5] with two different proteins in phase systems based on PEG-hydroxypropyl starch and Almeida et al. [17] with cutinase in also PEG-hydroxypropyl starch systems.

3.2.3. Effect of pH

Although the *K* value shows little changes by changing the system pH, an increase of this parameter can be detected as the pH is increased from 6.0 to 8.0 (Figs. 3 and 4). Similar results for BSA partitioning were observed by Venâncio et al. [9] in PEG-solvitose gum systems and Christian et al. [22] in PEG-arabinogalactan systems.

3.3. Economics

The cost of the polymer-polymer two-phase system studied was compared to that of other systems (Table 3). The cost of this new system shows that

System	\$/US
9% PEG 8000-16% cashew-nut tree gum	5.92 <sup>a</sup>
9% PEG 4000-18% cashew-nut tree gum	6.01 <sup>a</sup>
5% PEG 8000-7% dextran T500	3.5 <sup>b</sup>
5% PEG 8000-7% crude dextran	5.7 <sup>b</sup>
5% PEG 8000-14% hydroxypropyl starch	8.4 <sup>c</sup>
5% PEG 8000-16% arabinogalactan	12 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> CNPCa-EMBRAPA experimental plantation, Pacajus, Ceará, Brazil.  
<sup>b</sup> Sigma, St. Louis, Mo, USA.  
<sup>c</sup> Shearwater Polymers, Huntsville, AL, USA.  
<sup>d</sup> Larex, St. Paul, MN, USA.

ROMB 10657

**Subject Index**

aqueous two-phase systems  
cashew-nut tree gum

**Compound Index**

poly(ethylene glycol)

# PARTIÇÃO DE ALBUMINA DE SORO BOVINO EM UM NOVO SISTEMA BIFÁSICO AQUOSO CONSTITUÍDO POR GOMA DE CAJUEIRO E POLIETILENO GLICOL

L. A. Sarubbo<sup>1</sup>, L. A. Oliveira<sup>1</sup>, L. F. D. Vieira<sup>2</sup>,  
A. L. F. Porto<sup>2</sup>, E. B. Tambourgi<sup>1</sup> e  
G. M. Campos-Takaki<sup>3</sup>

## Abstract

Aqueous two-phase systems have found widespread use in biochemical research for separation and purification of macromolecules, cells and cell particles. In recent years the aqueous two-phase systems have also found applications in various areas of biotechnology, specially when utilising low-cost biphasic systems, as the new aqueous two-phase system based on cashew-nut tree gum and poly(ethylene glycol) (PEG). The exsudate gum from *Anacardium occidentale* is a branched acidic heteropolisaccharide found in brazilian north-western. It's employed locally as a substitute for arabic gum in pharmaceutical uses. Crude gum was collected as natural exsudate from cultivated trees in Pernambuco state. Clear nodules free of bark

were selected to be isolated via ethanol precipitation. Phase diagrams were provided for cashew-nut tree gum and PEG molecular weight of 4000 at pH 6,0, 7,0 and 8,0 25°C. Three different tie-lines were studied. Influence of pH and tie-line length on protein partition were analysed. Protein partition coefficient increased with decrease in tie-line length. Although small, an increase in partition coefficient was observed with pH increase in all tested systems.

**Key words:** aqueous two-phase system, cashew-nut tree gum, liquid-liquid extraction

## Resumo

Os sistemas bifásicos aquosos têm sido largamente utilizados na pesquisa bioquímica para a separação e purificação de macromoléculas, células e partículas celulares. Nos últimos anos, os sistemas bifásicos aquosos também têm encontrado aplicações em diferentes áreas da biotecnologia, especialmente no que se refere à utilização de sistemas alternativos de baixo custo, como o sistema bifásico aquoso constituído por goma de cajueiro e polietileno glicol (PEG). O exsudato de *Anacardium occidentale* consiste num polissacarídeo ácido largamente encontrado no Nordeste brasileiro, onde é empregado como substituto da goma arábica para uso farmacêutico. A goma bruta foi coletada como exsudato natural de árvores cultivadas no estado de Pernambuco. Nódulos livres de cascas foram selecionados para o processo de isolamento da goma, via precipitação por etanol. Foram estabelecidos diagramas de fases para o sistema goma do cajueiro e polietileno glicol 4000 nos pH's 6,0, 7,0 e 8,0 a 25°C. Três diferentes "tie-lines" foram estudadas. Analisou-se a influência do pH e do comprimento das "tie-lines" no coeficiente de partição da proteína. O coeficiente de partição da proteína aumentou com a diminuição do comprimento da "tie-line". Embora discreto, houve um aumento do coeficiente de partição com o aumento do pH em todos os sistemas testados.

**Palavras-chave:** sistemas bifásicos aquosos, goma do cajueiro, extração líquido-líquido

<sup>1</sup>Departamento de Sistemas Químicos e Informática-UNICAMP,  
<sup>2</sup>Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, LIKA-UFPE,  
<sup>3</sup>Departamento de Química-UNICAP,  
<sup>4</sup>Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - UFRPE

## INTRODUÇÃO

A extração líquido-líquido, utilizando-se sistemas de duas fases aquosas, tem sido um tópico de grande interesse nestes últimos anos e foi primeiramente descrito na literatura por Beijerinck (1896), quando se descobriu que gelatina, ágar e água misturados a certas concentrações formavam um sistema bifásico. Por volta dos anos 50, ALBERTSSON descobriu que polietileno glicol (PEG), fosfatos de potássio e água, assim como PEG, dextran e água formavam sistemas de duas fases (DIAMOND & HSU, 1992). Entre os sistemas bifásicos aquosos mais estudados em partição aquosa, destaca-se o sistema PEG-dextran, que apresenta, no entanto, o grande inconveniente do elevado custo do dextran. Esse polímero pode ser obtido por um processo fermentativo ou, diretamente, por síntese enzimática e por síntese química (HARRIS & YALPANI, 1985). Porém quase todas as preparações comerciais são obtidas pela via fermentativa, e esta, por sua vez, representa um elevado custo. Para combater a falta de competitividade econômica dos sistemas bifásicos constituídos por dextran e PEG, tem-se recorrido, quase exclusivamente, a sistemas PEG-sais. Sistemas bifásicos PEG-sais apresentam, no entanto, alguns problemas que limitam a sua aplicabilidade. Esses sistemas se formam com elevadas concentrações de sal em ambas as fases, o que pode causar a desnaturação de estruturas biológicas (LIN et al., 1996; KULA, 1989). Outra forma de evitar o inconveniente do elevado custo associado ao sistema PEG-dextran reside na utilização de polímeros alternativos. Nos últimos anos, um elevado número de polímeros tem sido testado com vistas à aplicação em sistemas bifásicos aquosos.

O extrato do cajueiro, produzido pela *Anacardium occidentale*, planta nativa do Nordeste brasileiro, consiste num heteropolissacarídeo ramificado (arabinogalactana ácida) exsudado naturalmente do tronco e ramos da árvore como uma goma ou resina de coloração amarelada e solúvel em água, a qual apresenta um grande potencial de industrialização (PAULA & RODRIGUES, 1995). Existem estudos da goma do cajueiro com árvores brasileiras, destacando-se o estado do Ceará como maior

produtor do país (RODRIGUES et al., 1993; PAULA & RODRIGUES, 1995). A goma do cajueiro é constituída principalmente por unidades de galactose, arabinose, glicose, ácido urônico, manose e xilose. Estudos recentes (PAULA & RODRIGUES, 1995) sobre propriedades reológicas da goma do cajueiro mostraram que esta é uma goma de baixa viscosidade e encontra dentro dos valores exigidos para a formação de uma dispersão de fases adequada para aplicação em sistemas bifásicos. No presente trabalho, estudou-se a partição de uma proteína modelo em um novo sistema bifásico aquoso de baixo custo, constituído por goma de cajueiro e polietileno glicol (PEG).

## MATERIAIS E MÉTODOS

**Polímeros:** polietileno glicol 4000, peso molecular  $3,5-4,5 \times 10^3$ , foi obtido da Sigma Chemical Co (St. Louis, Mo, USA). A goma foi coletada como exsudato natural de árvores de *Anacardium occidentale* de diferentes localidades do estado de Pernambuco.  
**Proteínas:** albumina de soro bovino (BSA), de peso molecular 66.500-67.500 Da (pI= 5,1), foi obtida da Sigma Chemical Co (St. Louis, Mo, USA).

**Isolamento da goma:** a goma bruta (isenta de cascas e folhas) foi submetida ao método de DELGLOBO (1993) modificado: a goma foi triturada e dissolvida em solução aquosa a 20%, sendo filtrada em tela de serigrafia e precipitada com etanol comercial (3x vol.). O precipitado assim obtido foi deixado em repouso "overnight" a 4°C e novamente filtrado e lavado com etanol concentrado. O precipitado assim obtido foi submetido à secagem em estufa a 35°C. O processo permitiu um rendimento de 85-90% em goma.

**Preparação dos sistemas bifásicos aquosos:** foram preparados sistemas de duas fases aquosas, goma do cajueiro e PEG em tubos de centrifuga graduados (15 ml), massa total de 8g, por pesagem das quantidades apropriadas de soluções concentradas de PEG (50% p/p) e goma do cajueiro (30% p/p) em tampão fosfato, de forma a obter os pH's desejados (6,7 e 8), obedecendo à relação entre fosfato monobásico e dibásico. O conteúdo desses tubos foi agitado num vórtex e, em seguida, centrifugados a 500 rpm, durante 5 minutos.

**Determinação dos diagramas de fases:** os diagramas de fases foram estabelecidos, tendo como base a metodologia desenvolvida por ALBERTSSON (1986): sistemas obtidos experimentalmente pela mistura de diferentes concentrações de polietileno glicol e goma do cajueiro foram submetidos à análise de PEG e goma em ambas as fases. Dessa forma, uma série de composições perto da curva de equilíbrio de fases (binodal) foi obtida e a concentração dos polímeros plotada fornecendo a binodal do sistema. Como convenção, a concentração do polímero que se distribui favoravelmente na fase inferior é plotada na abscissa e a concentração do polímero que se distribui preferencialmente na fase superior é plotada na ordenada. Após a determinação do diagrama, três "telas" de trabalho para todos os pH estudados foram selecionadas: goma 18%-PEG 9%, goma 20%-PEG 11% e goma 22%-PEG 13%.

**Hidrólise do polissacarídeo:** para as análises dos monossacarídeos presentes num polissacarídeo, é usual efetuar sua hidrólise. A um tubo de ensaio rosqueado adicionaram-se 5g de amostra devidamente diluídas e 1 ml de ácido sulfúrico concentrado. Essa solução foi agitada e colocada em banho a 100°C, durante 60 min. Após a hidrólise, as amostras foram resfriadas à temperatura ambiente e neutralizadas a pH 6-7 pela adição de NaOH. Após a neutralização, o volume do hidrolisado foi completado para 25 ml em balão volumétrico e a concen-

tração de açúcares redutores determinada pelo método de MILLER (1959).

**Análise dos constituintes do sistema:** a concentração de PEG foi determinada de acordo com o método desenvolvido por SKOOG (1979). O conteúdo de carboidratos da goma do cajueiro foi determinado pelo método de DNS (MILLER, 1959).

**Partição da proteína:** 500µl de albumina de soro bovino (2mg/ml) foram adicionados aos tubos e o conteúdo agitado num vórtex e, em seguida, centrifugados a 500 rpm, durante 5 minutos. A concentração de proteína na fase superior foi determinada segundo BRADFORD (1976). Dada a maior viscosidade da fase inferior (goma) dos sistemas bifásicos em estudo, a concentração de proteína na fase inferior foi determinada por balanço material a partir das concentrações de proteína determinadas para a fase superior e para a solução concentrada de proteína adicionada inicialmente. Em seguida, determinou-se o coeficiente de partição da proteína (K), definido como a razão entre a concentração de proteína na fase superior (PEG) e inferior (goma do cajueiro).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os diagramas de fases do sistema PEG4000/goma do cajueiro nos diferentes pH estão apresentados na **Figura 1**.

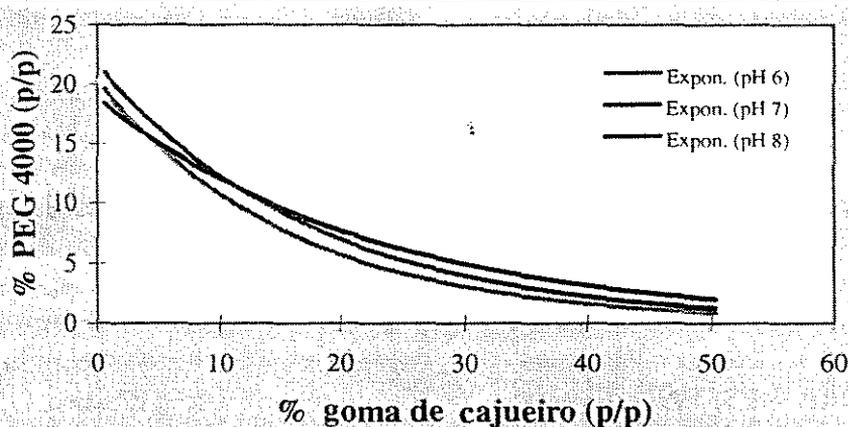


Figura 1- Diagramas de fases do sistema PEG4000/goma do cajueiro nos pH's 6,7, e 8.

Analisando-se o comportamento do sistema frente aos diferentes pH's, não houve um deslocamento das binodais. Ainda não foram encontrados na literatura dados acerca da influência desse parâmetro sobre a binodal em sistemas polímero/polímero, o que nos leva a acreditar na estabilidade desses sistemas frente a variações do pH.

Devido à complexidade dos fenômenos de partição, é difícil prever o comportamento da proteína e selecionar as condições de separação para se planejar um experimento (HACHEM, ANDREWS & ASENJO, 1996).

Analisando-se a influência do comprimento da "tie-line" para o mesmo pH no coeficiente de partição da albumina, observou-se uma tendência à diminuição do coeficiente de partição com o aumento da "tie-line" para os três valores de pH testados (Figura 2). Os resultados da influência da "tie-line" no coeficiente de partição encontrados na literatura para sistemas polímero/polímero obedecem ao mesmo perfil. Estudos realizados com a cutinase em sistema PEG 8000/hidroxipropilamido bruto demonstraram um leve decréscimo com o aumento da "tie-line". Esse aumento da partição se deve ao aumento da concentração de PEG, que causa a exclusão molecular da proteína da fase superior (ALMEIDA et al., 1998).

STURESSON, TJERNELD & JOHANSSON (1990) estudaram o efeito da concentração do polímero na partição da glicose 6-P-desidrogenase e lactatodesidrogenase em sistemas PEG8000/Aquaphase PPT. Assim como no sistema PEG/Dextran, as enzimas se concentraram, preferencialmente, na fase inferior, com o aumento da "tie-line".

Vale salientar, entretanto, que um comportamento diferente também pode ocorrer, pois outros efeitos podem estar envolvidos. Por exemplo, além do efeito da exclusão PEG, deve ser considerada também a afinidade da proteína pela fase hidrofóbica, que pode ser mais pronunciada, levando a um comportamento contrário na partição (ALMEIDA et al., 1998).

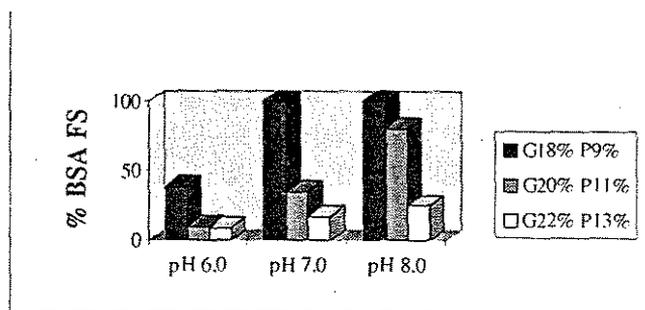


Figura 2 - Partição de albumina de soro bovino (BSA) no sistema PEG 4000/goma do cajueiro nos pH's a 25° C (FS = fase superior)

O pH é um fator crucial no comportamento da partição de uma dada proteína e deve estar sempre relacionado com o ponto isoelétrico da mesma. Analisando-se os diferentes pH's (6,0, 7,0 e 8,0), observou-se que o aumento do pH provocou uma leve tendência para a albumina de soro bovino se particionar mais na fase superior, na "tie-line" mais curta (Figura 2). VENÂNCIO e colaboradores (1995) realizaram estudos de partição de albumina de soro bovino em sistemas PEG/ Goma de guar, em condições semelhantes às descritas neste trabalho, para dois PEG's (4000 e 8000) nos pH's 6,0, 6,8 e 8,0. Os resultados demonstraram um leve aumento no coeficiente de partição com o aumento do pH em todos os sistemas testados. VENÂNCIO e colaboradores (1995) ainda reportaram que as interações hidrofóbicas são maiores no pH perto do ponto isoelétrico da proteína. Para a albumina, cujo ponto isoelétrico é de 5,1, nota-se uma variação significativa do coeficiente de partição do pH6 para os demais, já que esse pH se encontra mais próximo do ponto isoelétrico da proteína.

## AGRADECIMENTOS

À UNICAP pelo suporte técnico e FAPESP, CNPq, PRONEX e PADCT pelo apoio financeiro.

G.M. Campos-Takaki

Rua do Príncipe, 525, Boa Vista, Recife-PE-Brasil, CEP 50050-900, e-mail: takaki@unicap.br

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTSSON, P. A. Partition of cell particles and macromolecules. 3 ed. New York : J. Wiley, 1986.
- ALMEIDA, et al. Cutinase purification on poly (ethylene glycol)-hydroxypropyl starch aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B*, v. 711, p. 151-159, 1998.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.
- DELGLOBO, O. L. Estudo parcial do polissacarídeo do exsudato de *Anadenanthera colubrina* (angico branco). Curitiba, 1993. 125p. Tese (Mestrado). Dep. de Bioquímica, UFPR, 1993, 125p.
- DIAMOND, A. D., HSU, J.T. Aqueous two phase systems for biomolecule separation. *Advances in Biochemistry Engineering*, v. 47, p. 89-135, 1992.
- HACHEM, F., ANDREWS, B. A., ASENJO, J. A. Hydrophobic partitioning of proteins in aqueous two-phase systems. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 19, p. 507-517, 1996.
- HARRIS, J. M., YALPANI, M. Polymer-ligands used in affinity partitioning and their synthesis. In: WALTER, H., BROOKS, D. E., FISHER, D. (Ed.) *Partition in aqueous two-phase systems*. Orlando : Academic, 1985. p. 589-625,
- KULA, M. R. Large scale protein recovery using aqueous phase systems. In: FISHER, D. E., SUTHERLAND, I. A. (Ed.) *Separations using aqueous phase systems*. Londres : Phenom, 1989. p. 295-298.
- LIN, D. Q., ZHU, Z. Q., MEIL, H. Affinity extraction of lactate dehydrogenase by aqueous two-phase systems using free triazine dyes. *Biotechnology techniques*, v.10, p. 41-46, 1996.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, p. 426-428, 1959.
- PAULA, R. C. M.; RODRIGUES, J. F. Composition and rheological properties of cashew tree gum, the exudate polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. *Carbohydrate. polymers*, v. 26, p. 177-181, 1995.
- RODRIGUES, J. F.; PAULA, R. C. M.; COSTA, S. M. O. Métodos de isolamento de gomas naturais: comparação através da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.). *Polímeros : ciência e tecnologia*, v. 3, n. 1, p. 31-36, 1993.
- SKOOG, B. Determination of polyethylene glycols 4000 and 6000 in plasma protein preparations. *Journal of Blood Transfusion Immunohaematology Immunopathology*, v. 37, n. 6, p. 345-349, 1979.
- STURESSON, S., TJERNELD, F., JOHANSSON, G. Partition of macromolecules and cell particles in aqueous two-phase systems based on hydroxypropyl starch and poly(ethylene glycol). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, p. 281-295, 1990.
- VENÂNCIO, A., et al. Protein partition on a derivative guar gum based aqueous two-phase system, *Bioseparation*, v. 5, p. 253-258, 1995.

# Protein mass transfer studies on a perforated rotating disc contactor using the PEG-Cashew nut tree gum aqueous two-phase system

L.A. Sarubbo<sup>a</sup>, L.A. Oliveira<sup>a</sup>, A.L.F. Porto<sup>b,c</sup>, J.L. Lima-Filho<sup>b</sup>, G.M. Campos-takaki<sup>d</sup>, E.B. Tambourgi<sup>a,\*</sup>

*DESQ-FEQ, UNICAMP, Campinas-SP-Brasil CxP-6066-CEP13081<sup>a,\*</sup>*  
*Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami-UFPE Recife-PE-Brasil<sup>b</sup>*  
*Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal-UFRPE, Recife-PE-Brasil<sup>c</sup>*  
*Departamento de Química-UNICAP, Recife-PE-Brasil<sup>d</sup>*

**Abstract** The characterisation of bovine serum albumin (BSA) mass transfer mechanisms in a perforated rotating disc contactor (PRDC) using an aqueous two-phase system composed of poly(ethylene glycol) and a polysaccharide, the Cashew nut tree gum, was described. The poly(ethylene glycol) rich phase was used as the dispersed phase and protein transfer took place from the dispersed to the continuous phase. The effect of dispersed phase velocity, system composition and discs rotation speed on either protein mass transfer coefficients or column holdup was studied. We found that the dispersed phase holdup and the overall mass transfer coefficient increased with increasing the dispersed phase velocity and discs rotation speed. The increase in system composition (tie-line length) decreased the protein mass transfer coefficient.

**Key words:** PRDC, liquid-liquid extraction, rotating disc contactor, mass transfer coefficients

## List of symbols

$C$ - concentration of BSA in phosphate-rich phase (mg/ml)

$C_u$ - concentration of BSA in PEG-rich phase (mg/ml)

$C_{ui}$ - concentration of BSA in PEG-rich phase at the column inlet (mg/ml)

$C_{uo}$ - concentration of BSA in PEG-rich phase at the column outlet (mg/ml)

$H$ - dispersed phase holdup

$K_{da}$ - mass transfer coefficient ( $\text{min}^{-1}$ )

$K$ - partition coefficient

$VD$ - dispersed phase velocity (ml/min)

## 1 Introduction

The application of aqueous two-phase systems to the large-scale purification of proteins implies the consideration of continuous counter-current operation in the design of such a process (Joshi et al., 1990). This mode of operation may reduce fixed and variable costs, increase space-time yield, maintain high yields of labile proteins and allow process automatization and the continuous recycling of process chemicals (Hustedt and Papamichael, 1988). Single or multi-stage equipment of conventional liquid-liquid extraction can be applied for extraction using aqueous two-phase systems (ATPS). Mixer-settler designs have been successfully operated continuously, offering one theoretical stage for protein purification (Papamichael et al., 1992). Multi-stage installations were described by use of spray, York-Scheibel, packed bed or pulsed sieve plate columns (Save et al., 1993; Patil et al., 1991).

Another tool for liquid-liquid extractions is the rotating disc contactor (RDC). Reman (1951) first proposed the use of an RDC, which was composed of a cylindrical tube with spaced stator discs and plain rotating discs, each pair constituting a “stage”. Reman (1951) found that flood conditions in the column were strongly dependent on the liquid system (two-phase) and that mass transfer efficiency of each stage did not change with scale-up.

Several authors studied both geometric and structural aspects of rotating discs contactors with plain discs. Laddha et al. (1978), for example, studied the hydrodynamics for systems with and without mass transfer.

Perforated rotating discs were used by Pope and Shah (1971). The perforated rotating disc contactor (PRDC) with stator rings was similar to the RDC studied by Reman (1951). Pope and Shah (1971) found that the perforations cause an increase in mass transfer rates and efficiency. Tambourgi (1989) using a PRDC without stator rings studied in detail the effect of perforated area in rotating discs on the hydrodynamic behaviour, axial dispersion, flooding conditions and power consumption.

Only a small number of ATPS have been tested in PRDC. Reported results refer to PEG-salt systems (Porto et al., 1997; 2000). In order to design a PRDC for protein separation, data on mass transfer coefficients of the protein and dispersed phase holdup is required.

In this work, the characterisation of BSA mass transfer in a laboratory PRDC using a new and inexpensive polymer-polymer system the PEG-Cashew nut tree gum system previously described (Sarubbo et al., 2000), is reported. BSA mass transfer takes place from the PEG-rich phase to the Cashew nut tree gum-rich phase. The PEG-rich phase will be used as the dispersed phase.

## **2 Materials and methods**

### **2.1 Chemicals**

Crude gum was collected as natural exudate from cultivated *Anacardium occidentale* trees of various localities in Pernambuco State, Brazil. Common-type plants about 20 years old yellow cashew producers were utilised. Poly (ethylene glycol) (PEG) 4000 was obtained from Sigma Chemical Co (St. Louis, Mo, USA). All other chemicals were analytical grade.

### **2.2 Protein**

Bovine serum albumin (BSA) with a molecular weight of 67 500 was obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA).

### **2.3 Purification of gum**

Clear nodules free of bark were selected to be purified *via* ethanol purification by use of the Rinaudo-Millas method previously described (1991).

### **2.4 Preparation of phase systems**

Phase systems (700g) were prepared by weighing quantities of stock solutions of the polymers in water, 30% (w/w) cashew-nut tree gum and 50% (w/w) PEG. The polymers

solutions were weighed out and mixed with water and phosphate buffer (pH 6.0). The buffer concentration was 15 mM. The partition experiments were performed at room temperature ( $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ ). The mixture of the components was stirred for 1 hours to equilibrate. Two tie-line lengths were studied: the first, 18% (w/w)PEG4000 / 9% (w/w) Cashew-nut tree gum and the second, 20% (w/w)PEG4000 / 11% (w/w) Cashew-nut tree gum

## 2.5 Experimental apparatus

The perforated rotating disc contactor was made of Perspex tube 32-mm i.d and 16 mm high. Three perforated discs equally separated were mounted on a central shaft, which was rotated at different velocities (60, 140 and 220 rpm). The perforated discs were 30 mm in diameter and drilled with 06 holes of 60-mm diameter (disc free area for flow 21 %). the column was maintained at room temperature ( $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ ).

## 2.6 Experimental procedure

Fractional holdups of the dispersed phase (PEG) and the mass transfer coefficients were measured in a perforated rotating disc contactor (PRDC) for different dispersed phase velocities. The column was operated in a continuous mode. The flow rates of dispersed, continuous, raffinated and extracted phases were maintained constant by using two multi channel peristaltic pumps with a flow of 1.0 ml/min for the continuous phase while the dispersed phase velocity varied for values of 2.0, 3.0 and 5.0 ml/min. The samples were collected from the extracted and raffinated phases at 10, 20, 30, 40, 50 and 55 minutes.

## 2.7 Dispersed phase holdup determination

To determine the fractional dispersed phase holdup ( $H$ ), the total volume of the aqueous two-phase system and the volume of dispersed phase were measured after the steady state was achieved. The fractional holdup of the PEG phase was calculated from the expression:

$$H = \frac{\text{volume of dispersed phase}}{\text{volume of the aqueous two-phase system}}$$

## 2.8 Partition coefficient determination

The partition coefficients, which were need to compute overall mass transfer coefficients, were determined by the mean of the partition coefficients determined from the samples of the raffinated and extracted phases collected after steady state was achieved. The BSA content was determinate by the Bradford method (1976).The partition coefficient ( $K$ ) was calculated as:

$$K = C_u/C$$

Where  $C_u$  and  $C$  are the concentration of BSA in the raffinated (PEG) and extracted (Cashew-nut tree gum) phases, respectively.

## 2.9 Mass transfer determination

To determine mass transfer coefficients, in addition to measure partition coefficients, the transfer rate of BSA from the PEG phase to the Cashew nut tree gum phase needed to be measured. This was done by monitoring the concentration of BSA at the inlet and outlet of the column. BSA was directly dissolved in the PEG-dispersed phase to a final concentration of (2mg/ml). This solution was then pumped at a known flow rate. Samples of the phases were collected and analysed for BSA content.

The mass transfer coefficient was expressed in terms of the concentrations by following a simple material balance:

$$K_{da} = L/V [( \ln C_{ui} - KC ) / ( C_{uo} - KC )]$$

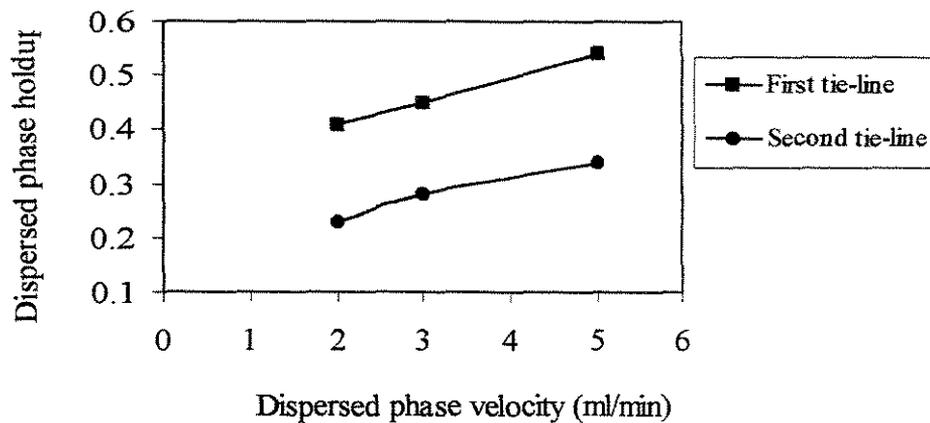
Where  $L$  is the PEG phase flow rate (ml/min),  $V$  is the dispersion volume (ml),  $K_{da}$  is the mass transfer coefficient ( $\text{min}^{-1}$ ),  $C_{ui}$  and  $C_{uo}$  are the concentrations of BSA in the PEG phase at the column inlet and outlet (mg/ml), respectively;  $C$  is the concentration of BSA in Cashew nut tree gum -rich phase (mg/ml) and  $K$  is the protein partition coefficient.

## 3 Results and discussion

### 3.1 Influence of the dispersed phase velocity on the dispersed phase holdup

Our experiments describing PRDC hydrodynamics were based on “holdup” measurements. This parameter describes the amount of solvent actually available to remove the desired product from the feed. In this specific case, holdup signifies the percentage of Cashew nut tree gum-rich phase capable of extracting BSA from the PEG-rich phase. Thus measurements of holdup are valuable for the estimation of the mass transfer capabilities of an extraction unit under defined conditions.

The effect of dispersed phase velocity ( $VD$ ) was studied for values of 2.0, 3.0 and 5.0 ml/min. Figure 01 shows the dispersed phase holdup ( $H$ ) values for both PEG-Cashew nut tree gum systems studied in this work. It can be observed that the PEG phase holdup increased with increasing PEG phase velocity for both systems. Kumar and Hartland (1982) indicate that the drop size decreases with an increase in  $VD$ . Therefore, an increase in  $VD$  increases the numbers of drops and leads to an increase in the values of  $H$  (Jafarabad et al., 1992a., 1992b). These results are similar to those described by Sawant and Sikdar, (1990) and Raghav Rao et al. (1991). Similar effects were observed in other multiphase contactors such as bubble columns, slurry reactors, air-lift loop reactors, fluidised beds and spray columns (Jafarabad et al., 1992a., 1992b; Venâncio and Teixeira, 1995). More recently, we also observed such behaviour for cytochrome b5 continuous extraction using a similar contactor used in this work (Porto et al., 1997).

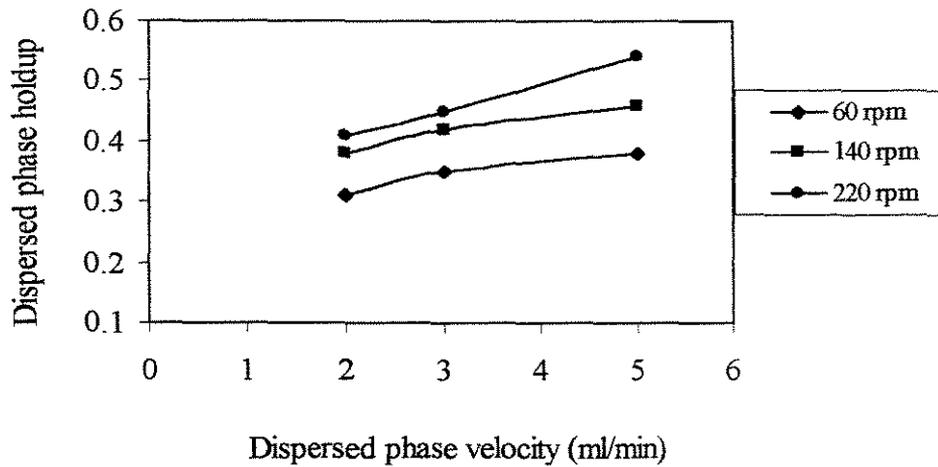


**Figure 01**– Influence of the dispersed phase velocity on the dispersed phase holdup in PRDC for 9%PEG4000-18%Cashew nut tree gum (first tie-line) and 11%PEG4000-20%Cashew nut tree gum (second tie-line) systems

### 3.2 Influence of disc's speed rotation on the dispersed phase holdup

The influence of the discs rotation speed were investigated at different velocities (60, 140 and 220 rpm). All the results were obtained under steady state conditions of flow rates of both phases and rotation speed of discs. The results show (Figure 02) that holdup increased with the increase of the rotation speed of the discs. These results are in accordance with the results obtained by Porto et al., (1997) for cytochrome b5 extraction in a similar PRDC with PEG-phosphate systems.

It was not possible to determine the influence of the discs rotation speed on the holdup for the second tie-line length, once flooding occurred for velocities of 60 and 140 rpm. According to Reman (1951), probably, the cashew nut tree gum-rich phase viscosity (data not shown) did not permit the phases mixing. Also, the flow resistance imposed by these low discs rotation speed caused entrainment of the continuous phase.

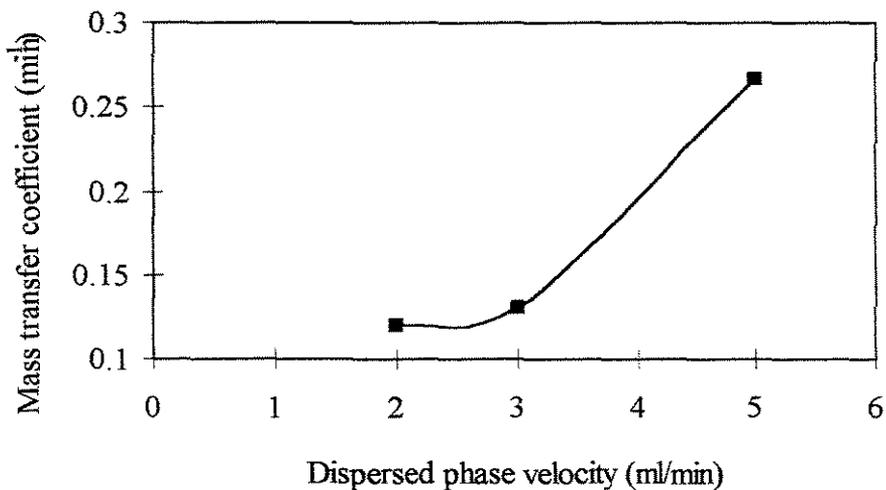


**Figure 02**– Influence of disc’s speed rotation on the dispersed phase holdup in PRDC for 9%PEG4000-18%Cashew nut tree gum system

### 3.4 Influence of the dispersed phase velocity on the mass transfer coefficient

The influence of the dispersed phase velocity on the mass transfer coefficient was also studied.

As can be seen in Figure 03 an increase in dispersed phase velocity leads to an increase in mass transfer. This result is similar to results described for other ATPS (Sawant et al., 1990; Raghav Rao et al., 1991; Venâncio and Teixeira, 1995) and may be explained by a decrease in drop size for the largest superficial velocity results in an increase in the holdup.

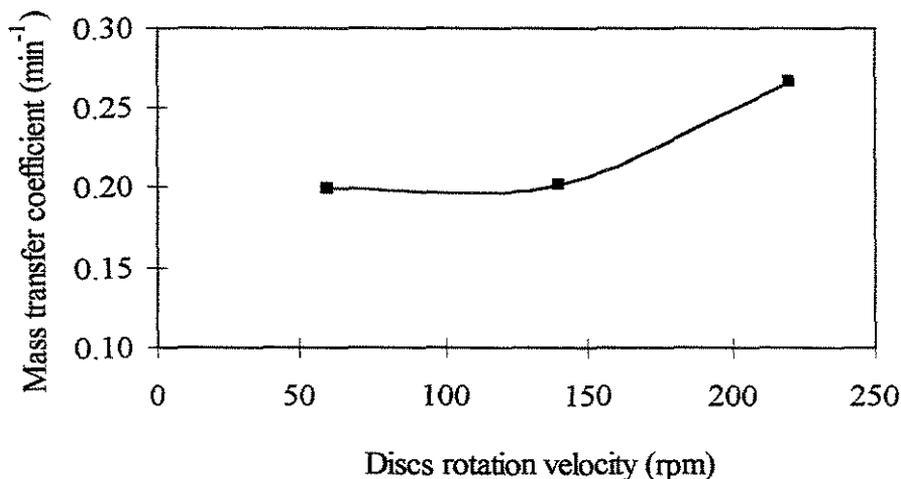


**Figure 03**– Influence of the dispersed phase velocity on the BSA mass transfer coefficients in PRDC for 9%PEG4000-18%Cashew nut tree gum system

### 3.5 Influence of disc's speed rotation on the mass transfer coefficient

Figure 04 shows the influence of disc's speed rotation on the mass transfer coefficient. It can be observed an increase of mass transfer coefficients with an increase in disc's speed rotation.

The increase in rotation velocity improves the mixture between the phases and increases the interfacial area by decreasing the drop size, promoting high mass transfer values, which are directly proportional to the interfacial area. On the other hand, for a PRDC operating with PEG-salt systems, the mass transfer coefficients were independent of the discs rotation speed (Porto et al., 1997).



**Figure 04**– Influence of disc's speed rotation on the BSA mass transfer coefficients in PRDC for 9%PEG4000-18%Cashew nut tree gum system

### 3.6 Influence of system composition on the mass transfer coefficient

The influence of system composition was studied for two tie-lines length, as described before. Results showed a mass transfer coefficient of  $0.267 \text{ min}^{-1}$  and  $0,239 \text{ min}^{-1}$  for the first and second tie-lines, respectively.

The increase in system composition increase density and viscosity difference between phase. Also as described by Forciniti et al., (1990) interfacial tension increases with increasing polymer concentration. The overall effect of the increase in phases viscosity results in a reduction in protein diffusivity and the film thickness for mass transfer coefficients are smaller for the largest tie-line. Other authors also observed that systems with higher viscosities showed minor mass transfer coefficient values when studying BSA extraction in spray columns with polymer-polymer systems (Venâncio and Teixeira, 1995; Raghav Rao et al., 1991).

## 4 Conclusions

The characterisation of the performance of a PRDC using the PEG-Cashew nut tree gum system for BSA continuous extraction was done.

The perforated rotating disc contactor proved to be an extraction unit well suited for work with aqueous two-phase systems. The main advantage of the PRDC is that the phases separate without the need of a centrifuge.

It is clearly demonstrated that dispersed phase velocity, discs rotation speed and the system composition are very important factors on protein transfer. As expected, the dispersed phase holdup and the overall mass transfer coefficient increased with increasing the dispersed phase velocity and discs rotation speed. The increase in tie-line length decreased the mass transfer coefficients.

## 5 Acknowledgements

This work was carried out with financial support by FAPESP and CNPq/PRONEX.

## 6 References

- Bradford, M.M.** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding, *Anal. Biochem*, 72 (1976) 248-254
- Forciniti, D., Hall, C.R., Kula, M.R.** Interfacial tension of polyethylene glycol-dextran-water systems: influence of temperature and polymer molecular weight, *J. Biotechnol.* 16 (1990) 279-296
- Hustedt, H., Papamichael, N.** *Enzyme Engineering*, 9 (1988) 137
- Jafarabad, K.R., Sawant, S.B., Joshi, J.B., Sidkar, S.K.** Enzyme and protein mass transfer coefficient in aqueous two-phase systems. II- York-scheibel extraction columns, *Chem. Eng. Sci.* 47 (1992) 69-73
- Jafarabad, K.R., Sawant, S.B., Joshi, J.B., Sidkar, S.K.** Enzyme and protein mass transfer coefficient in aqueous two-phase system. I- Spray extraction columns, *Chem. Eng. Sci.* 47 (1992) 57-68
- Joshi, J.B., Sawant, S.B., Raghav Rao, K.S.M.S., Patil, T.A., Rostami, K.M., Sidkar, S.K.** *Bioseparation*, 1, (1990) 311
- Kumar, A., Hartland, S.** Prediction of drop size produced by a multiorifice distributor, *Trans. Inst. Chem. Engrs* 60 (1982) 35-39
- Laddha, G. S., Degaleesan, T. E., Kannappan, R.** Hydrodynamics and mass transport in rotary disk contactors. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 56 (1978) 137-150
- Papamichael, N., Borner, B., Hustedt, A.** Continuous aqueous-phase extraction of proteins - automated processing and recycling of process chemicals. *Journal of Chemistry Technology and Biotechnology*, 54 (1992) 47-55
- Patil, T. A., Jafarabad, K. R., Sawant, S. B., Joshi, J. B.** Enzyme mass transfer coefficient in aqueous two-phase system using a Packed extraction column, *Canadian Journal of Chemical Engineering*, 69 (1991) 548-556
- Pope, B. J., Shah, N. R.** An improved contactor for liquid-liquid extraction. *International Solvent Extraction Conference*, (1971) 699-710

- Porto, A. L. F. , Sarubbo, L. A., Lima-Filho, J.L., Aires-Barros, M.R., Cabral, J. M.S., Tambourgi, E.B.** Hydrodynamics and mass transfer in two- phase aqueous extraction using a perforated rotating disc contactor. (Bioprocess Engineering - NO PRELO, n. 1045), 2000.
- Porto, A. L.F., Lima-Filho, J.L., Aires-Barros, M.R., Cabral, J. M.S., Tambourgi, E.B.** Extraction of recombinant cytochrome b5 from disrupted *Escherichia coli* cells with an aqueous two-phase system in a continuous perforated rotating contactor, Appl. Biochem. Biotech, 60 (1997) 114-122
- Raghav Rao, K.S.M., Szlag, D.C., Sidkar, S.K., Joshi, Sawant, S.B.** Protein extraction in a column using a polyethylene glycol-maltodextrin two-phase polymer system, Chem. Eng. J. 46 (1991) B75-B81
- Reman, G. H.** A new efficient extraction apparatus: the rotating disc contactor. Proceedings Third World Petroleum Congress, (1951) 121-131
- Rinaudo, M., Milas, M.** "Polieletrólitos", ed R.A.M.C. Groote e A.A.S. Curvelo, USP, São Carlos, 1991.
- Sarubbo, L. A., Oliveira, L. A., Porto, A. L. F., Duarte, H. S., Carneiro-Leão, A. M. A., Lima-Filho, J. L., Campos-Takaki, G. M., Tambourgi, E. B.** New aqueous two-phase system based on cashew-nut tree gum and polyethylene glycol. Journal of Chromatography B (CRHOMB10657), 2000.
- Save, S.V., Pangarkar, V.G., Kumar, S.V.** Intensification of mass transfer in aqueous two-phase systems. Biotechnol. Bioeng. 41 (1993) 72-78
- Sawant, S.B., Sikdar, S.K.** Hydrodynamics and mass transfer in two-phase aqueous extraction using spray columns, Biotechnol. Bioeng. 36 (1990) 109-115
- Tambourgi, E. B.** Estudo da hidrodinâmica de uma coluna de discos rotativos. Tese de Doutorado em Engenharia Química-Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989.
- Venâncio, A ., Teixeira, J.A .** Protein mass transfer studies on spray column using the PEG-Reppal PES 100 aqueous two-phase system, Bioprocess Eng. 13 (1995) 251-255

# Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq

Programa e Resumos da XXVIIIª Reunião Anual

Hotel Glória  
Caxambu, MG  
22 a 25 de maio de 1999

## T - 01

A POSSIBLE NON-MUSCARINIC MECHANISM INVOLVED IN *Phonocilia nigriventer*-INDUCED RELEASE OF NITRIC OXIDE IN RAT MESENTERIC ARTERIAL RINGS.

Weinberg, M. L. D.<sup>1</sup>; Corgelro, M. N.<sup>2</sup>; DeLima, M. E.<sup>3</sup> and Diniz, C. R.<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>Dep. of Physiology and <sup>2</sup>Dep. of Biochemistry, Biological Science Institute, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, M.G.; <sup>3</sup>Ezequiel Dias Foundation, Belo Horizonte, M.G.

In a recent communication we described that a fraction from *Phonocilia nigriventer* spider venom releases nitric oxide from rat aortic rings. Due to this property we named this venom fraction as NORF - standing for Nitric Oxide Releasing Fraction. In the present study we describe further observations about the effect of NORF on rat mesenteric arterial rings (MAR). The venom was obtained and first fractionated as described by Rezende Jr. et al. (1991). Fraction P4 was again fractionated by gel filtration in Superose 12 (FPLC). The first of these sub-fractions is NORF, as above characterized. Procedures for preparing MAR, mounting them in organ chambers, recording isometric contraction force and assaying drugs were similar to those we used in published studies and also similar to the most commonly used by other authors. To observe relaxing effect a MAR was first contracted with  $10^{-6}$  M phenylephrine (PE). In some experiments N<sup>o</sup>-nitro-arginine methyl ester (L-NAME) was added to the organ chamber prior to venom addition. pA<sub>2</sub> evaluations were performed as described by Schild (1947) modified by adding the antagonist (Atropine) to the nutritive solution only 4 minutes before ACh or NORF. Experimental procedures were repeated with 6 to 12 animals and results were statistically compared. NORF induced dose-dependent relaxation of PE pre-contracted MAR. No relaxation was induced by ACh nor by NORF in endothelium denuded rings. L-NAME ( $10^{-6}$  M) completely blocked NORF-induced relaxation. Concentration-response line for NORF-induced relaxation had no statistical deviation of parallelism with concentration-response line for ACh-induced relaxation. pA<sub>2</sub> value for Atropine-ACh was  $9.78 \pm 0.06$  (n=11) and for Atropine-NORF was  $8.53 \pm 0.30$  (n=7) (P < 0.01). These observations suggest that NORF induces dose-dependent liberation of nitric oxide from MAR endothelium and that a non-muscarinic mechanism might be involved in this effect.

## T - 03

BIOCHEMICAL CHANGES IN MUSSEL *Perna perna* SUBMITTED TO DEPURATION AFTER LONG-TERM EXPOSURE TO CONTAMINATED SITE

Medeiros, I.D.; Ventura, E.C.; Müller, L.C. and Balny, A.C.D.  
 Departamento de Bioquímica - C.C.B. - UFSC - Florianópolis - SC

Several authors propose the use of mussels as sentinel organisms in environmental monitoring programs, since they are sessile, filter-feeders and possess good tolerance to adverse conditions. However there is a controversy concerning the analysis of biomarkers in these organisms to express the impact of pollutants, because they are apparently less responsive to pollutants than other organisms. The purpose of this study is to analyze some biochemical responses in the digestive gland (DG) of mussels translocated from a "contaminated" (CS) to a "non-contaminated" site (NCS). The mussels were kept 11 months at the CS, before being translocated and submitted to depuration at Ilha de Raton Grande (NCS). After 7, 14 and 28 days, mussels from both sites were killed and the DG was isolated and immersed in liquid nitrogen. The DG was homogenized and centrifuged in order to obtain the cytosolic fraction in which the activity of catalase (CAT), glutathione transferase (GST) and glucose-6 phosphate dehydrogenase (G6PDH) were determined according to conventional procedures. A group was kept at the CS to compare the results. No significant changes in the activity of G6PDH were observed in the mussels kept at the NCS during the experiment. It was observed an increased CAT activity in both groups after 28 days. The activity of GST, an important xenobiotic conjugating enzyme, was significantly higher (104 %) only in the mussels kept at the NCS. These results may be associated to an increased depuration ability of this species when they are submitted to depuration. Additional experiments need to be done to quantify the levels of chemicals in these organisms.  
 Supported by CNPq, FUNPESQUISA 97

## T - 05

STAR ACTIVITY OF BamHI MODULATED BY WATER OF SOLVATATION  
 COVIGLI, U. D. S.  
 UNIRP - SÃO JOSÉ DO RIO PRETO-SP

Class II restriction enzymes presents the ability to recognize and cleave other sites, besides its conventional one (canonical). This additional function is called star activity and it happens mainly in conditions of osmotic stress. In this work we studied the recognition capacity of the enzyme BamHI, for two star sites located in a fragment of 613 base pair FokI restriction fragment from plasmid pUC18. Experiments in polyacrilamide gel of eletroforesis revealed that the cleavage of these sites is differentiated by the enzyme. The canonical site (GGATCC) is totally digested by enzyme in normal conditions or osmotic stress, for two hours of reaction. Already one of those star sites (GGATCT), is recognized partially by enzyme under low cosolvente concentrations and being totally digested in 30% of glicerol. The second star site (GGAACC) presents a cleavage twice smaller than the first, being partially digested. Our results evidence that the substitution of a pyrimidine (T), for a purine (A) in the center of the restriction site it is enough to alter of the enzyme recognition. The substitution of a (C) at the 3' end by another pyrimidine (T), in the end of the site affects less the recognition. We suggested that the osmotic stress causes alterations in the DNA solvation layer, releasing some water molecules to the bulk solution. This entropic contribution induces conformational change in the DNA, increasing the interaction surface between the bases and the enzyme.

## T - 02

## PRELIMINARY STUDY OF A NEW AQUEOUS TWO-PHASE SYTEM BASED ON CASHEW-NUT TREE GUM AND POLYETHYLENE GLYCOL

L.A. Oliveira<sup>1</sup>, L.A. Sarubbo<sup>2</sup>, A.L.F. Porto<sup>2,3</sup>, J.L. Lima-Filho<sup>3</sup>, J.M.L. Monestrina<sup>4</sup>, J. Iacomini<sup>1</sup>, G.M. Campos-Takaki<sup>1</sup>, E.B. Tambourg<sup>1</sup>

1- Departamento de Sistemas Químicos e Informática-UNICAMP; 2- Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal-UFRPE; 3- Laboratório de Imunopatologia Ke Asami, LIKA-UFPE; 4- Departamento de Bioquímica- UFPR; 5- Departamento Química-UNICAMP

Recently, there has been much interest in the use of aqueous two phase systems for commercial purification and concentration of biological fermentation product. Polymer/polymer phase systems are very useful, but commercial exploitation of these products has been restricted by the high cost of dextran used in dextran/PEG phase systems on which most of the literature based. Therefore, there have been a number of attempts to develop other polymer pairs to combine to form phase systems having comparable properties to, but lower costs than dextran/PEG systems. A new aqueous two-phase system based on cashew-nut tree gum, 1 exudate polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. and PEG is described. Crude gum was collected as natural exudate from cultivated *A. occidentale* trees in Pernambuco state. Cit nodules free of bark were selected to be isolated via ethanol precipitation. Phase diagrams for 1 system cashew tree gum and PEG molecular weight of 4000 and 8000 at pH 7.0, 25 °C, were described. Three different "iselines" for each phase-diagram were analyzed for Bovine serum albumin (BSA) partition coefficient determination. The partition coefficient (K) was defined as 1 ratio between BSA in the upper (PEG) and lower (cashew-nut tree gum) phases. BSA partition coefficient increased with decrease in polymer molecular mass. The influence of "iseline" length on protein partition was also investigated. It was observed a decrease in partition coefficient with increase in "iseline" length. Results indicate that this is a potentially useful aqueous two-phase system for protein extraction.

Supported by: FAPESP

## T - 04

LEVELS OF BLOOD LEAD AND *IN VITRO* RESTORATION OF  $\delta$ -AMINOLEVULINIC ACID DEHYDRATASE ACTIVITY BY ZINC DURING PREGNANCY AND LACTATION  
 Pires, J.B.; Miskeley, N.; Anastacio, A.S.; Donangelo, C.M.  
 Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, UFRJ, Rio de Janeiro; <sup>2</sup>Departamento de Química, PUC, Rio de Janeiro.

During pregnancy and lactation, bone turnover increases causing a greater Pb release from bone to blood, 99% bound to red blood cells. Activity of  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase ( $\delta$ -ALA-D) in red blood cells is inhibited by lead and can be restored *in vitro* by addition of zinc. The purpose of this study was to evaluate longitudinal change and relationship of lead levels (Pb-RBC), activity of  $\delta$ -ALA-D and *in vitro* reactivation of  $\delta$ -ALA-D by zinc in red blood cells of women (n=18) examined at the third trimester pregnancy and at two months of lactation. Women were non-occupationally exposed to Pb, non-smokers, non-anemic and with blood Pb <10  $\mu$ g/dL. Levels of Pb were determined by Inductively Coupled Mass Spectroscopy (ICP-MS), of protein by the Lowry method and activity of  $\delta$ -ALA-D was measured by the formation of porphobilinogen (PBG). Pb-RBC ( $\mu$ g/g protein) increased (p<0.001) from pregnancy (0.203  $\pm$  0.08) to lactation (0.280  $\pm$  0.080). Activity of  $\delta$ -ALA-D (mol PBG/min/L RBC) was similar in pregnancy (28.4  $\pm$  7.0) and lactation (29.0  $\pm$  7.1). However, % reactivation of  $\delta$ -ALA-D with Zn increased (p<0.01) from 18.2  $\pm$  6.5 in pregnancy to 22.8  $\pm$  6.0 in lactation. Pb-RBC correlated with % reactivation of  $\delta$ -ALA-D both in pregnancy (r=0.466; p=0.036) and in lactation (r=0.638; p=0.004). These results suggest that the release of bone Pb during pregnancy and lactation may have biological significance even in women with low level of blood lead.  
 [Financial support: CNPq, FINEP, PADCT]

## T - 06

CHARACTERIZATION OF *Mycobacterium leprae* LAMININ BINDING PROTEIN(S): A CANDIDATE ADHESIN INVOLVED IN BACTERIA ATTACHMENT TO SCHWANN CELLS  
 Fogueliani, M.C.V., Marques, M.A.M., Antonio, V. L., T. Sarno, E. and Brennan, P.J.  
 1. Laboratório de Hanseníase, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro -R.J., 2. Colorado State University, Fort Collins, CO, USA

*Mycobacterium leprae* is an intracellular pathogen that invades Schwann cells of the peripheral nerves leading to the disabilities and deformities seen in leprosy patients. Recent publications implicate laminin-2 (LN-2) and  $\alpha$ -dystroglycan present on the surface of Schwann cells in the process of attachment of the bacteria to these cells and subsequent uptake. In the present study we describe: 1) the biochemical characterization of laminin binding protein candidate(s) of *M. leprae* with Schwann cells. To identify the LN-2 binding proteins, *M. leprae* cell wall was purified and overlay assays were performed with biotinylated LN-2. A single and strong band approximately 25 kDa was detected in these assays. A preparative SDS-PAGE was performed and the selected region of the gel was excised and subjected to in-gel proteolytic digestion with trypsin. The resulting peptides were sequenced allowing the identification of nine proteins, eight of them corresponding to new proteins of the bacillus. Based on their high pI, three of these proteins, ribosomal proteins S4 and S5 and a histone-like protein, were chosen as the most probable laminin binding protein candidates. The gene coding for the histone-like protein was PCR amplified and cloned into the pTYB2 expression vector. Currently the protein is being expressed in order to confirm its laminin binding capacity. S4 and S5 ribosomal proteins will also be obtained following the same strategy. In parallel to these studies, we have investigated the interaction of *M. leprae* with the human schwannoma cell line ST-8814. In situ immunohistochemical analysis using a specific monoclonal antibody demonstrated that ST-8814 cells express abundant LN-2 on their surface. The interaction of FITC-labeled *M. leprae* with these cells was then investigated, as well as the influence of soluble laminin in this interaction. *M. leprae* was able to readily interact with these cells, and an average of  $2.6 \pm 0.22$  bacteria/cell was observed after 1 h incubation at 37 °C. By pre-treating *M. leprae* with soluble LN-2 (100  $\mu$ g/ml) its adherence to ST-8814 cells was significantly increased (6.5  $\pm$  0.9 bacteria/cell), suggesting that laminin is also mediating the binding of *M. leprae* to Schwann cells in this *in vitro* system.  
 Supported by Contract No. NIH, NIAID N01 AI-55262

# Hydrodynamics and mass transfer in two-phase aqueous extraction using a continuous perforated rotating disc contactor

A.L.F. Porto, L.A. Sarubbo, J.L. Lima-Filho, M.R. Aires-Barros, J.M.S. Cabral, E.B. Tambourgi

**Abstract** A continuous perforated rotating disc contactor was used to extract bovine serum albumin (BSA) with aqueous two-phase systems based on polyethylene glycol (PEG) and phosphate salts. The dispersed phase hold up and mass transfer coefficient were measured. We found that the dispersed phase holdup increased with increasing PEG phase velocity. The overall mass transfer coefficient for BSA was found to be independent of the PEG phase velocity.

## List of symbols

$C$ - concentration of BSA in phosphate-rich phase (mg/ml)

$C_u$ - concentration of BSA in PEG-rich phase (mg/ml)

$C_{ui}$ - concentration of BSA in PEG-rich phase at the column inlet (mg/ml)

$C_{uo}$ - concentration of BSA in PEG-rich phase at the column outlet (mg/ml)

$H$ - dispersed phase holdup

$K_{da}$ - mass transfer coefficient ( $\text{min}^{-1}$ )

$K$ - partition coefficient

$VD$ - dispersed phase velocity (ml/min)

1

## Introduction

Aqueous two-phase (biphasic) systems have been extensively used for separation and analytical studies of biomaterials since Albertsson [1] developed the technique in the 1950s. Although similar in principle to conventional liquid-liquid extraction, aqueous two-phase extraction encounters uncommonly wide ranges of physical properties. For instance, the density difference between the two phases varies over the range  $10\text{-}100\text{ kg/m}^3$ , the interfacial tension, over the range  $10^{-3}\text{-}10^{-2}\text{ mN/m}$ , and the viscosities over the range  $10\text{-}1000\text{ mPas}$ . Conventional liquid-liquid extraction does not encounter property ranges of this magnitude [2].

It has been shown that conventional extraction techniques can be conveniently applied to aqueous two-phase systems such as polymer-salt or polymer-polymer systems [1].

Aqueous two-phase systems have an important potential in downstream processing such as large-scale continuous operation for the separation of biomolecules.

---

A.L.F. Porto

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal- UFRPE, R.Dom Manoel de Medeiros, s/n -Dois Irmãos -CEP 52171-030- Recife-PE-Brasil E-mail: alfpo@mpd.ufpe.br

J.L. Lima-Filho

Departamento de Bioquímica- -CCB-UFPE, R.Nelson Chaves, s/n- CEP 50640-901-Recife-PE-Brasil E-mail: JLLF@mpd.ufpe.br -Brasil

M.R. Aires-Barros, J.M.S. Cabral

Laboratório de Engenharia Bioquímica, Centro de Engenharia Biológica e Química, Instituto Superior Técnico R.Rovisco Pais, 1000-Lisboa-Portugal E-mail: pccabral@alfa.ist.utl.pt

A.L.F. Porto, J.L. Lima-Filho

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami- -LIKA- - Universidade Federal de Pernambuco CEP 50730-910, Recife- PE -Brasil.

E.B. Tambourgi, L.A. Sarubbo

Departamento de Engenharia de Sistemas Químicos-FEQ- Universidade Estadual de Campinas CP- 6066- CEP 13081 - Campinas-SP-Brasil - E-mail: elias@desq.feq.unicamp.br

This experimental work, mostly performed at LIKA (Keizo-Asami Immunopathology Laboratory) was supported by CNPq, CAPES, LS.T. (Portugal), UFPE, UFRPE, UNICAMP, JICA, PADCT, FINEP and FAPESP.

A number of different conventional contactors, e.g. spray columns and packed columns, can be used for aqueous two-phase extraction [3]. Extraction columns with rotatory motion, namely a rotating disc contactor (RDC) and a perforated rotating disc contactor (PRDC), with free area flow [4] have been used in industry as an alternative apparatus to conventional separations equipment. With this type of extractor, high mass transfer rates between the phases were obtained to recover a recombinant cutinase from an aqueous solution to a reversed micellar phase of AOT in isoctane [5].

For the design of commercial scale columns, data on the following parameters are needed: protein mass transfer coefficients, dispersed phase holdup and the extent of mixing in both the phases. Usually, these parameters depend on the velocities of the two phases, their physical properties, the column diameter and the sparger design. In this work we present and analyze bovine serum albumin (BSA) mass transfer data from a laboratory perforated rotating disc contactor (PRDC) using the PEG-phosphates system. The BSA transfer took place from the PEG phase to the salt phase. Specifically, we measured the dispersed phase holdup ( $H$ ) and mass transfer coefficients and developed correlations for both of them with different dispersed phase velocities.

## 2

### Materials and methods

#### 2.1

##### Materials

Bovine serum albumin (BSA) of the highest purity available was obtained from SIGMA Chemical Co. Polyethylene glycol (PEG) with molecular weight of

550 and 1000 and monopotassium and dipotassium phosphate were obtained from DIFCO Chemical Co.

#### 2.2

##### Preparation of phase systems

Phase systems were prepared by weighing quantities of PEGs of desired molecular mass and phosphate salts. (pH 7). The mixture of the components was stirred for 5 hours to equilibrate. An extra two hours was allowed for the phases totally separate [6]. Table 1 shows the composition of the systems used in this work.

#### 2.3

##### Experimental apparatus

The perforated rotating disc contactor, was made of Perpex tube 32 mm i.d and 16 mm high. Six perforated discs equally separated were mounted on a central shaft which was rotated at velocity of 140 rpm. The perforated discs were 30 mm in diameter and drilled with 20 holes of 1.5 mm diameter (disc free area for flow 20 %). the column was maintained at room temperature ( $24^{\circ}\text{C}\pm 1$ ).

#### 2.4

##### Experimental procedure

Fractional holdups of the dispersed phase (PEG) and the mass transfer coefficients were measured in a perforated rotating disc contactor (PRDC) for different dispersed phase velocities. The column was operated in a continuous mode. The flow rates of dispersed, continuous, raffinated and extracted phases were maintained constant by using two multi channel peristaltic pumps with a flow of 1.0 ml/min for the continuous phase while the dispersed phase velocity varied in the range 1.0-3.0 ml/min. The samples were

collected from the extracted and raffinated phases at 10, 20, 30, 40, 50, 60 and 70 minutes.

**Table 1.** Composition of the aqueous two-phase systems studied

Polymer type	PEG (%p/p) and salts (%p/p)		
	“Tieline 1”	“Tieline 2”	“Tieline 3”
PEG 550	16.7/14.8	17.7/15.7	19.7/17.7
PEG 1000	16.2/14.3	17.7/15.7	19.7/17.7

## 2.5

### Dispersed phase holdup determination

To determine the fractional dispersed phase holdup ( $H$ ), the total volume of the aqueous two-phase system and the volume of dispersed phase were measured after the steady state was achieved. The fractional holdup of the PEG phase was calculated from the expression:

$$H = \text{volume of dispersed phase} / \text{volume of the aqueous two-phase system}$$

## 2.6

### Partition coefficient determination

To measure partition coefficients, which were needed to compute overall mass transfer coefficients, weighed quantities of PEG and phosphate salts were placed in a test tube; a weighed quantity of BSA was added to the mixture. The tube was stoppered and shaken vigorously to dissolve the BSA and to allow partition between the phases. Samples of the phases were then removed. The BSA content was determined by the Bradford method [7]. The partition coefficient ( $K$ ) was calculated as:

$$K = C_u / C$$

Where  $C_u$  and  $C$  are the concentration of BSA in the upper (PEG) and lower (phosphate salts) phases, respectively.

## 2.7

### Mass transfer determination

To determine mass transfer coefficients, in addition to measure partition coefficients, the transfer rate of BSA from the PEG phase to the salts phase needed to be measured. This was done by monitoring the concentration of BSA at the inlet and outlet of the column. A dilute solution of BSA (1mg/ml) mixed in the PEG phase was pumped at a know flow rate. Samples of the phases were collected and analyzed for BSA content.

The mass transfer coefficient was expressed in terms of the concentrations by following a simple material balance:

$$K_{da} = L/V [(\ln C_{ui} - KC) / (C_{uo} - KC)]$$

Where  $L$  is the PEG phase flow rate (ml/min),  $V$  is the dispersion volume (ml),  $K_{da}$  is the mass transfer coefficient ( $\text{min}^{-1}$ ),  $C_{ui}$  and  $C_{uo}$  are the concentrations of BSA in the PEG phase at the column inlet and outlet (mg/ml), respectively;  $C$  is the concentration of BSA in phosphate-rich phase (mg/ml) and  $K$  is the protein partition coefficient.

## 2.8

### Density and viscosity determination

Viscosity and densities measurements of the phases were carried out using a Ubbelohde Capillar Viscometer and a PAAR DMA 6000 Densitometer, respectively.

## Results and discussion

### 3.1 Influence of the dispersed phase velocity on the dispersed phase holdup in different systems compositions

The dispersed phase holdup is an important parameter for the hydrodynamic characterization of extraction equipment. It refers to the fraction of polymer retained in the equipment.

The effect of dispersed phase velocity ( $VD$ ) was studied in the range 1.0 -3.0 ml/min. Figures 1 and 02 show the dispersed phase holdup ( $H$ ) values for both

PEG-phosphate salt systems studied in this work (Table 1). It can be observed, that the PEG phase holdup increased with increasing PEG phase velocity for both systems. Kumar and Hartland [8] indicate that the drop size decreases with an increase in  $VD$ . Therefore, an increase in  $VD$  increases the numbers of drops and leads to an increase in the values of  $H$  [6]. These results are similar to those described by Sawant et al. [2], and Raghav Rao et al. [9]. Similar effects were observed in other multiphase contactors such as bubble columns, slurry reactors, air-lift loop reactors, fluidized beds and spray columns [6,10]. More recently, we

**Table 2.** Densities and viscosities of the phases of the two-aqueous systems studied

Polymer type	Viscosity (mPas)		Density (Kg/m <sup>3</sup> )		
	PEG	salts	PEG	salts	
PEG 550	tie line 1	5.9	2.4	1097.9	1224.2
	tie line 2	8.0	2.3	1098.6	1237.7
	tie line 3	12.5	2.5	1098.9	1270.0
PEG 1000	tie line 1	7.0	1.2	1093.0	1229.4
	tie line 2	10.0	2.2	1093.5	1282.1
	tie line 3	15.0	2.3	1094.8	1292.3

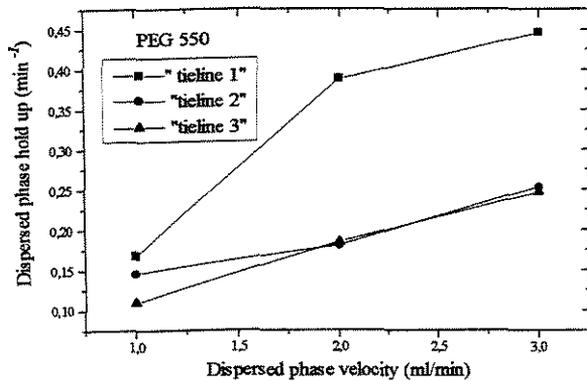
also observed such behaviour for cytochrome b5 continuous extraction using the same contactor used in this work [11].

It is known that the drop rise velocity decreases with increasing viscosity of both phases [12]. The reduction in drop-rise velocity, resulting from increased viscosities, increases the PEG residence time in the column. So, increasing residence time, increases the fold up values.

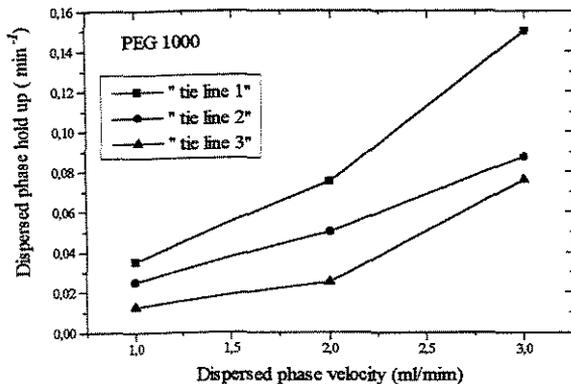
This behaviour was not observed in our studies since an increase in the system composition led to minor values for the PEG phase holdup, although we had observed an increase in the viscosity of the continuous phase (salt rich phase). Similar results were observed by Sawant et al. [2] and Venancio et al. [10].

As the polymer concentration (tieline length) increases, an increase in the interfacial tension leads to an increase in the drop diameter, in the density difference and in the viscosity. All these effects act together resulting in an increase of the size and velocity drop, decreasing

the dispersed phase holdup [12]. Also, with the increase of the drop -rise velocity, caused by the increase of the difference of the phases densities, the residence time of the drop PEG-phase decreases, reducing the holdup [9]. This behaviour can be explained in terms of the physical properties of the systems, such as density and viscosity which increase with the system composition (tieline length) as shown in Table 2. The tielines situated near the critical point show highest



**Fig. 1** Influence of the dispersed phase velocity on the dispersed phase holdup in PEG550/phosphate salts systems



**Fig. 2** Influence of the dispersed phase velocity on the dispersed phase holdup in PEG1000/phosphate salts systems

values of the dispersed phase holdup. These results are similar to those obtained by Jafarabad et al. [6] using PEG/phosphate systems in spray columns.

### 3.2

#### Influence of the dispersed phase velocity on the mass transfer coefficient in different systems compositions

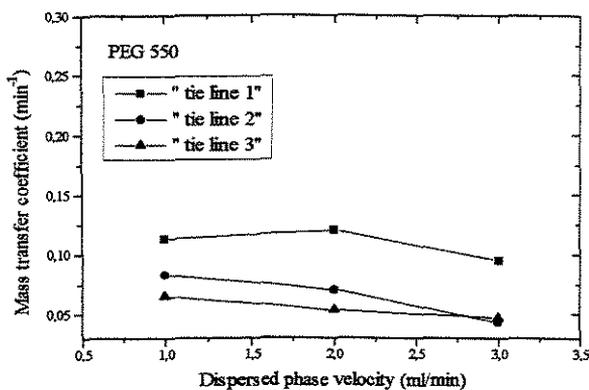
Figures 3 and 4 show the variation of the mass transfer coefficient ( $K_{da}$ ) with the  $VD$ . Both systems of Table 1 were employed to measure  $K_{da}$ .

The results obtained with PRDC showed an independence of the mass transfer coefficient with the  $VD$  increases. On the other hand, studies with spray columns in aqueous two-phase systems demonstrated an increase of the mass transfer coefficient with the  $VD$  increases, once the drop size in higher velocities is minor and produces big areas of mass transference [2,6,9,13,14].

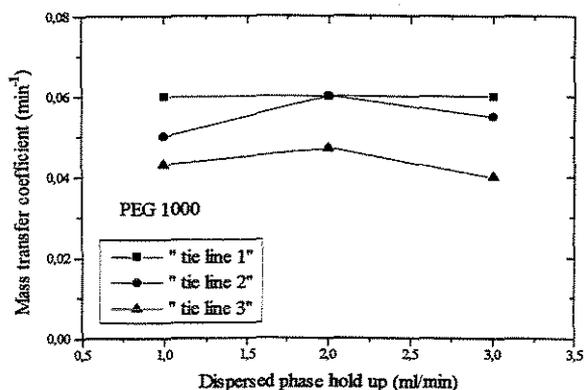
It can also be observed from the figures that the mass transfer coefficient decreases with increasing the tieline length for all the biphasic systems analyzed. This behaviour was also observed in spray columns with PEG/reppal systems [10] and PEG/phosphate systems [6].

This behaviour can be explained by the increase in the density difference between the phases, in the viscosity and interfacial tension. Second Forciniti et al. [15], the interfacial tension increases with increasing the polymer concentration and the total effect on the viscosity phases increases results in a decrease of the protein diffusibility compromising the mass transfer. As a consequence, the mass transfer coefficient is less for bigger tielines. Still, the figures show a discrete increase in the mass transfer coefficient with increasing PEG molecular mass. Similar results were observed by

Sawant et al. [2] and Jafarabad et al. [6] for PEG/phosphate systems.



**Fig. 3** Influence of the dispersed phase velocity on the mass transfer coefficients in PEG550/phosphate salts systems



**Fig. 4** Influence of the dispersed phase velocity on the mass transfer coefficients in PEG1000/phosphate salts systems

4

## Conclusions

In this article we studied BSA continuous extraction using a perforated rotating disc contactor with two-phase aqueous systems. Specifically, we measured the

dispersed phase holdup and the mass transfer coefficients for various dispersed phase velocity.

The main advantage of the perforated rotating disc contactor is that the phases separate without the need of a centrifuge. An additional advantage is that the design methods commonly used for multiphase reactors apply to the two-phase extraction.

We measured dispersed phase holdup. We found that holdup increased with increasing PEG phase velocity; it also increased with decreasing the tieline length. For transfer mass, it was independent of the PEG phase velocity increase and it decreased by increasing the tieline length.

## Acknowledgements

This work was carried out with financial support by FACEPE, CAPES and FAPESP.

## References

1. Albertsson, P.A. In: Partition of Cell and Macromolecules, New York: Wiley 1986
2. Sawant, S.B., Sikdar, S.K.: Hydrodynamics and mass transfer in two-phase aqueous extraction using spray columns, *Biotechnol. Bioeng.* 36 (1990) 109-115
3. Save, S.V., Pangarkar, V.G., Kumar, S.V.: Intensification of mass transfer in aqueous two-phase systems. *Biotechnol. Bioeng.* 41 (1993) 72-78
4. Tambourgi, E.B., Pereira, J.A.F.R.: The efficiency of a rotating disc contactor. *Latin Am. Appl. Research*, 23 (1993) 257-260
5. Carneiro-da-Cunha, M.G., Aires-Barros, M.R., Tambourgi, E.B., Cabral, J.M.S.: Recovery of recombinant cutinase with reversed micelles in a continuous perforated rotating disc contactor, *Biotechnol. Tech.* 8 (1994) 413-418
6. Jafarabad, K.R., Sawant, S.B., Joshi, J.B., Sidkar, S.K.: Enzyme and protein mass transfer coefficient in aqueous two-phase system. I- Spray extraction columns, *Chem. Eng. Sci.* 47 (1992) 57-68

7. **Bradford, M.M.:** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding, *Anal. Biochem*, 72 (1976) 248-254
8. **Kumar, A., Hartland, S.:** Prediction of drop size produced by a multiorifice distributor, *Trans. Inst. Chem. Engrs*. 60 (1982) 35-39
9. **Raghav Rao, K.S.M., Szlag, D.C., Sidkar, S.K., Joshi, Sawant, S.B.:** Protein extraction in a column using a polyethylene glycol-maltodextrin two-phase polymer system, *Chem. Eng. J.* 46 (1991) B75-B81
10. **Venâncio, A., Teixeira, J.A.:** Protein mass transfer studies on spray column using the PEG-Reppal PES 100 aqueous two-phase system, *Bioprocess Eng.* 13 (1995) 251-255
11. **Porto, A. L.F., Lima-Filho, J.L., Aires-Barros, M.R., Cabral, J. M.S., Tambourgi, E.B.:** Extraction of recombinant cytochrome b5 from disrupted *Escherichia coli* cells with an aqueous two-phase system in a continuous perforated rotating contactor, *Appl. Biochem. Biotech*, 60(1996) 114-122
12. **Clift, R., Grace, J.R., Weber, M.E.:** Bubbles, drops and particles. New York: Academic Press 1978
13. **Jafarabad, K.R., Sawant, S.B., Joshi, J.B., Sidkar, S.K.:** Enzyme and protein mass transfer coefficient in aqueous two-phase system. II- York-scheibel extraction columns, *Chem. Eng. Sci.* 47 (1992) 69-73
14. **Pawar, P.A., Veera Parasu, U., Sawant, S.B., Joshi, J.B.:** Enzyme mass transfer coefficient in aqueous two-phase systems: modified spray extraction columns. *The Canadian J. Chem. Eng.* 75 (1997) 751-758
15. **Forciniti, D., Hall, C.R., Kula, M.R.:** Interfacial tension of polyethylene glycol-dextran-water systems: influence of temperature and polymer molecular weight, *J. Biotechnol.* 16 (1990) 279-296

**ICheaP-4**

**The fourth Italian Conference on  
Chemical and Process  
Engineering**

**Florence, Italy, May 2-5, 1999**

Organized by   
*the Italian Association of Chemical Engineering*

**PROCEEDINGS**



**VOLUME I**



## MASS TRANSFER AND SEPARATION EFFICIENCY STUDIES USING A PERFORATED ROTATING DISC CONTACTOR

A. L. F. Porto<sup>1,2,4</sup>, L.A. Sarubbo<sup>5</sup>, L. A. Oliveira<sup>5</sup>, L.F.D.F. Vieira<sup>4</sup>, J.L. Lima-Filho<sup>3,4</sup> and E.B. Tambourgi<sup>5</sup>

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal- Universidade Federal Rural de Pernambuco<sup>1</sup>, Departamento de Química- UNICAP<sup>2</sup>, Departamento de Bioquímica- Universidade Federal de Pernambuco<sup>3</sup>, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami- Universidade Federal de Pernambuco<sup>4</sup>, Departamento de Sistemas Químicos e Informática-FEQ- Universidade Estadual de Campinas<sup>5</sup>, CP- 6066- CEP 13081 - Campinas-SP-Brasil - E-mail: elias@desq.feq.unicamp.br.

**ABSTRACT:** Aqueous two-phase systems have an important potential in downstream processing as large scale continuous operation for the separation of proteins and removal of contaminants from fermentation broth. Extraction columns with rotatory motion, namely a rotating disc contactor (RDC) and a perforated rotating disc contactor (PRDC), with free area flow are used in industry as an alternative apparatus to conventional separations equipment. This work describes mass transfer mechanisms and separation efficiency in a perforated rotating disc contactor using an aqueous two-phase system composed of polyethylene glycol (PEG) and potassium phosphate salts. The salt-rich phase was used as continuous phase, and PEG-rich phase as the dispersed phase. The behaviour of different molecular mass proteins (cytochrome b5, protease and ascorbic oxidoreductase) related to separation efficiency and mass transfer coefficient in a PRDC was investigated. The results showed a independence of the mass transfer coefficients with the protein molecular masses for all proteins tested, although the efficiencies separation had shown a direct dependence with the molecular mass increase of the proteins. The results suggest that this type of extractor can be successfully used as a continuous extraction equipment for protein and enzyme using aqueous two-phase system.

### INTRODUCTION

Aqueous two-phase systems are formed when aqueous solution of two polymers are mixed. Such systems have been found to be suitable for partitioning of proteins and cell organelles (Dissing and Matiasson, 1994). Aqueous two-phase (biphasic) systems have been extensively used for separation and analytical studies of biomaterials since Albertsson developed the technique in the 1950s. (Lopez-Perez 1996). This technology offers an attractive step in the separation and purification of proteins from their major contaminants.

The main advantages of aqueous two-phase systems over traditional adsorption separation processes lies in their ability to handle particulate materials and to process large volumes in a continuous mode. Separation can be achieved whereby the particulates and major



contaminants partition to the bottom phase and the protein product to the top phase (Ansejo *et al.*, 1994).

Extraction columns with perforated rotating disc contactor (PRDC) with different free area flow (Tambourgi *et al.*, 1993) are used in industry as an alternative apparatus to conventional separation equipment. With these types of extractors, high mass transfer rates between the phases are obtained by recombinant cutinase from a aqueous solution to a reversed micellar phase of AOT in isooctane (Carneiro-da-Cunha *et al.*, 1994).

This work describes the mass transfer mechanisms and separation efficiency in a perforated rotating disc contactor using aqueous two-phase systems for different mass molecular proteins.

## MATERIALS AND METHODS

**Microorganisms:** The organisms used in this study to produce cytochrome b5 and protease were *Escherichia coli* (TB1), Von-Bodman *et al.*, 1986 and *Streptomyces clavuligerus* NRRL 3585, respectively.

**Recombinant cytochrome b5 and extracellular protease production:** The cytochrome b5 was produced by fermentation in Lauriam Bertini (LB) medium at 37°C, during 24 hours in rotatory Shaker (250 rpm). The extracellular protease was produced by fermentation from MSD medium described by Porto *et al.*, (1996) at 30°C during 96 hours in rotatory shaker (200rpm).

**Ascorbic oxidoreductase extraction and activity:** The ascorbic oxidoreductase extraction was carried out from *Curcubita maxima* according to the methodology described by Carvalho *et al.* (1981). The activity was assayed at 25°C in both phases as described by Carvalho *et al.* (1981) using ascorbic acid as substrate.

**Experimental apparatus:** The perforated rotating disc contactor, was made of perpeX tube 32 mm i.d and 16 mm high. Six perfored discs equally separated were mounted on a central shaft which was rotated at velocity of 140 rpm. The perforated discs were 30 mm in diameter and drilled with 20 holes of the 1.5 mm diameter (disc free area for flow 20.0%). The column was maintained at room temperature (24° C ±1).

**Experimental procedure:** The aqueous two phase systems of desired composition were prepared according with Jafarabad *et al.*, (1992) containing PEG 1000 (18 % w/w) and potassium phosphate salts (16,0 % w/w) and crude extract containing cytochrome b5 (32.0 mg/l), PEG 1000 (19,7 % w/w) and potassium phosphate salts (17,0 % w/w) and crude extract containing protease (59,4µg/ml) and PEG 1000 (19,7 % w/w) and potassium phosphate salts (17,7 % w/w) and crude extract containing ascorbic oxidoreductase (60µg/ml). The column was operated in continuous manner. The flow rates of disperse, continuous, raffinated and extracted phases were maintained constant by using two multi channel peristaltic pump with a flow rates of 3.0 ml/min and 1.0 ml/min, to disperse and continuous phases, respectively. Samples were collected from the extracted and raffinated phases at 10, 20, 30, 40, 50, 60 and 70 minutes.



**Cytochrome b5 determination:** The concentration of cytochrome in each phase was determined by measuring the absorbance at 411nm (molar absorptivity  $\epsilon = 130 \text{ l/mmol cm}$ ) using a Hitachi UV-VIS spectrophotometer (Von-Bodman *et al.*, 1986).

**Protease activity determination:** The total extracellular protease activity was assayed at 25°C in both phases as described by Ginther (1979). Azocasein (1.0% w/v) in 0.2M Tris-HCl, pH 7.2 containing 1.0mM  $\text{CaCl}_2$ , was used as substrate. One unit of activity is defined as the amount of enzyme that produces an increase in absorbance of 1.0 in 1h at 440nm.

**Protein determination:** Total protein was quantified using Bradford (1976) assay. The samples of the top and bottom phases were diluted at least 1/10 with water before the addition of the dye to eliminates the interference of PEG 1000 and phosphate on the protein assay. A blank was prepared adding to dye a sample of the top and bottom phases of a corresponding phase system without protein extract, diluted in the same way. The total protein recovery in both phases was compared with protein initially introduced in the system.

**Mass transfer coefficient ( $K_s$ ) determination:** The overall mass transfer coefficient was expressed in terms of the concentrations by following a simple material balance such as:

$$K_s = L/V (\ln C_{ui} - KC / (C_{uo} - KC))$$

Where L is the PEG phase flow (ml/min); V is the dispersion volume (ml),  $K_s$  is the overall mass transfer coefficient ( $\text{min}^{-1}$ ),  $C_u$  is the concentration of protein in the PEG-rich phase ( $\mu\text{g/ml}$ );  $C_{ui}$  and  $C_{uo}$  are the concentrations of protease in the phase at the column inlet and outlet, respectively.

**Murphree separation efficiency (E) determination:** The separation efficiency, E, has been calculated as:

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

Where  $C_d$  is the protein concentration in the dispersed phase;  $C_r$  is the protein concentration in the raffinated phase; and  $C_r^*$  is the protein concentration in the raffinated phase, if the system were in equilibrium.

## RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 summarizes the mass transfer coefficients and separation efficiencies for cytochrome b5, protease and ascorbic oxidoreductase in a PRDC.

The results obtained suggest that the mass transfer coefficient seems to be independent to the protein molecular mass, although the efficiency separation seems to show a direct dependence with the molecular mass increase for the three proteins studied.

Investigations with York-Sheibel columns using aqueous two-phase systems of PEG 4000 and potassium phosphate salts and PEG 4000 and sodium sulphate salts showed mass transfer coefficients three times higher than the ones obtained with spray columns (Jafarabad *et al.*, 1992), while the mass transfer coefficients for the PRDC using PEG-potassium phosphate

system were 26 times higher than the ones for spray and York-Sheibel columns (Sawant *et al.*, 1990, Raghav Rao *et al.*, 1991, Jafarabad *et al.*, 1992). This information is very important for the "scale up" of extraction processes using this kind of equipment.

Once there are no data in literature about protein continuous extraction using a PRDC, it is difficult to discuss the results found in this work.

In this research we tried to know the behaviour of different mass molecular proteins from the crude extract obtained by fermentation or by direct extraction from vegetal material.

Proteins	Molecular mass (Da)	Mass transfer coefficient (min <sup>-1</sup> )	Murphree efficiency
cytochrome b5	13600	0.06	0.97
protease	47000	0.06	0.2
ascorbic oxidoreductase	150000	0.05	1.4

Table 1 - Mass transfer coefficients and separation efficiencies for cytochrome b5, protease and ascorbic oxidoreductase.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was carried out with financial support by FAPESP, CAPES and FACEPE.

#### REFERENCES

- Ansejo, J.A., Turner, R.E., Mistry, S.L., Kaul, A. Separation and purification of recombinant proteins from *Escherichia coli* with aqueous two-phases systems. *J. Chromatogr.*, v.668, p.129-137, 1994.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, v.72, p. 248-254, 1976.
- Carneiro-da-Cunha, M.G., Aires-Barros, M.R., Tambourgi, E.B., Cabral, J.M.S. *Biotechnol. Tech.*, v.8, p. 413-418, 1994.
- Dissing, U., Matiasson, B. Partition of proteins in polyelectrolyte-neutral polymer aqueous two-phase systems. *Bioseparation*, v.4, p.335-342, 1994.
- Jafarabad, K.R., Sawant, S.B., Joshi, J.B., Sidkar, S.K. *Chem. Eng. Sci.*, v. 47, p.57-68, 1992.
- Lopez-Perez, M.J. Book Review, *J. Chromatogr. A*, v.742, p. 299, 1996.
- Porto, A.L.F., Campos-Takaki, G.M., Lima-Filho, J.L. *Appl. Biochem. Biotech.*, v.60, p. 114-122, 1996.
- Raghav Rao, K.S.M., Szlag, D.C., Sidkar, S.K. *Chem. Eng. J.*, v.46, p.B75-B81, 1991.
- Sawant, S.B., Sidkar, S.K., Joshi, J.B. *Biotechnol. Bioeng.*, v.36, p.109-115, 1990.
- Tambourgi, E.B., Pereira, J.A.F.R. The efficiency of a rotating disc contactor. *Latin American Applied Research*, v.23, p.257-260, 1993.



## BEHAVIOUR OF PROTEINS IN CONTINUOUS EXTRACTION WITH AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM

A. L. F. Porto<sup>1,2,4</sup>, L.A. Sarubbo<sup>5</sup>, L. A. Oliveira<sup>5</sup>, L.F.D.F. Vieira<sup>4</sup>, J.L. Lima-Filho<sup>3,4</sup> and E.B. Tambourgi<sup>5</sup>

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal- Universidade Federal Rural de Pernambuco<sup>1</sup>, Departamento de Química- UNICAP<sup>2</sup>, Departamento de Bioquímica- Universidade Federal de Pernambuco<sup>3</sup>, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami- Universidade Federal de Pernambuco<sup>4</sup>, Departamento de Sistemas Químicos e Informática-FEQ- Universidade Estadual de Campinas<sup>5</sup>, CP- 6066- CEP 13081 - Campinas-SP-Brasil - E-mail: elias@desq.feq.unicamp.br.

**ABSTRACT:** Aqueous two-phase systems (ATPS) have found widespread use in biochemical research for separation and purification of macromolecules, cells and particles. Extraction using ATPS has the advantages of the liquid-liquid extraction techniques, and can be used as first step on purification processes, leading to higher recovery yields. However, the use of continuous extraction of protein using ATPS has limited examples in the literature. This work describes the continuous extraction of different proteins (cytochrome b5, protease and ascorbic oxidoreductase) using ATPS of polyethylene glycol (PEG) and potassium phosphate salt. About 44% and 48% total proteins and 78% and 112% activities for cytochrome b5 and ascorbic oxidoreductase were transferred to the salt-rich phase, respectively. For protease, 38,54% total protein and 112% activity were transferred to the PEG-rich phase. The proteins showed purification factors of 2.0, 3.0 and 22.0 after 70 minutes of operation, for cytochrome b5, protease and ascorbic oxidoreductase, respectively. The results obtained with a perforated rotating disc contactor confirm the feasibility of this equipment for extraction of proteins and enzymes, resulting in a reduction of the protein extraction process steps which may lead to a more efficient process.

## INTRODUCTION

Aqueous two phase partition is a technique that can be used efficiently for the separation and purification of proteins owing to its simplicity, midness and high yields (Abbot *et al.*, 1990; Albertsson, 1986; Kula, 1990).

Aqueous two-phase systems are formed when aqueous solutions of two polymers are mixed. The most commonly studied two-phase systems consist of polyethylene glycol (PEG) and potassium phosphate salts. Extraction columns with rotatory motion, namely a rotating disc contactor (RDC), with free area flow are used in industry as an alternative apparatus to conventional separation equipment (Tambourgi *et al.*, 1993). This work describes the behaviour of different proteins in continuous using aqueous two-phase systems of polyethylene glycol and potassium phosphate salts.



## MATERIALS AND METHODS

**Microorganisms:** The organisms used in this study to produce cytochrome b5 and protease were *Escherichia coli* (TB1), Von-Bodman *et al.*, 1986 and *Streptomyces clavuligerus* NRRL 3585, respectively.

**Recombinant cytochrome b5 and extracellular protease production:** The cytochrome b5 was produced by fermentation in Lauriam Bertini (LB) medium at 37°C, during 24 hours in rotatory Shaker (250 rpm). The extracellular protease was produced by fermentation from MSD medium described by Porto *et al.*, (1996) at 30°C during 96 hours in rotatory shaker (200rpm).

**Ascorbic oxidoreductase extraction and activity:** The ascorbic oxidoreductase extraction was carried out from *Curcubita maxima* according to the methodology described by Carvalho *et al.* (1981). The activity was assayed at 25°C in both phases as described by Carvalho *et al.* (1981) using ascorbic acid as substrate.

**Experimental apparatus:** The perforated rotating disc contactor, was made of perpeX tube 32 mm i.d and 16 mm high. Six perforated discs equally separated were mounted on a central shaft which was rotated at velocity of 140 rpm. The perforated discs were 30 mm in diameter and drilled with 20 holes of the 1.5 mm diameter (disc free area for flow 20.0%). The column was maintained at room temperature (24° C ±1).

**Experimental procedure:** The aqueous two phase systems of desired composition were prepared according with Jafarabad *et al.*, (1992) containing PEG 1000 (18 % w/w) and potassium phosphate salts (16,0 % w/w) and crude extract containing cytochrome b5 (32.0 mg/l), PEG 1000 (19,7 % w/w) and potassium phosphate salts (17,0 % w/w) and crude extract containing protease (59,4µg/ml) and PEG 1000 (19,7 % w/w) and potassium phosphate salts (17,7 % w/w) and crude extract containing ascorbic oxidoreductase (60µg/ml). The column was operated in continuous manner. The flow rates of disperse, continuous, raffinated and extracted phases were maintained constant by using two multi channel peristaltic pump with a flow rates of 3.0 ml/min and 1.0 ml/min, to disperse and continuous phases, respectively. Samples were collected from the extracted and raffinated phases at 10, 20, 30, 40, 50, 60 and 70 minutes.

**Cytochrome b5 determination:** The concentration of cytochrome in each phase was determined by measuring the absorbance at 411nm (molar absorptivity  $\epsilon = 130$  l/mmol cm) using a Hitachi UV-VIS spectrophotometer (Von-Bodman *et al.*, 1986).

**Protease activity determination:** The total extracellular protease activity was assayed at 25°C in both phases as described by Ginther (1979). Azocasein (1.0% w/v) in 0.2M Tris-HCl, pH 7.2 containing 1.0mM CaCl<sub>2</sub>, was used as substrate. One unit of activity is defined as the amount of enzyme that produces an increase in absorbance of 1.0 in 1h at 440nm.

**Protein determination:** Total protein was quantified using Bradford (1976) assay. The samples of the top and bottom phases were diluted at least 1/10 with water before the addition of the dye to eliminates the interference of PEG 1000 and phosphate on the protein assay. A blank was prepared adding to dye a sample of the top and bottom phases of a corresponding phase system



without protein extract, diluted in the same way. The total protein recovery in both phases was compared with protein initially introduced in the system.

## RESULTS AND DISCUSSION

Figures 1, 2, 3 and 4 show the results obtained for continuous extraction of cytochrome b5 and ascorbic oxidorreductase. It can be observed a constant increase in the capacity for extraction from PEG-rich phase (raffinated phase) to the phosphate-rich phase (extracted phase) during the time of experiments for these two proteins, which demonstrated a similar behaviour.

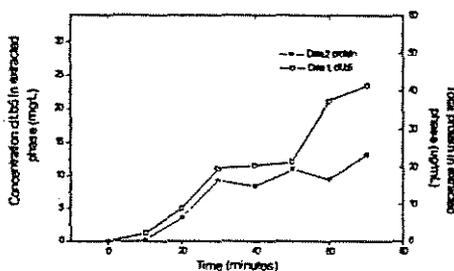


Figure 1-Total protein and cytochrome b5 in extracted phase.

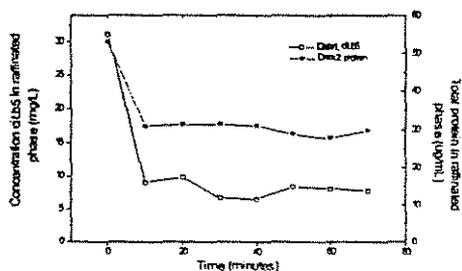


Figure 2-Total protein and cytochrome b5 in raffinated phase.

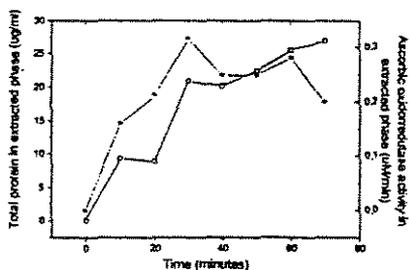


Figure 3-Total protein and ascorbic oxidorreductase activity in extracted phase.

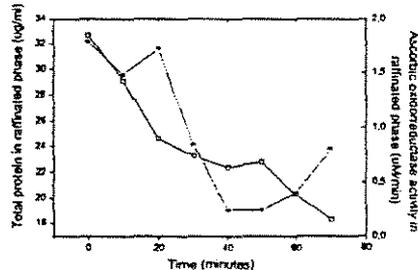


Figure 4-Total protein and ascorbic oxidorreductase residual activity in raffinated phase.

An extraction corresponding to 78% of cytochrome b5 and 44% of total protein and a purification factor of 2.0 were achieved in these conditions, while 112% activity and 48% total proteins were reached for ascorbic oxidorreductase. Figure 3 exhibits the behaviour of total protein and residual cytochrome b5 in the raffinated phase after extraction. This results show a decrease of these parameters in the first 10 minutes and a little variation until the end of experiments. Figure 4 shows the behavior of total protein and residual activity for ascorbic oxidorreductase in the PEG-rich phase after extraction. The results show the decrease in total protein and activity until the end of extraction. A purification factor of 22.0 was achieved after 70 minutes of operation.

Protease continuous extraction data is shown in Figures 5 and 6. A constant increase in total protein and activity transfer from the salt-rich phase to the PEG-rich phase was observed until the end of experiments, reaching 38,54% total protein and 112% activity recovery. After 10 min of extraction, it was not possible to detect activity in the salt-rich phase, suggesting a complete transfer of protein to the extracted phase. A purification factor of 3.0 was achieved after 70 minutes of operation.

During the time of operation the two-phase interface was well defined for all systems studied. The results obtained showed a similar behaviour compared with the extraction of the recombinant cutinase with reversed micelles (Carneiro-dá-Cunha *et al*, 1994) in continuous operation with a similar perforated rotating disc contactor. This study demonstrates that a perforated rotating disc contactor could be efficient for proteins extraction using aqueous two-phase systems without phase separation problems.

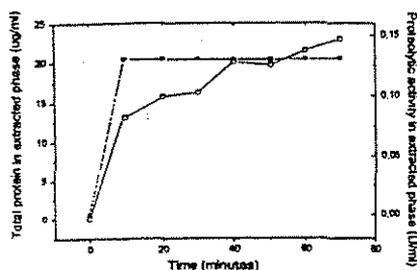


Figure 5-Total protein and protease activity in extracted phase.

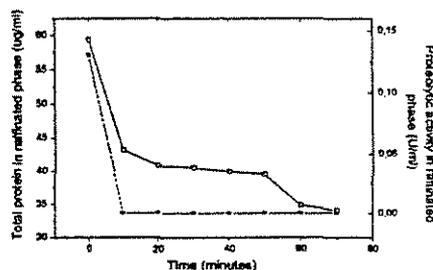


Figure 6-Total protein and protease residual activity in raffinated phase.

## ACKNOWLEDGEMENTS

- This work was carried out with financial support by FAPESP, CAPES and FACEPE.

## REFERENCES

- Abbott, N.L., Blankschtein, D., Hatton, T. A . *Bioseparation*, v.01, p. 191-225, 1990
- Albertsson, P.A . in *Partition of Cell and Macromolecules*, Albertsson, P. A . , ed., 3rd., Wiley, New York, cap.15, p.529, 1986.
- Kula, M.R. *Bioseparation*, v.01, p.181-189, 1990.
- Bradford, M.M. *Anal.Biochem.* ,v.72, p.248-254, 1976.
- Carneiro-da-Cunha, M.G., Aires-Barros, M.R., Tambourgi, E.B., Cabral, J.M.S. *Biotechnol. Tech.* v.08, p. 413-418, 1994.
- Jafarbad, K.R., Sawant, S.B., Joshi, J.B. , Sidkar, S.K., *Chem. Eng. Sci.*, v.47, p. 57-68, 1992.
- Tambourgi, E.B., Pereira, J.A F.R., Perazoli, L. A . *Latin American Applied Research*, v. 23, p.257-260, 1993.
- Von-Bodman, S.B. Schuller, M.A . Jolie, D.R., Slinger, S.G. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, v. 83, p. 9443-9447, 1986.