

ABRAHAM DAMIAN GIRALDO ZUÑIGA

**SISTEMAS AQUOSOS POLIETILENOGLICOL-SAL: SEPARAÇÃO DE  
 $\alpha$ -LACTOALBUMINA E  $\beta$ -LACTOGLOBULINA DO SORO DE QUEIJO E  
HIDRODINÂMICA EM UM EXTRATOR GRAESSER**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2000**

*A Deus.*

*À minha inigualável mãe Maura Zuñiga Quiñones, que, com sua humildade e simplicidade, soube me proporcionar os momentos mais felizes da vida.  
A todos os meus irmãos e sobrinhos, especialmente a Fely, minha segunda Mãe,  
ao meu irmão Samuel e aos amigos.*

## **HOMENAGEM PÓSTUMA**

A meu pai, que desde o Céu ilumina os meus passos.

Um homem que viveu para a família e que tanto sonhou com o sucesso de seus  
filhos.

A você, pai que me ensinou a acreditar nos meus ideais, a ser justo e a compartilhar  
as bênçãos de Deus.

Obrigado, pai.

Saudade.

## **AGRADECIMENTO**

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade oferecida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PEC-PG), FAPEMIG e ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

À professora Jane Sélia dos Reis Coimbra, pela oportunidade, pela orientação, pelo apoio, pelos ensinamentos, pela amizade e paciência.

Aos professores Luís Antônio Minim e José Antônio Pereira, pelas valiosas contribuições como conselheiros, pelos ensinamentos, pelo apoio e pela amizade.

À minha família, pelo carinho, pela confiança e pelo incentivo.

À minha esposa Lúcia e sua família, pelo carinho e pelas freqüentes acolhidas.

Aos amigos, irmãos e companheiros de curso Wilmer Luera, Milton Cano e Edwin Garcia, pelos momentos compartilhados e pelo convívio nos anos fora do nosso país.

Aos amigos André, Renata, Alexandre, Cássio, Rafael, Ximena, Daniela, Rossana, Mariana, Lauro, Elias, Carolina e Kelly, pelo convívio harmonioso e companheirismo, especialmente ao Sérgio, pela leitura final da tese, e a todos aqueles que, de alguma outra forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

ABRAHAM DAMIAN GIRALDO ZUÑIGA, filho de Damian Giraldo Silva e Maura Zuñiga Quiñones, nasceu na cidade de Chimbote, Departamento de Ancash, Peru, em 31 de dezembro de 1970.

Em 1990, iniciou o Curso de Engenharia Agroindustrial na Universidade Nacional do Santa - Peru, graduando-se em junho de 1997.

Em março de 1998, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa, concentrando seus estudos na área de Processos de Biosseparação.

Em julho de 2000, submeteu-se ao exame final de defesa de tese.



2.3.2. Características Físico - Químicas dos Sistemas Aquosos Bifásicos.....	23
2.3.3. Diagrama de Fases.....	24
2.3.4. Constituintes das Fases .....	25
2.3.4.1. Polietilenoglicol.....	25
2.3.4.2 Fosfato de Potássio.....	26
2.3.5. Distribuição de Biomoléculas em Sistemas Aquosos Bifásicos..	26
2.3.6. Aplicações em Grande Escala.....	28
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1. Seleção e Caracterização do Sistema de Trabalho .....	29
3.1.1. Preparo dos Sistemas de Fases .....	29
3.1.1.1 Ensaio em Bancada.....	29
3.1.1.2 Ensaio no Extrator.....	30
3.1.2. Relação de Fases .....	30
3.1.3. Quantificação de $\alpha$ -lactoalbumina e $\beta$ -lactoglobulina nas fases.	31
3.1.4. Coeficiente de Partição das Proteínas.....	31
3.1.5. Curva-Padrão .....	32
3.1.6. Propriedades Físicas das Fases e Diagrama de Equilíbrio.....	32
3.1.6.1 Densidade.....	32
3.1.6.2 Viscosidade.....	32
3.1.6.3 Tensão Interfacial.....	33
3.1.6.4 Diagrama de Equilíbrio.....	34
3.2. Caracterização Hidrodinâmica do Equipamento.....	34
3.2.1. Extrator Graesser .....	34
3.2.2. Condições Operacionais do Extrator.....	35
3.2.3. Fração Volumétrica Retida da Fase Polimérica .....	36
3.2.4. Distribuição de Tempos de Residência.....	36
3.2.4.1. Fase Polimérica.....	36
3.2.4.2. Fase Salina.....	37
3.3. Reagentes e Equipamentos.....	37
3.3.1. Reagentes.....	37
3.3.2. Equipamentos.....	37

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1. Quantificação de $\alpha$ -lactoalbumina e $\beta$ -lactoglobulina.....	39
4.2. Seleção e Caracterização do Sistema de Trabalho.....	43
4.2.1. Relação de Volumes entre as Fases.....	43
4.2.2. Coeficientes de Partição.....	45
4.2.2.1. Influência da Massa Molar do PEG sobre o Coeficiente de Partição.....	47
4.2.3. Propriedades Físicas das Fases e Diagrama de Equilíbrio.....	48
4.2.3.1. Densidade.....	48
4.2.3.2. Viscosidade.....	49
4.2.3.3. Tensão Interfacial.....	50
4.2.3.4. Diagrama de Equilíbrio de Fases.....	52
4.3. Caracterização Hidrodinâmica do Extrator Graesser.....	53
4.3.1. Distribuição de Tempos de Residência e Dispersão Axial.....	53
4.3.1.1. Fase Polimérica.....	55
4.3.1.2. Fase Salina.....	59
4.3.2. Fração Volumétrica Retida da Fase Polimérica (“Hold-Up”).....	63
5. RESUMO E CONCLUSÕES .....	69
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	72

## LISTA DE TABELAS

1. Concentração das proteínas no soro de queijo.....	4
2. Características físico-químicas da $\alpha$ -la e da $\beta$ -lg.....	5
3. Constituição protéica dos leites humano e bovino.....	6
4. Traçadores usados em experimentos de DTR.....	15
5. Modelos usados para determinação da DTR.....	17
6. Sistemas aquosos bifásicos típicos.....	22
7. Aplicações da extração com SAB.....	28
8. Dimensões do extrator Graesser.....	35
9. Composição das fases móveis usadas na cromatografia líquida.....	40
10. Gradiente empregado na determinação analítica de $\alpha$ -la e $\beta$ -lg.....	40
11. Concentração de $\alpha$ -la e $\beta$ -lg no soro de queijo <i>in natura</i> e no isolado protéico.....	43
12. Relação de volumes entre as fases.....	44
13. Sistemas pré-selecionados.....	45
14. Coeficientes de partição para $\alpha$ -la e $\beta$ -lg.....	46
15. Médias para $K_{\alpha}$ .....	46
16. Médias para $K_{\beta}$ .....	47
17 Viscosidade das fases para o SAB 18% PEG 1500-18% FFP, a 25 <sup>o</sup> C.....	49

18. Tensão Interfacial média dos sistemas pré-selecionados.....	51
19. Composição das fases para o sistema PEG 1.500 - FFP- água, a 25 <sup>0</sup> C e pH 7.....	52
20. Variáveis usadas nos modelos para predição da DTR.....	54
21. Tempos de residência médios para a fase polimérica.....	57
22. Tempos de residência médios para a fase salina.....	60

## LISTA DE FIGURAS

1. Classificação dos extratores líquido-líquido.....	9
2. Extrator Graesser.....	11
3. Técnica experimental para determinação da DTR.....	12
4. Comportamento do traçador nas técnicas estímulo resposta para estudo da DTR.....	13
5. Composição das fases para uma linha de amarração do sistema PEG1500-FFP-água a 25°C e pH 7.....	23
6. Diagrama de fases para um sistema polietilenoglicol 4000/fosfato de potássio, a 20 °C.....	24
7. Montagem experimental do extrator Graesser.....	35
8. Curva-padrão para $\alpha$ -lactoalbumina .....	40
9. Curva-padrão para $\beta$ -lactoglobulina.....	41
10. Cromatograma típico dos padrões de $\alpha$ -la e $\beta$ -lg.....	42
11. Cromatograma do Soro de Queijo <i>in natura</i> .....	42
12. Efeito da massa molar do PEG na partição de $\alpha$ -la e $\beta$ -lg. Sistema 18% p/p PEG e 18% p/p FFP a 25 °C.....	48
13. Densidade das fases para os sistemas pré-selecionados, a 25 °C	49
14. Tensão interfacial média em função da velocidade de rotação do capilar do tensiômetro.....	50
15. Diagrama de equilíbrio para o sistema PE 1500-FFP-água, a 25 °C e pH 7.....	52
16. DTR na fase polimérica para um pulso de azul de cibracon ( $Q_p=40\text{mL/min}$ ; $Q_s = 80 \text{ mL/min}$ ; 6,6 rpm).....	54
17. Dados experimentais versus dados preditos pelo modelo da dispersão, para a fase salina ( $Q_p=40\text{mL/min}$ ; $Q_s=80 \text{ mL/min}$ ; 10 rpm).	55

18. DTR na fase polimérica ( $Q_p=40$ mL/min; $Q_s=80$ mL/min; 6.6 rpm).....	56
19. Influência da velocidade de rotação sobre Dx na fase polimérica ( $Q_s = 80$ mL/min).....	58
20. Influência da velocidade de rotação sobre Dx na fase polimérica ( $Q_p = 60$ mL/min).....	59
21. DTR na fase salina ( $Q_p = 60$ mL/min; $Q_s = 60$ mL/min;10 rpm).....	60
22. Influência da velocidade de rotação sobre Dx na fase salina ( $Q_p = 60$ mL/min).....	61
23. Influência da velocidade de rotação sobre Dx na fase salina ( $Q_s = 80$ mL/min).....	62
24. Dependência do “Hold - Up” da fase polimérica com a velocidade de rotação ( $Q_s$ : vazão da fase salina-fixa; $Q_p$ : vazão da fase polimérica).....	64
25. Dependência do “Hold-Up” da fase polimérica com a velocidade de rotação ( $Q_s$ : vazão da fase salina; $Q_p$ : vazão da fase polimérica – fixa).....	65
26. Dependência do “Hold - Up” da fase polimérica com a velocidade de rotação. Vazão total de alimentação constante ( salina + polimérica = 120 mL/min).....	66
27. Arraste da fase salina pela fase polimérica versus velocidade de rotação. Vazão da fase PEG: 80 mL/min; vazão da fase salina = 40 mL/min.....	68
28 "Hold-Up" vs.arrastre para 6,6 rpm.....	68

## RESUMO

ZUÑIGA, Abraham Damian Giraldo, M.S., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2000. **Sistemas aquosos polietilenoglicol-sal: separação de  $\alpha$ -lactoalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina do soro de queijo e hidrodinâmica em um extrator Graesser.** Orientadora: Jane Sélia dos Reis Coimbra. Conselheiros: Luis Antonio Minim e José Antonio Marques Pereira.

Neste trabalho foi estudada, em uma primeira etapa, a separação das proteínas do soro de queijo  $\alpha$ -lactoalbumina ( $\alpha$ -la) e  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg) usando Sistemas Aquosos Bifásicos (SABs), compostos por polietilenoglicol (PEG) e fosfato de potássio (FFP). A seleção dos SABs foi feita avaliando-se a relação de volume entre as fases e os coeficientes de partição das proteínas (K). O sistema que melhor separou as proteínas foi constituído por 18% de polietilenoglicol e 18% de fosfato de potássio em pH 7. Foi analisada a influência da massa molar do PEG (1.500, 4.000, 6.000 e 8.000 dáltons) sobre o coeficiente de partição. Os dados de partição para  $\alpha$ -la mostraram que, quanto maior a massa molar do PEG, menor o valor de K. Para a  $\beta$ -lg foi observada tendência inversa de crescimento de K com a elevação da massa molar do polímero, exceto para PEG 8.000. Foram medidas a viscosidade, densidade e tensão interfacial para os SABs PEG/FFP pré-selecionados. A fase inferior rica em FFP apresentou-se mais densa que a fase superior rica

em PEG, e a viscosidade mostrou comportamento inverso. Visando a caracterização hidrodinâmica do extrator Graesser para estudos futuros de separação contínua das proteínas  $\alpha$ -la e  $\beta$ -lg, foi feito, em uma segunda parte do trabalho, um estudo de distribuição de tempos de residência (DTR) e dos coeficientes de mistura axial nas fases polimérica e salina, da fração retida da fase polimérica no extrator ("Hold-Up") e do ponto de inundação. O sistema analisado nessa etapa foi composto por 18% de PEG 1.500 e 18% de FFP. Na faixa de velocidades de agitação avaliada, de 6,6 a 15,5 rpm, os valores de "Hold-Up" mantiveram-se restritos a uma pequena faixa de variação e diminuíram com o aumento da relação de vazões entre as fases salina/polimérica. Os tempos de residência médios foram de 58 minutos para a fase salina e 65 minutos para a fase polimérica. Para descrever a DTR, foram testados quatro modelos de distribuição de tempos de residência: o da dispersão, aberto e fechado, o da difusão molecular e o de tanques em série. O modelo de dispersão axial para um sistema aberto foi o que melhor representou os dados experimentais. Para a velocidade de agitação de 6,6 rpm ocorreu inundação na condição de operação de 80 mL/min para a fase salina e 8 mL/min para a fase polimérica. A mistura axial aumentou com a elevação da velocidade linear das fases, mostrando dependência suave com relação à elevação da velocidade de rotação.

## ABSTRACT

ZUÑIGA, Abraham Damian Giraldo, M.S., Universidade Federal de Viçosa, July, 2000. **Aqueous systems polyethylene glycol-salt: separation of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin of cheese whey and hydrodynamic in Graesser contactor.** Adviser: Jane Sélia dos Reis Coimbra. Committee Members: Luis Antônio Minim and José Antonio Marques Pereira.

In this work was studied, in a first stage, the separation of whey proteins, alpha-lactalbumin ( $\alpha$ -la) and beta-lactoglobulin ( $\beta$ -lg) using Aqueous Two-Phase Systems (ATPS) composites for polyethylene glycol (PEG) and potassium phosphate (FFP). The selection of the ATPS was made evaluating the relation volume between phases and the proteins partition coefficients (K), the system that better separated proteins it was constituted by 18% of polyethylene glycol and 18% potassium phosphate in pH 7. The influence of the molar mass the PEG (1.500, 4.000, 6.000 and 8.000 dáltons) on the partition coefficient was analyzed. The data of partition for  $\alpha$ -la showed that the increase of the PEG molecular mass, decreasing the K. For  $\beta$ -lg was observed an inversed behavior of K on the increase of the PEG molecular mass, except for PEG 8.000. Phase viscosity, density and interfacial tension were determined. Bottom phase, rich in FFP is more dense than top phase rich in PEG and the viscosity has an invert behavior. Aiming at characterization hydrodynamics of the Graesser extractor for future studies of continuous separations of whey proteins ( $\alpha$ -la and  $\beta$ -lg) was made, in second part of the

work, a study of residence times distribution (DTR), axial mixing coefficients in the polymeric and saline phases, the Hold-Up of polymeric phase in the extractor and of the point of flooding. The system analyzed in this stage, was composite for 18% PEG 1500 and 18% FFP. In the evaluated band of speeds agitation, 6.6 and 15.5 rpm, the values of Hold-Up had been restricted a small band of variation and had diminished with increase the relation of flows rate. The average residence times, been 58 minutes for saline phase and 65 minutes for polymeric phase. To describe the DTR four models of residence times were tested. The model of dispersion for open system was what better represented the experimental data. For the agitation speed of 6.6 rpm occurred flooding in the condition of 80 mL/min for saline phase and 8 mL/min for polymeric phase. The axial mixing increase with the elevation of speed linear phases, showing a soft dependence with relationship to elevation the rotation speed.

## 1. INTRODUÇÃO

O soro de queijo é um efluente industrial rico em proteínas, mas não aproveitado de forma eficiente. Quando descartado sem tratamento adequado, é altamente poluente, devido à sua elevada demanda bioquímica de oxigênio (DBO) (GRASSELLI et al., 1997).

As proteínas do soro de queijo possuem elevado valor funcional e nutricional. Podem ser usadas como espumantes e emulsificantes e são também consideradas ingredientes alimentícios potenciais, com capacidade para substituir outros mais dispendiosos, como a ovalbumina, em produtos cárneos, de panificação e na fortificação de cereais. A  $\alpha$ -lactoalbumina ( $\alpha$ -la) e a  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg) são as proteínas presentes em maior quantidade no soro de queijo e constituem cerca de 20% do conteúdo protéico total do leite (MORR e HA, 1993).

A produção mundial do soro de queijo é de aproximadamente 120 milhões de toneladas (ANUALPEC, 1999), gerando, assim, 720.000 toneladas anuais de proteínas, o que justifica o interesse despertado para o seu aproveitamento industrial.

Devido à vasta aplicabilidade das proteínas do soro de queijo, torna-se importante o desenvolvimento de processos de separação e purificação destas proteínas em grande escala e que também sejam economicamente viáveis. De acordo com SADANA e BEELARAM (1994), os custos operacionais na biosseparação e com os equipamentos para o “dowstream processing”

representam em torno de 50% do valor do composto comercializado, porém, dependendo do sistema, podem chegar a 80%. Portanto, é necessário buscar processos eficientes e econômicos para o processamento de biomoléculas. As técnicas empregadas em biosseparações devem assegurar elevada pureza e rendimento, sem que a atividade biológica da molécula seja afetada. Uma das técnicas de purificação que abrangem esses critérios é a partição de biomoléculas por extração líquido-líquido em Sistemas Aquosos Bifásicos (SABs), ou seja, entre duas ou mais fases aquosas imiscíveis ou parcialmente miscíveis.

A extração com SAB permite isolar biomoléculas de misturas complexas e oferece vantagens, como curto tempo de processamento, fácil aumento de escala, além de ser meio adequado para o trabalho com compostos de origem biológica, pelo fato de as fases serem constituídas de 70% a 90% de água. Recentes melhorias da técnica, com o uso de novos sistemas compostos por polímero/sal ou polímero/polímero, permitem o seu uso em nível industrial. A extração com SAB foi bem sucedida na separação e purificação de enzimas e proteínas, e, dentre os equipamentos de extração líquido-líquido disponíveis no mercado, o extrator Graesser é um dos mais apropriados ao manuseio de SAB (COIMBRA, 1995).

Assim, este trabalho foi realizado visando selecionar e caracterizar um sistema aquoso bifásico, composto por polietilenoglicol-sal-água para extração líquido-líquido, que seja adequado à separação das proteínas do soro de queijo  $\alpha$ -lactoalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina; estudar a influência da massa molar do PEG sobre o coeficiente de partição das proteínas; e analisar a hidrodinâmica do extrator Graesser, em relação à fração retida da fase polimérica ("Hold-Up"), a distribuição de tempos de residência e o ponto de inundação.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Soro de Queijo

O soro de queijo é um subproduto da indústria de queijos, de cor amarelo-esverdeada, obtido pela coagulação do leite. O seu sabor, ligeiramente ácido ou doce, e a sua composição dependem do tipo e do processo de fabricação do queijo, respectivamente. A composição do soro é de aproximadamente 93% de água, 5% de lactose, 0,9% de proteínas, 0,3% de gordura, 0,2% de ácido láctico e pequenas quantidades de vitaminas (BEM-HASSAN e GHALY, 1994). A Tabela 1 apresenta a concentração das proteínas presentes no soro de queijo, mostrando que este é um efluente industrial rico em proteínas, mas que ainda não é aproveitado de forma eficiente (GRASSELLI et al., 1997).

A presença de proteínas no soro, as quais são compostas por aminoácidos em quantidades equilibradas, torna-o um material adequado para uso na alimentação humana. Embora o soro de queijo concentrado seja empregado comumente na alimentação de animais, pode ser processado industrialmente, visando isolar suas proteínas, como a  $\alpha$ -lactoalbumina ( $\alpha$ -la) e a  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg) (RENNER, 1989; TOSI et al., 1997).

A produção mundial do soro de queijo é de aproximadamente 120 milhões de toneladas anuais (ANUALPEC, 1999), equivalentes à produção de 720.000 toneladas de proteínas, o que justifica o interesse que elas despertam. O aumento da produção de soro de queijo causa sérios problemas de poluição,

quando este é descartado diretamente no solo ou despejado em leitos de rios (FRIEDMAN, 1975).

Tabela 1 - Concentração das proteínas no soro de queijo

Proteína	Concentração (g/L)	% da proteína total
$\beta$ -lactoglobulina	2 - 4	50
$\alpha$ -lactoalbumina	1 - 1,5	19
Imunoglobulinas	0,4 - 1,0	13
Albumina do soro	0,4	5
Lactoferrina	0,2	3
Outras proteínas	0,9	10

O descarte contínuo de soro de queijo sobre o solo pode mudar a composição físico-química deste. O nitrogênio do soro é solúvel em água, podendo contaminar o lençol freático, tornando-se assim uma ameaça à saúde humana e animal. Segundo BEM HASSAN e GHALY (1994), o soro de queijo possui uma demanda bioquímica de oxigênio que pode variar de 40.000 a 60.000 mg/L. A lactose é o principal componente, sendo responsável por 80% da poluição causada pelo soro, contra 20% relativa à fração protéica (FERRAT, 1980).

No Brasil, os métodos convencionais de tratamento de resíduos líquidos industriais são basicamente fundamentados em condições de anaerobiose. Os processos mais utilizados empregam sistemas de lodo ativado e lagoas de estabilização. Estes são inviáveis para o tratamento do soro de queijo, devido ao seu elevado teor de matéria orgânica e ao alto custo do processamento, em razão da necessidade de grande quantidade de energia para a aeração e agitação desses sistemas (CEREDA et al., 1986). Assim, é importante desenvolver processos de recuperação dos constituintes do soro que reduzam a sua carga

poluidora, como o reaproveitamento das proteínas mediante técnicas de separação adequadas.

### 2.1.1. Proteínas do Soro de Queijo

As características nutricionais e funcionais das proteínas do soro de queijo estão relacionadas com a sua estrutura e função biológica. Nas últimas décadas observou-se crescente interesse pela qualidade nutricional dessas proteínas, visando o uso do soro na formulação de alimentos infantis e alimentos dietéticos (DE WITH, 1998).

As duas proteínas presentes em maior quantidade no soro de queijo, a  $\alpha$ -la e a  $\beta$ -lg, são globulares, possuem elevadas propriedades nutricionais, funcionais, fisiológicas e terapêuticas, são eficazes na estabilização de emulsões, têm boa capacidade de retenção de água e são ingredientes alimentícios com potencial para substituir outros de maior custo, como, por exemplo, a ovalbumina (HALL e IGLESIA, 1997).

Na Tabela 2 são apresentadas algumas características físico-químicas da  $\alpha$ -la e da  $\beta$ -lg (MORR e HA, 1993).

Tabela 2 - Características físico-químicas da  $\alpha$ -la e da  $\beta$ -lg

	$\alpha$ - lactoalbumina	$\beta$ -lactoglobulina
Massa molar (Dáltons)	14 000	18 000
Nitrogênio (%)	15,9	15,6
Ponto isoelétrico	4,2 a 4,5	5,2
Total de aminoácidos/mol	123	162

A  $\alpha$ -lactoalbumina representa cerca de 20% do conteúdo de proteínas do leite. Esta proteína consiste de 123 resíduos de aminoácidos e é suscetível à desnaturação por calor (65,2°C, pH 6,7) (MORR e HA, 1993). É rica em triptofano,

aproximadamente 6% em peso, apropriada para a preparação de alimentos infantis e provavelmente a de mais baixo custo com essas características (BRAMAUD et al., 1997). Também por hidrólise da  $\alpha$ -la obtém-se uma exorfina, que possui ação opiácea. Este composto pode ser utilizado no tratamento de distúrbios psicossomáticos (GRASSELLI et al., 1997).

A  $\beta$ -lactoglobulina representa cerca do 50% do conteúdo total de proteínas do soro. É constituída por 162 resíduos de aminoácidos, sendo um excelente agente de gelatinização. Entretanto, também é considerada o principal componente alergênico do leite bovino para lactantes (MORR e HA, 1993), pois o leite materno não contém esta proteína, ou está presente em quantidades mínimas, enquanto no leite bovino ela está presente em grande quantidade, como apresentado na Tabela 3 (GRASSELLI et al., 1997).

Tabela 3 - Constituição protéica dos leites humano e bovino

Proteínas	Leite humano (g/ 100 mL)	Leite bovino (g/100 mL)
Caseína	0,25	2,80
$\alpha$ -lactoalbumina	0,25	0,12
$\beta$ -lactoglobulina	não contém	0,30
Imunoglobulinas	0,10	0,05
Lactoferrina	0,17	0,02
Lactoperoxidase	não contém	0,003

A  $\beta$ -lg é uma proteína de grande valor nutritivo, que pode ser usada para a fortificação de bebidas e sucos de frutas, devido a sua grande solubilidade e estabilidade. Preparados enzimáticos hidrolisados com  $\beta$ -lg são usados como suplemento para convalescentes, já que muitos peptídios da  $\beta$ -lg podem ser absorvidos diretamente pelo intestino. Também a partir de hidrolisados de  $\beta$ -lg são preparados leites com baixo conteúdo de fenilalanina, utilizados na alimentação de lactantes com fenilcetonúria, uma enfermidade de origem genética

que provoca a não-metabolização de fenilalanina e causa, entre outros problemas, a deficiência mental (GRASSELLI et al., 1997).

Um estudo feito na Austrália (GRASSELLI et al., 1997) mostrou que o valor comercial das proteínas  $\alpha$ -la e  $\beta$ -lg, separadas, é aproximadamente 10 vezes maior que o de concentrados protéicos de soro, como por exemplo o WPC-35 (concentrado protéico que contém 35% de proteínas em relação aos sólidos totais).

Diferentes métodos para separação de proteínas do soro de queijo têm sido usados, como filtração em gel (YOSHIDA, 1990), precipitação com polifosfatos (AL-MASHIKI e NAKAI, 1987), cromatografia de alta resolução (CHEN et al., 1999) e ultrafiltração (MEHRA e DONNELLY, 1993), dentre outros. Concomitantemente, várias técnicas foram testadas para a quantificação de proteínas de soro de queijo. Por exemplo, PEARCE (1983) e COIMBRA (1995) determinaram o teor de proteínas do soro, usando cromatografia líquida em coluna de fase reversa e com troca iônica, respectivamente.

A ultrafiltração por membranas vem sendo usada para obter concentrados protéicos do soro, apesar de as membranas serem rapidamente obstruídas pelas fosfolipoproteínas e partículas suspensas do soro, levando à diminuição no fluxo de filtração (GRASSELLI et al., 1997).

Nos últimos anos, os SABs têm sido usados na separação de proteínas do soro (COIMBRA, 1995) e na concentração e purificação de outras biomoléculas (ALBERTSSON, 1986). Dentre os diferentes SABs, o mais estudado e comumente empregado é aquele composto por PEG, dextrana e água. Separações de macromoléculas biológicas, membranas celulares e células têm sido realizadas com esses sistemas, sendo a fase superior rica em PEG e a inferior rica em dextrana. As fases contêm aproximadamente 80% a 90% de água (TJERNELD, 1992), o que favorece a estabilidade das proteínas durante a separação, quando se compara com sistemas de extração orgânicos tradicionais. Adicionalmente, têm-se vantagens como curto tempo de processamento e fácil aumento de escala.

## **2.2 - Extração Líquido-Líquido**

A separação de componentes de uma mistura líquida por meio do contato direto dessa solução com um solvente no qual um dos compostos é preferencialmente solúvel é denominada extração líquido-líquido (TREYBAL, 1968). Essa operação unitária é usada, por exemplo, no processamento de combustíveis e na separação de hidrocarbonetos na indústria do petróleo. É aplicada também nas indústrias química, farmacêutica, metalúrgica e de alimentos e no tratamento de efluentes (COULSON et al., 1996; CUSACK et al., 1991).

Nos últimos anos, o aumento na variedade de produtos biotecnológicos e a necessidade paralela de separar compostos de baixa volatilidade relativa, termossensíveis e de pontos de ebulição próximos resultaram na rápida difusão industrial da extração líquido-líquido (GODFREY e SLATER, 1994).

A extração líquido-líquido convencional, usando uma solução aquosa e solventes orgânicos, não é adequada para separar biomoléculas, como proteínas, pois a estabilidade destas é baixa em solventes orgânicos (SUBRAMANIAM, 1998). Uma alternativa adequada aos processos tradicionais em biosseparações é a partição em SAB, a qual vem sendo usada com sucesso no isolamento de proteínas e de outros materiais de origem biológica (KULA et al., 1982).

### **2.2.1 – Tipos de Extratores Líquido-Líquido**

Os vários tipos de extratores podem ser subdivididos em duas categorias distintas: colunas em estágios e colunas diferenciais. As colunas em estágios são constituídas por uma série de estágios, nos quais as fases entram em contato até que o equilíbrio seja atingido. As fases são então separadas e conduzidas para um novo estágio. As colunas diferenciais são construídas de maneira que a composição das fases muda continuamente ao longo do extrator. Esses equipamentos podem ainda ser classificados em função do método de dispersão das fases no regime de escoamento. A dispersão das fases pode ser obtida por ação da força da gravidade, introdução de pulsos, agitação mecânica e/ou força centrífuga (COULSON et al., 1996). A Figura 1 apresenta os tipos de extratores líquido-líquido encontrados comumente.

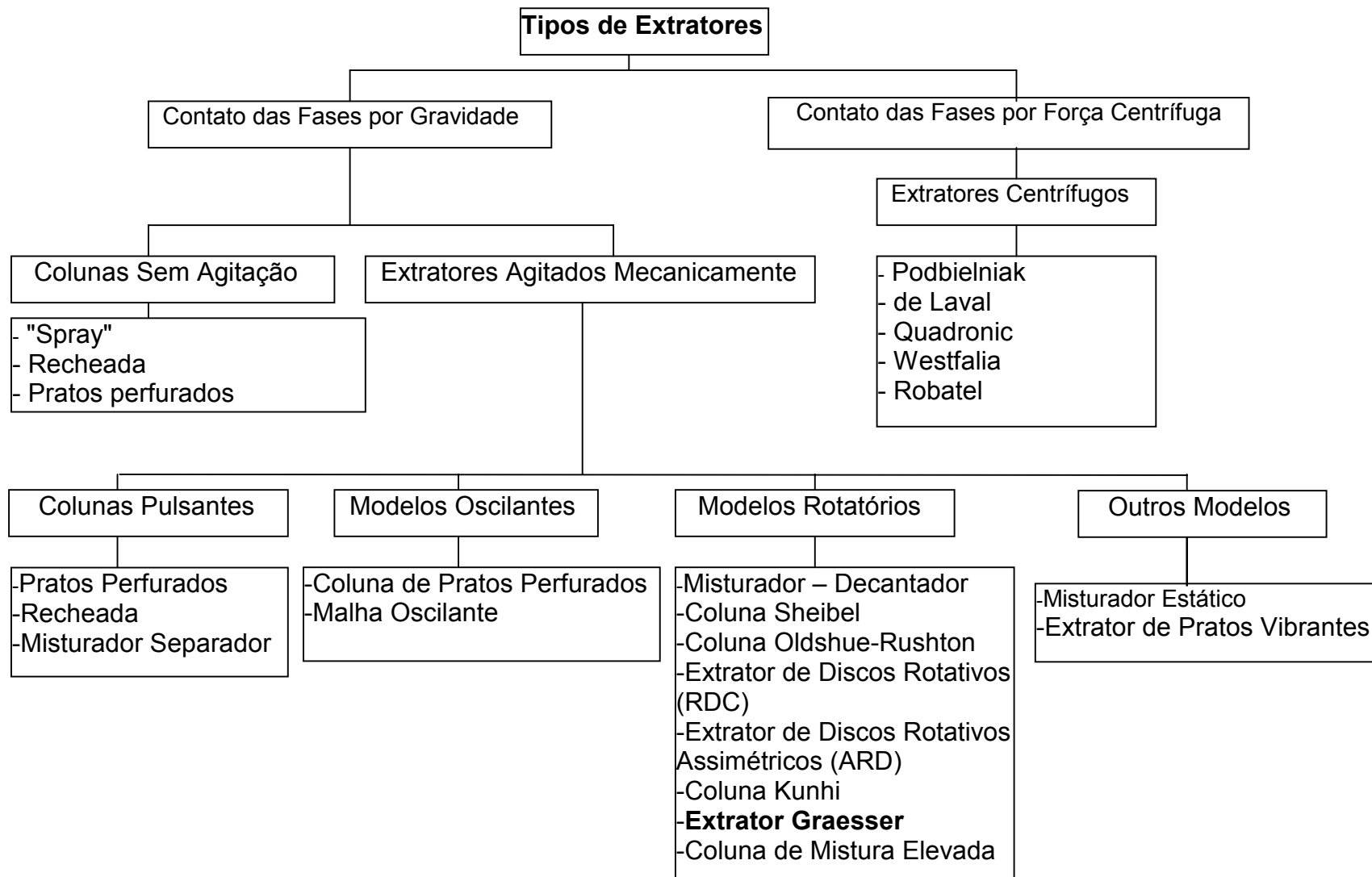


Figura 1 - Classificação dos extratores líquido-líquido (KADER, 1985).

### **2.2.1.1. Extrator Graesser**

O extrator Graesser foi patenteado por COLEBY (1962) e, desde então, tem sido aplicado industrialmente na purificação de herbicidas e na desodorização de naftas. Pode ser utilizado no processamento de misturas líquidas contendo sólidos, como em tratamento de areias de mancais com querosene, recuperação de metais em efluentes da indústria metalúrgica, remoção de tintas de materiais fragmentados, na extração de produtos farmacêuticos, no tratamento de resíduos municipais e na separação de proteínas (COIMBRA et al., 1995).

Neste equipamento (Figura 2), as duas fases são introduzidas em modo contracorrente nas extremidades do extrator, e, ao contrário da maioria dos extratores convencionais, ele é operado horizontalmente. A mistura das fases é devida ao movimento de uma série de cestos cilíndricos parcialmente abertos, que são presos em placas circulares. As placas são fixadas coaxialmente a um eixo horizontal, que está ligado a um rotor de velocidade variável. A geometria do extrator Graesser leva a determinadas características hidrodinâmicas, que o tornam especialmente adequado para o trabalho com SAB (COIMBRA, 1995):

- A suavidade da mistura evita a formação de emulsão estável, pois o tamanho médio da gota é mantido relativamente grande, quando comparado com outros extratores operados continuamente.
- As velocidades de ascensão e queda das gotas são altas, de modo que a interface é renovada, levando a altas taxas de transferência de massa.
- A compartimentação do vaso reduz a mistura axial, um problema em extratores operados continuamente.

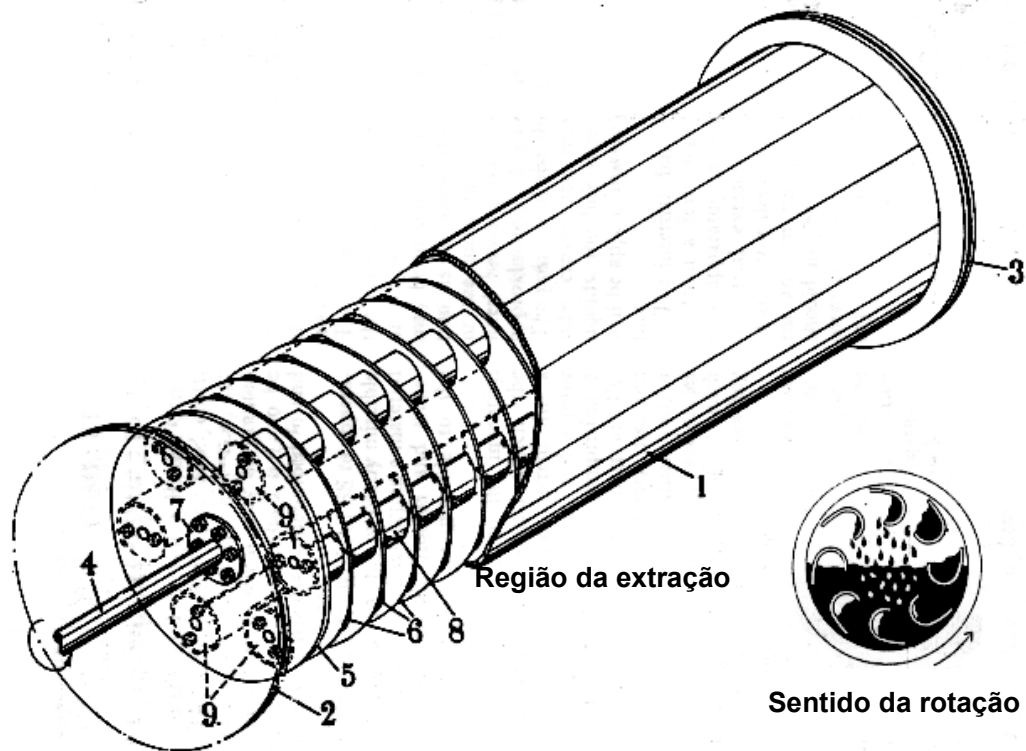


Figura 2 - Extrator Graesser: 1 - corpo cilíndrico, 2 e 3 - placas de fechamento nas extremidades, 4 - eixo de rotação, 5 e 6 - placas cilíndricas rotativas, 7 - flanges para encaixe das placas no eixo de rotação, 8 - cestos semicilíndricos fixos nas placas, 9 - cestos semicilíndricos nas extremidades finais.

## 2.2.2. Caracterização Hidrodinâmica

### 2.2.2.1 Distribuição de Tempos de Residência

A distribuição de tempos de residência (DTR) é aplicada no estudo da dinâmica de processos e no cálculo de parâmetros hidrodinâmicos de um equipamento (STEINER et al., 1988). Esse conceito é usado amplamente em processos químicos e recentemente tem despertado interesse significativo em várias aplicações na área de processos biotecnológicos. Na indústria de alimentos, a DTR tem utilização extensa no que se refere ao processamento asséptico de alimentos, comumente empregado para produtos líquidos, como leites, sucos, concentrados de frutas, iogurtes, ovos, e em suspensões líquidas contendo partículas de tamanho pequeno, como alimentos infantis e concentrados

de tomate (TORRES e OLIVEIRA, 1998). O tempo de residência é definido como aquele durante o qual um elemento do fluido permanece dentro do equipamento. A distribuição desse tempo é expressa através da função de distribuição de tempos de residência (TORRES e OLIVEIRA, 1998).

De acordo com LEVENSPIEL (1992), o procedimento geral para a determinação da DTR parte do estudo de respostas a estímulos fornecidos ao sistema, como ilustrado na Figura 3. Para esse autor, o método de medida mais simples consiste na introdução do traçador na forma de um pulso, e a medida da concentração deste na saída do equipamento é feita em intervalos de tempo regulares. Para caracterizar a distribuição de tempos de residência, o parâmetro mais importante é o tempo de residência médio,  $t_r$ , que é calculado por meio da expressão:

$$t_r \equiv \frac{\sum t_i C_i \Delta t_i}{\sum C_i \Delta t_i} \quad (1)$$

em que

$t_r$  = tempo de residência médio ( adimensional);

$t_i$  = tempo t qualquer (min);

$C_i$  = concentração no instante  $t_i$  (g/mL); e

$\Delta t_i$  = intervalo de tempo (min).

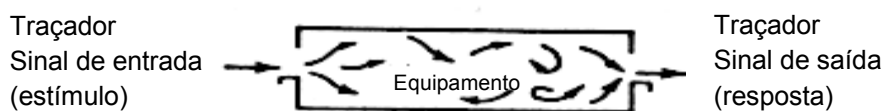


Figura 3 - Técnica experimental para determinação da DTR.

O comportamento das fases é analisado por meio de procedimentos em regimes estacionário e não-estacionário. Na técnica em regime não-estacionário um sinal qualquer é introduzido na entrada do sistema e a resposta é registrada na saída. A Figura 4 apresenta os quatro tipos de sinais freqüentemente usados: aleatório, periódico, tipo passo e aperiódico ou de pulso. Entre os sinais aperiódicos encontra-se o pulso Dirac, em que uma pequena quantidade de traçador é injetada em um curto intervalo de tempo na entrada do sistema. Embora possa ser extraída a mesma informação com as diferentes formas de estímulos de entrada, têm-se estudado mais amplamente os dois últimos tipos de sinais, por serem mais simples de tratar (LEVENSPIEL, 1992).

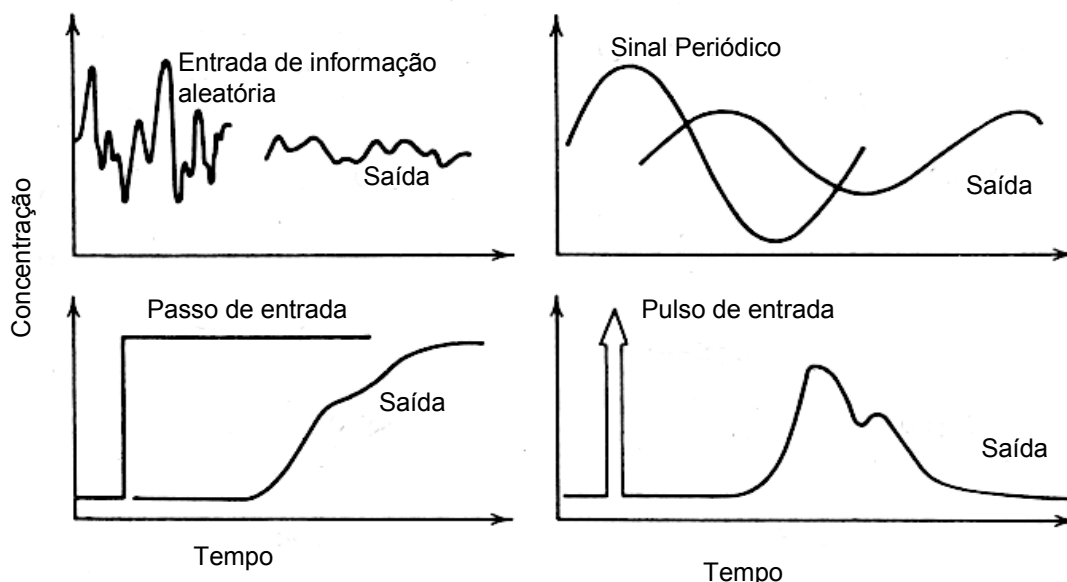


Figura 4 - Comportamento do traçador nas técnicas estímulo-resposta para estudo da DTR.

No caso do sinal aperiódico, utiliza-se como traçador uma substância inerte, cuja quantidade deve ser tal que não interfira no escoamento. É recomendável que não exceda 2% em volume da corrente principal, para evitar a ocorrência de perturbações. Quando o sistema for multifásico, o traçador deve ser solúvel somente em uma das fases (NAUMAN e BUFFMAN, 1983). Os corantes são os marcadores mais usados para estudos hidrodinâmicos de sistemas

modelo e de plantas piloto, sendo que vários métodos experimentais para injeção e detecção de traçadores foram desenvolvidos (TORRES e OLIVEIRA, 1998). Possuem a vantagem de gerar curvas de DTR que são fáceis de analisar, estatística e matematicamente. Essa técnica pode ser usada para caracterização hidrodinâmica de equipamentos, determinação do tempo de residência médio, velocidade média das correntes e grau de mistura e para detectar eventuais distúrbios no escoamento. Alguns exemplos de estudos feitos com traçadores estão compilados na Tabela 4.

Tabela 4 - Traçadores usados em experimentos de DTR

<b>Tipo de traçador</b>	<b>Método de detecção</b>	<b>Aplicação</b>	<b>Referência</b>
<b>Sal</b>			
-NaCl	Condutividade elétrica	Solução de sacarose em trocador de calor tubular	SANCHO e RAO, 1992
<b>Corante solúvel</b>			
-Azul-de-dextrana	Espectrofotométrico	SAB* (extrator Graesser)	COIMBRA et al., 1994
-Azul-de-cibramon		SAB*( extrator Graesser)	COIMBRA et al., 1994
-Azul-de-bromofenol		Água (reator de coluna empacotada)	DE NARDI et al., 1999
-Azul-de-dextrana -Verde-de-bromocresol -Vermelho-do-congo		Solução aquosa de NaCl (trocador de calor tubular)	PALMIERI et al., 1992
<b>CO<sub>2</sub> supercrítico</b>	Colorimétrico	Amido pré-gelatinizado (sistema de extrusão)	SINGH e RIZVI, 1998
<b>Partículas de batata</b>			
-coradas	Câmara de vídeo	Solução aquosa de NaCl (trocador de calor tubular)	PALMIERI et al., 1992
-com peças de imã	Condutividade elétrica	Solução de amido (trocador de calor tubular)	CHANDARANA e UNVERFERTH, 1996
- em cubos	Câmara de vídeo	Solução aquosa de CMC** (trocador de calor tubular)	ALHAMDAM e SASTRY, 1998
<b>Partículas de ágar</b>	Fotográfico	Solução aquosa de CMC (trocador de calor tubular)	SALENGKE e SASTRY, 1995
<b>Radiativo</b>			
-radioisótopo K <sub>r</sub> <sup>85</sup>	Detector de radiação	Oxidação industrial de SO <sub>2</sub> / (reator industrial)	PLASSARI et al., 1999
<b>Ácido</b>			
-ácido cítrico	Potenciométrico	Solução aquosa de NaCl (trocador de calor tubular)	PALMIERI et al., 1992

SAB (PEG 1550-fosfato de potássio), \*\* Carboximetil celulose.

COIMBRA (1995) usou a injeção de um corante concentrado na forma de um pulso Dirac para determinar a DTR em um extrator Graesser operando com um SAB, formado por polietilenoglicol, fosfato de potássio e água.

DE NARDI et al. (1999) avaliaram a influência de vários tipos de traçadores tanto sobre a curva de DTR como sobre os parâmetros hidrodinâmicos de um reator de coluna empacotada com recheio de cerâmica. Os autores observaram que o uso de traçadores diferentes, sob as mesmas condições de operação, resultou em curvas de DTR e tempos de residência variados para o reator estudado, pois ocorria a difusão de determinados traçadores para o recheio da coluna. O traçador para o qual esse efeito não foi observado foi o corante azul-de-dextrana.

PALMIERI et al. (1992) também utilizaram o método de injeção de pulso para estudar a DTR em sistemas de fluxo tubular. O fluido empregado foi uma suspensão de 10% de NaCl, na qual foi injetada uma solução concentrada de ácido cítrico como traçador. Foi observado que, para maiores concentrações do traçador, o tempo de residência médio aumentou ligeiramente.

#### **2.2.2.1.1 Modelos de Distribuição de Tempos de Residência em Extratores**

LEVENSPIEL (1992) apresentou dois modelos principais para o estudo de tempos de residência em equipamentos operando continuamente: o modelo da dispersão e o de tanques em série. O primeiro modelo considera que o escoamento do fluido é do tipo pistão, ao qual se sobrepõe algum grau de mistura axial e retroativa ("backmixing"), implicando a não-existência de bolsas estagnantes ou "bypass" do fluido no equipamento. O segundo modelo considera que o escoamento do fluido é através de uma série de tanques iguais. O parâmetro do modelo da dispersão é o coeficiente de dispersão axial e o de tanques em série é o número de tanques. Alguns dos modelos apresentados por LEVENSPIEL (1992), e que foram usados por diversos autores para determinar a DTR, são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5 - Modelos usados para determinação da DTR

Modelo	Parâmetro	$E(\theta)$	Referência
Dispersão aberto	Pe	$\frac{1}{2\sqrt{\pi\theta\left(\frac{1}{Pe}\right)}} \exp\left[-\frac{(1-\theta)^2}{4\theta\left(\frac{1}{Pe}\right)}\right]$	LEVENSPIEL,1992 COIMBRA,1995 TORRES et al., 1998
Dispersão fechado	Pe	$\frac{1}{2\sqrt{\pi\left(\frac{1}{Pe}\right)}} \exp\left[-\frac{(1-\theta)^2}{4\left(\frac{1}{Pe}\right)}\right]$	SANCHO e RAO, 1992 LEVENSPIEL,1992
Tanques em série	N	$\frac{N(N\theta)^{N-1} \exp^{-N\theta}}{(N-1)!}$	LEVENSPIEL,1992 DE NARDI, 1999

Na nomenclatura para os modelos apresentados na Tabela 5, Pe é o número de Peclet (adimensional),  $\theta$  é o tempo (adimensional), N é o número de tanques e  $E(\theta)$  é a função resposta do modelo.

Os modelos da dispersão e de tanques em série foram usados por DE NARDI et al. (1999) para estudar o comportamento da função DTR em um bioreator de coluna empacotada. Foram testados vários tipos de traçadores (azul-de-bromofenol, azul-de-dextrana e verde-de-bromocresol), injetando-se um pulso concentrado destes. Foi observado que o modelo de tanques em série foi o que melhor se ajustou aos dados obtidos experimentalmente.

TORRES et al. (1998) e COIMBRA et al. (1994) usaram o modelo da dispersão para sistema aberto para estudar a DTR em uma planta piloto de processamento térmico e extrator Graesser, respectivamente, pois foi o modelo que melhor se ajustou aos valores experimentais.

#### 2.2.2.2. Fração Retida da Fase (“Hold-Up”)

Nas diferentes aplicações industriais com colunas de extração líquido-líquido, o conhecimento das frações retidas das fases (“Hold-Up”) é importante no cálculo de transferência de massa, sendo uma informação necessária para o

projeto adequado de extratores (COULSON et al., 1996; MISEK, 1994). O “Hold-Up” é um parâmetro que permite prever o tamanho da gota, o ponto de inundação e, conseqüentemente, a área interfacial de transferência de massa e as condições limites de operação do equipamento. O “Hold-Up” varia freqüentemente com a altura do extrator, além de depender da distribuição do tamanho de gotas e não somente do seu diâmetro médio. Assim, não é suficiente estabelecer as condições operacionais do equipamento, as propriedades do sistema de trabalho e o diâmetro médio da gota para estimar o “Hold-Up” (KORCHINSKY, 1994).

STEINER et al. (1988) e TSOURIS et al. (1990) revisaram algumas técnicas empregadas na determinação do “Hold-Up”: amostragem rápida, radiação gama, medidas ultra-sônicas e estancamento, entre outras. No estancamento, a coluna, ou uma seção dela, é repentinamente bloqueada, medindo-se então o volume da fase de interesse e o volume total, os quais fornecem valores médios de “Hold-Up”, que é calculado por meio da equação 2:

$$\phi = \frac{V}{V_t} \quad (2)$$

em que

$\phi$  = “Hold-Up” (adimensional);

V = volume da fase de interesse (L); e

$V_t$  = volume total (L).

O “Hold-Up” pode ser medido em pontos fixos da coluna ou ao longo do equipamento. COIMBRA (1995) observou que a velocidade de rotação exerceu pequena influência sobre o “Hold-Up” médio determinado em um extrator Graesser, empregando o SAB polietilenoglicol-fosfato de potássio.

COIMBRA et al. (1998) estudaram, em uma coluna de discos rotativos perfurados (PRDC), o efeito das variáveis área livre dos discos, velocidade de rotação e relação de vazão solvente/alimentação sobre o “Hold-Up”, para um SAB composto por PEG/fosfato de potássio. Foi observado que a área livre dos discos exerceu pequena influência sobre o “Hold-Up”. Verificaram também aumento no “Hold-Up” com a elevação da velocidade de rotação dos discos e com a relação de vazão solvente/alimentação.

KADER (1985) estudou o comportamento hidrodinâmico e a transferência de massa em uma coluna de extração de Karr, usando um sistema composto por acetona-tolueno-água. O autor observou o aumento do "Hold-Up" com a elevação da velocidade de agitação, e os valores encontrados localizaram-se na faixa de 0,07 a 0,35.

No trabalho de ARAVAMUDAN e BAIRD (1999), com uma coluna de extração Karr (240 cm de comprimento por 5 cm de diâmetro interno) operando com o sistema isopropanol-água, foi observado o aumento do "Hold-Up" com a elevação da velocidade de agitação. Os valores de "Hold-Up" variaram na faixa de 2,3% a 10% e foram maiores na ausência de transferência de massa.

### **2.2.2.3. Dispersão Axial**

O fenômeno da dispersão axial ou longitudinal em extratores líquido-líquido resulta da combinação de vários fatores, os quais diminuem o gradiente de concentração e, portanto, influenciam negativamente a taxa de transferência de massa. Os fenômenos de mistura axial, radial ou retroativa têm como origem o escoamento vertical ou horizontal dos líquidos no sentido oposto àquele que seria o escoamento natural (CUSACK et al., 1991).

SHEIKH et al. (1972) estudaram a mistura axial, a mistura retroativa e a transferência de massa em um extrator Graesser de 75 cm de comprimento por 15 cm de diâmetro interno, usando um sistema composto por água-n-butilamina-querosene. Os autores observaram que a mistura axial para a fase aquosa aumentou com a elevação da velocidade de rotação e sugeriram o uso de baixas taxas de agitação para obtenção de uma extração eficiente.

COIMBRA et al. (1994), analisando o comportamento hidrodinâmico do extrator Graesser de 100 cm de comprimento por 10 cm de diâmetro interno, usando um SAB composto por polietilenoglicol e fosfato de potássio, constataram a existência da independência do coeficiente de mistura axial com a velocidade de rotação e com a relação entre as velocidades lineares das fases.

## **2.3- Sistemas Aquosos Bifásicos**

Os SABs são constituídos por duas fases imiscíveis, que promovem a separação de produtos provenientes ou não da biotecnologia, em condições amenas e em um ambiente adequado, de forma que sejam preservadas as suas principais características. Esses tipos de sistemas resultam da incompatibilidade, em soluções, de dois polímeros, por exemplo polietilenoglicol (PEG) e dextrana, ou entre um polímero e um sal, como PEG e fosfato de potássio. A incompatibilidade ocorre em função da concentração desses compostos (COIMBRA, 1995).

A alta concentração de água, de 65% a 90%, em tais sistemas favorece a estabilidade das proteínas durante a separação, quando comparados com sistemas tradicionais, compostos com solventes orgânicos (LI et al., 1997).

A formação de SAB foi primeiramente observada por Beijerink, citado por ALBERTSSON (1986), ao misturar ágar, gelatina e água em certas concentrações. A fase superior se tornou rica em gelatina e a inferior rica em ágar. Dobry e Boyer–Kawenoky fizeram um estudo sistemático sobre a miscibilidade de pares de polímeros na presença de água ou de solventes orgânicos, observando quando ocorria ou não a separação de fases (ALBERTSSON, 1986).

ALBERTSSON (1986) relatou que a partir de 1956 a separação de biomoléculas com SAB sofreu grande impulso, quando o autor constatou que a mistura de duas soluções de polímeros estruturalmente diferentes também poderia originar a formação de SAB. Ele aplicou essa técnica para partição de moléculas com atividade biológica.

### **2.3.1. Tipos de Sistemas Aquosos Bifásicos**

Na atualidade, existe grande variedade de polímeros hidrófilos, naturais ou sintéticos, capazes de gerar a separação de fases quando misturados com um segundo polímero ou com um sal. A Tabela 6 mostra alguns exemplos.

Novos polímeros estão sendo usados para processos em larga escala como substitutos da dextrana, em SABs poliméricos. O Hidroxipropil-amido (HPS)

forma SAB com PEG com muita facilidade e foi introduzido no mercado com os nomes de Reppal PES e Aquafase PPT. As propriedades desses sistemas são em muitos casos semelhantes às dos sistemas PEG-dextrana (TJERNELD, 1992). O sistema PEG-polivinil álcool (PVA) tem sido aplicado na partição de leveduras, células e proteínas. Um outro sistema, composto por PEG-maltodextrina (MD), foi usado por MACHADO (1999) para a separação de células de *Lactobacillus acidophilus* H<sub>2</sub>B<sub>20</sub> de um meio fermentado. Pode-se citar também o sistema composto por polipropileno glicol 400 -MD usado por SILVA (2000) para a separação de  $\alpha$ -la,  $\beta$ -lg e albumina de soro bovino (BSA). Um número maior de SAB, com os respectivos diagramas de fase, está detalhado em ALBERTSSON (1986) e ZASLAVSKY (1995).

Em princípio, todos os tipos de sistemas aquosos bifásicos podem ser empregados na separação de biomoléculas. Os sistemas PEG-dextrana ou PEG-sais são amplamente empregados, por se encontrarem disponíveis no mercado em grandes quantidades e não serem tóxicos, e os sistemas PEG-sais apresentam propriedades físicas adequadas, principalmente com relação às diferenças de densidade e de viscosidade (SINHA et al., 1996).

Adicionalmente, a presença de PEG e dextrana em alimentos é permitida em muitos países, enquadrando-se dentro da legislação para aplicação em produtos alimentícios e farmacêuticos. O mesmo pode ser dito para alguns tipos de sais de citrato, fosfato e sulfato (KULA et al., 1982; GUAN et al., 1992).

Para uso em escala industrial, a dextrana apresenta custo muito alto. Assim, os sistemas PEG-sal têm sido usados para extração de enzimas em larga escala (HUSTED et al., 1985), por apresentarem baixo custo e elevada seletividade. Estes sistemas são formados à temperatura ambiente, sendo a fase superior rica em PEG e a fase inferior rica em sal, como mostrado na Figura 5. A separação de fases é atingida mais rapidamente devido à menor densidade de uma das fases, o que facilita o uso de sistemas polímero-sal em aplicações industriais).

Em razão das vantagens apresentadas pelo sistema PEG-sal, este foi escolhido para o estudo de separação de proteínas do soro de queijo, neste trabalho.

Tabela 6 - Sistemas aquosos bifásicos típicos

Polímero	Polímero
Polietilenoglicol	Dextrana (Dx)
	Ficoll
	Hidroxipropil-amido (HPS)
	Polivinil álcool (PVA)
	Polivinil pirrolidona (PVP)
	Maltodextrina (MD)*
Polipropilenoglicol	Maltodextrina**
Polímero	Sal
PEG - copolímeros	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
	$\text{NH}_2\text{CO}_2\text{NH}_4$
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$
	$\text{K}_2\text{CO}_3$
	$\text{K}_3\text{PO}_4$
	$\text{K}_2\text{HPO}_4, \text{KH}_2\text{PO}_4$
	$\text{Na}_2\text{SO}_3$
	$\text{Fe SO}_4$

Fonte: ROGERS (1999), \* MACHADO (1999), \*\*SILVA (2000).

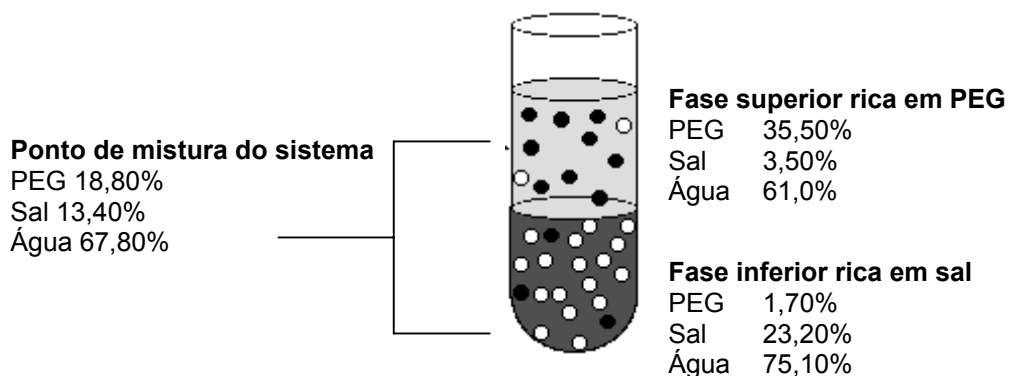


Figura 5 - Composição das fases para uma linha de amarração do sistema PEG1500-FFP-água, a 25°C e pH 7.

### 2.3.2 Características Físico - Químicas dos Sistemas Aquosos Bifásicos

Propriedades físico-químicas como densidade, viscosidade e tensão interfacial variam com a concentração dos constituintes do sistema. Para SAB polímero-polímero, as densidades das fases não são muito diferentes da densidade da água (comumente entre 1,0 g/mL e 1,1 g/mL). A baixa tensão interfacial de SABs poliméricos (de  $1,0 \times 10^{-4}$  mN/m a 0,1 mN/m) proporciona condições amenas para a extração de biomoléculas, como enzimas e células frágeis (ZASLAVSKY, 1992). Os SABs polímero-sais apresentam valores de tensão interfacial na faixa de 0,1 mN/m a 2,0 mN/m (ALBERTSSON, 1986), e a viscosidade da fase polimérica é muito maior que a viscosidade da fase salina.

COIMBRA (1995) determinou a viscosidade de SABs formados por PEG e fosfato de potássio, obtendo valores de 17 cP para a fase polimérica e 2,6 cP para a fase salina.

MACHADO (1999), utilizando sistemas compostos por PEG e maltodextrina, observou que a viscosidade da fase inferior, rica em maltodextrina, era maior que a da fase superior, rica em PEG, com diferenças da ordem de 80 cP. Verificou também que um aumento na massa molar do PEG provocou a elevação da viscosidade das duas fases, porém com maior impacto sobre a fase inferior rica em maltodextrina.

### 2.3.3. Diagrama de Fases

Na Figura 6 está representado um diagrama de fases para o sistema polietilenoglicol e fosfato de potássio. A curva TCB, que divide a região bifásica da região monofásica, é denominada curva binodal ou curva de equilíbrio. Na região acima da curva binodal há formação de duas fases, e abaixo dela a mistura é totalmente miscível.

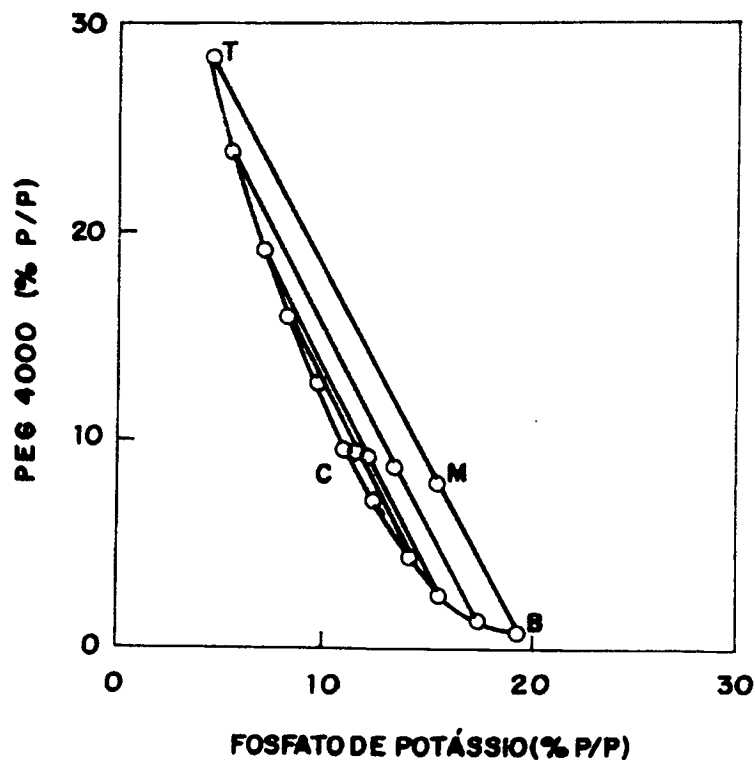


Figura 6 - Diagrama de fases para um sistema polietilenoglicol 4000/fosfato de potássio, a 20 °C ( ALBERTSSON, 1986).

Todos os sistemas com pontos de mistura localizados sobre o segmento de reta TMB, denominada linha de amarração, possuem as composições químicas finais da fase superior rica em PEG e da fase inferior rica em sal idênticas, porém os volumes dessas fases são diferentes. No ponto crítico (C), as

duas fases têm composições e volumes idênticos, sendo portanto indistinguíveis (ALBERTSSON, 1986).

### **2.3.4. Constituintes das Fases**

#### **2.3.4.1. Polietilenoglicol**

O PEG é um poliéter sintético neutro, de cadeia linear ou ramificada, disponível em grande variedade de massas molares, que variam de poucas centenas até milhares de dáltons. Sua fórmula estrutural é:  $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ . O PEG é solúvel em água e em diversos solventes orgânicos. É também conhecido pelos nomes comerciais de poliglicol E®, carbowax® e pluracol E®, dependendo da empresa que o fabrica. Para massas molares acima de 20.000 dáltons, são denominados óxidos de polietileno (PEO). São fornecidos na forma de soluções incolores ou em pastas, se possuírem massas molares menores que 1.000. Os de massas molares elevadas, acima de 1.000 dáltons, são encontrados na forma de pó ou de flocos brancos (COIMBRA, 1995). A oxidação do PEG é detectada pela diminuição do pH, devido à liberação de grupos ácidos, que altera a coloração da solução para marrom (BAMBERGER et al., 1985).

O PEG possui propriedades de interesse em biotecnologia (HARRIS, 1992):

- é solúvel em água, tolueno e em muitos outros solventes orgânicos;
- é insolúvel em éter etílico e hexano;
- pode ser usado para precipitar proteínas e ácidos nucleicos;
- forma SAB com soluções aquosas de outros polímeros ou sais;
- é atóxico e foi aprovado pela FDA (Food and Drug Administration);
- é biodegradável; e
- não provoca a diminuição da atividade de materiais biológicos.

#### 2.3.4.2. Fosfato de Potássio

Os fosfatos são compostos preparados a partir do ácido fosfórico. São utilizados como ingredientes alimentícios em emulsões e dispersões, entre outros (DZIEZAK, 1990).

Os fosfatos de potássio monobásico e dibásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) estão incluídos dentro da classificação dos ortofosfatos. São utilizados como emulsificadores e umectantes de carnes, são bons controladores de pH, têm capacidade de formar soluções-tampão, além de inibirem o crescimento de microrganismos (DZIEZAK, 1990).

O fosfato de potássio monobásico tem massa molar igual a 136,09 e sua fórmula química é  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . O fosfato de potássio dibásico tem massa molar igual a 174,18 e sua fórmula química é  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ .

#### 2.3.5 Distribuição de Biomoléculas em Sistemas Aquosos Bifásicos

Materiais biológicos adicionados em SAB distribuem-se entre as duas fases, sem perda da atividade biológica. A relação entre a concentração de biomoléculas na fase superior e aquela na fase inferior define o coeficiente de partição (K) em sistemas aquosos (ALBERTSSON, 1986):

$$K = \frac{C_T}{C_B} \quad (3)$$

em que

$C_T$  = concentração da biomolécula na fase superior (mg/mL); e

$C_B$  = concentração da biomolécula na fase inferior (mg/mL).

Estudos empíricos com SAB mostraram que a distribuição de proteínas é função de diversos fatores, como:

- Massa molar do polímero

MACHADO (1999), utilizando um sistema PEG-MD para partição de células microbianas, observou que, com o aumento da massa molar do PEG, as células migraram para a fase inferior rica em MD, diminuindo o coeficiente de

partição. Um aumento da massa molar do PEG de 4.000 para 8.000 daltos provocou decrescimo de 70 vezes no valor de K.

CHEN (1992), usando um SAB composto por PEG-FFP para a separação de proteínas do soro de queijo tipo Cheddar, observou que os coeficientes de parto da  $\alpha$ -la e  $\beta$ -lg diminuíram com o aumento da massa molar do PEG.

- Concentração dos polímeros

Estudos feitos por SCHMIDT et al. (1994) mostraram que o aumento da concentração de PEG em um sistema PEG 4.000/fosfato causou decrescimo de 3,2 vezes no coeficiente de parto da  $\alpha$ -amilase, de K = 45 para K = 14.

MACHADO (1999), analisando a parto de celulas microbianas em sistemas PEG 4.000-MD, observou que o aumento da concentração de PEG diminuiu o coeficiente de parto, ou seja, quanto maior a concentração de PEG, maior número de celulas migra para a fase inferior.

- Potencial hidrogeniônico

O pH influencia a dissociação dos grupos ionizáveis das proteínas, alterando a cargas da sua superfície e, conseqüentemente, o seu coeficiente de parto (LEHNINGER, 1976).

SCHMIDT et al. (1994) revelaram que ao elevar o valor do pH de 5,3 para 9,5, o coeficiente de parto da  $\alpha$ -amilase foi aumentado 29 vezes.

- Sais

A composição dos sais presentes em SAB  importante para o sucesso da parto de todas as espécies de moléculas e partículas celulares (ASENJO, 1990).

MACHADO (1999) verificou que, no caso de celulas microbianas, o coeficiente de parto diminuiu com a adição de sal. Quando foi feita a adição de 0,9% de NaCl no sistema PEG 400-MD, o coeficiente de parto das celulas caiu drasticamente de 0,84 para 0,08.

- Temperatura

As mudanças de temperatura podem afetar diretamente a formação do SAB, pois alteram a composição das fases e a posição da curva binodal no diagrama de equilíbrio, bem como o comprimento das linhas de amarração. Geralmente, para temperaturas inferiores a 20C, a curva binodal desloca-se em direção às baixas concentração dos componentes que formam as fases,

resultando em aumento do comprimento das linhas de amarração. Os sistemas próximos do composição do ponto crítico são mais influenciados pela mudança de temperatura, devido à sua instabilidade. Quando a curva binodial é deslocada, o sistema pode atingir facilmente a região monofásica (BAMBERGER et al., 1985; TJERNELD et al., 1990).

Para sistemas formados por PEG e MD, foi constatado que a elevação da temperatura aumentou a inclinação das linhas de amarração (MACHADO, 1999).

### 2.3.6. Aplicações em Grande Escala

A purificação de proteínas em grande escala, empregando SAB, constitui uma técnica alternativa e economicamente viável, comparada com os processos tradicionais de purificação de biomoléculas. Algumas aplicações são mostradas na Tabela 7.

Tabela 7 - Aplicações da extração com SAB

Biomolécula	Sistema	Referência
Pululanase	PEG – Dx	Husted et al.,1978
Formaldeído desidrogenase	PEG – Dx	Kroner et al.,1994
Fumarase	PEG – fosfato	Papamichael, 1992
$\beta$ - galactosidase	PEG – fosfato	Veide et al.,1983
$\alpha$ -glucosidase	PEG – fosfato	Husted et al.,1985
Superóxido Dismutase	PEG – fosfato	Boland et al., 1991
Lactato Desidrogenase	PEG – aquafase	Tjerneld et al.,1987

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Processos de Separação (LPS) do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa-MG.

#### **3.1. Seleção e Caracterização do Sistema de Trabalho**

##### **3.1.1. Preparo dos Sistemas de Fases**

Foram analisados sistemas contendo Polietilenoglicol (PEG) com massas molares médias de 1.500, 4.000, 6.000 e 8.000 dáltons e fosfato de potássio monobásico e dibásico (FFP).

Os critérios empregados para a escolha dos SABs, que melhor se adequaram à separação da  $\alpha$ -lactoalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina, foram a relação de volumes entre fases próxima da unidade e o maior coeficiente de partição.

##### **3.1.1.1 Ensaios em Bancada**

Os sistemas aquosos bifásicos foram formados a partir de soluções estoques de PEG (50% peso/peso) e FFP (30% peso/peso; pH 7). Para o preparo das soluções-estoque de sal a 30%, foram adicionadas quantidades de fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) e dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) na proporção de 1:1,82, para

que fosse atingido o pH 7. Os sistemas, nas concentrações desejadas, foram obtidos em tubos de ensaio, pesando as massas dos componentes provenientes das soluções-estoque. Por exemplo, o sistema 18% PEG (p/p) -18% FFP (p/p, pH 7) foi formado adicionando-se em um tubo de ensaio 3,6 g da solução-estoque de PEG, 6 g de solução-estoque de FFP (30% p/p, pH 7) e água, até completar 10 g. Em seguida, os tubos foram agitados manualmente, por inversão, durante cinco minutos e deixados em repouso por 12 horas, para separação das fases. Na determinação do coeficiente de partição foram empregados 25 g de sistema. Nesse caso, usou-se solução-estoque de FFP 40% (p/p, pH 7).

#### **3.1.1.2. Ensaio no Extrator**

Para os experimentos no extrator Graesser operado de forma contínua, foram preparados sistemas em maior quantidade. Para o sistema estudado (18% PEG 1500 -18% FFP - 64% água) foram pesados diretamente 3,6 kg de PEG 1500, 1,3 kg de fosfato de potássio monobásico, 2,3 kg de fosfato de potássio dibásico e 12,8 kg de água, totalizando 20 kg. Para cada teste foram usados aproximadamente 30 kg de sistema. Os componentes foram agitados por duas horas em recipientes plásticos. Depois de interrompida a agitação, o sistema foi deixado em repouso por 12 horas, para atingir o estado de equilíbrio e para separação das fases. As fases separadas foram introduzidas no extrator.

#### **3.1.2. Relação de Fases**

Para os sistemas PEG - FFP foram determinadas as relações de volumes entre as fases, a partir dos sistemas preparados em 3.1.1.1. Esta relação foi obtida pelo cálculo dos volumes das fases, ao variar as concentrações de polímero e de fosfato de potássio e a massa molar de PEG.

Os volumes foram calculados com o auxílio de um paquímetro e de uma escala métrica, medindo-se o diâmetro e a altura das fases nos tubos que as continham (MACHADO, 1999).

### 3.1.3. Quantificação de $\alpha$ - lactoalbumina e $\beta$ -lactoglobulina nas fases

As proteínas  $\alpha$ -la e  $\beta$ -lg foram quantificadas por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC-Shimadzu, modelo LC-10VP). Após vários testes, as condições de análise foram as seguintes:

- Coluna de fase reversa: (CLC ODS-C18- Shimadzu) de 250 mm por 4,6 mm
- Coluna de guarda: (CLCG-ODS- Shimadzu) de 10 mm por 4 mm
- Fase móvel: (A) acetonitrila, (B) NaCl 0,15 M, pH 2,5
- Vazão da fase móvel: 1 ml/min
- Temperatura: 40°C
- Detector: feixe de diodos (SPD-M10AVP- Shimadzu)
- Volume de injeção: 20  $\mu$ L
- Comprimento de onda: 210 nm

Os reagentes empregados foram de grau analítico, a água foi deionizada, e a acetonitrila, de grau cromatográfico. Todas as soluções de amostras, preparadas com água deionizada e desgaseificada, foram filtradas em membrana de acetato de celulose de 0,2  $\mu$ m (Durapor). Alíquotas das fases foram injetadas de forma automática e todas as análises foram feitas em duplicata.

### 3.1.4. Coeficiente de Partição das Proteínas

O coeficiente de partição foi determinado após a incorporação aos sistemas pré-selecionados de 10 mg de  $\alpha$ -la ou  $\beta$ -lg, puras ou em solução (10 mg/mL). Posteriormente, a massa do sistema foi completada até 25 g com a adição de água. Essa mistura foi agitada por duas horas em um agitador magnético. O sistema foi então colocado em funil de separação e permaneceu em repouso por 12 horas, até atingir o estado de equilíbrio. Após este intervalo de tempo, retiraram-se alíquotas das fases superior e inferior, para quantificação da concentração das proteínas por cromatografia líquida em fase reversa (HPLC-RP). O coeficiente de partição (K), definido como a razão entre a concentração de  $\alpha$ -la ou  $\beta$ -lg na fase rica em PEG ( $C_T$ ) e a concentração da mesma proteína na fase rica em sal ( $C_B$ ), foi calculado através da expressão:

$$k = \frac{C_T}{C_B} \quad (4)$$

### 3.1.5. Curva-Padrão

As curvas-padrão para a  $\alpha$ -la e  $\beta$ -lg foram construídas usando-se soluções das proteínas puras em concentrações na faixa de 0,02 mg/mL a 2,0 mg/mL. As soluções de proteínas foram preparadas empregando-se a fase móvel A (NaCl 0,15M, pH 2,5), o pH da fase móvel foi ajustado usando-se uma solução concentrada de HCl e o coeficiente de determinação para cada curva-padrão foi calculado por meio de análise de regressão linear.

### 3.1.6. Propriedades Físicas das Fases e Diagrama de Equilíbrio

#### 3.1.6.1 Densidade

As densidades das fases foram determinadas em picnômetro de 25 cm<sup>3</sup>, a 25<sup>o</sup>C. Foi pesado em uma balança analítica (*M-310-DENVER*) o picnômetro com a fase inferior ou superior, e a densidade foi calculada pelo peso da fase, dividido pelo volume do picnômetro, o qual foi primeiramente calibrado com água.

#### 3.1.6.2. Viscosidade

A viscosidade de cada uma das fases foi determinada em um viscosímetro de Ostwald. Para isso, foi necessário calcular inicialmente o valor da constante (k) do viscosímetro, com o uso de água. Em seguida, foi medido o tempo médio de escoamento (t) de cada fase no capilar do viscosímetro, sendo a viscosidade calculada para cada fase, mediante a relação:

$$\eta = k\rho t \quad (5)$$

em que  $\eta$  (cP) é a viscosidade dinâmica, k é a constante do reômetro,  $\rho$  (g/cm<sup>3</sup>) é a densidade e t (s) é o tempo médio de escoamento.

### 3.1.6.3. Tensão Interfacial

Para a medida do diâmetro da gota, necessário para o cálculo da tensão interfacial, foi usado um tensiômetro de gotas (Spinning Drop Tensiometer SITE 04 - KRÜSS, Alemanha). Uma pequena gota de 10 µL do fluido de menor densidade (PEG 1500) foi introduzida em um capilar de vidro preenchido com o fluido mais denso (FFP). O capilar foi mantido em uma temperatura fixa (20°C), girando horizontalmente em velocidades de 2.000, 3.000, 4.000, 5.000 ou 7.000 rotações por minuto. Um banho termostático de óleo (DC30/DL30 - HAAKE) e um banho termostático (TE-184 - TECNAL) foram usados para o controle da temperatura do capilar.

O campo centrífugo criado artificialmente pela rotação do capilar gera uma força centrípeta que promove o estiramento da gota ao longo do eixo de rotação e, em sua elongação, é maior com o aumento da velocidade de rotação. Entretanto, devido ao aumento da área, a tensão interfacial se opõe à elongação da gota e obtém-se um estado de equilíbrio (PRINCEN et al., 1967). O diâmetro da gota foi medido no estado de equilíbrio, para cada velocidade, através da lente ocular e da escala graduada presentes no tensiômetro. Para o cálculo da tensão interfacial, utilizou-se uma variação da equação de VONNEGUT (1942):

$$\sigma = e.(vd)^3.n^2. \Delta\rho \quad (6)$$

em que

$\sigma$  = tensão interfacial (mN/m);

$e$  = constante do equipamento ( $3,427 \times 10^{-7}$  mN.cm<sup>3</sup>.min<sup>2</sup> / m.g.mm<sup>3</sup>);

$v$  = fator de correção (0,17 mm / sdv) (sdv: unidade da escala do tensiômetro);

$d$  = diâmetro da gota (sdv);

$n$  = velocidade de rotação (rpm); e

$\Delta\rho$  = diferença de densidade entre as fases (g/mL).

#### **3.1.6.4. Diagrama de Equilíbrio**

Nas análises da composição dos sistemas aquosos bifásicos, foram determinadas as concentrações de dois componentes, sendo o teor do terceiro obtido por diferença. Para significativo número de sistemas PEG/SAL encontrados na literatura, são quantificados os conteúdos de sal e de polímero, calculando-se o teor de água por diferença. Neste trabalho optou-se por determinar a concentração de sal e de água. O teor de PEG foi obtido por diferença. Fosfato de potássio e água foram quantificados através da titulação potenciométrica e da metodologia 31002 da AOAC modificada, respectivamente.

### **3.2. Caracterização Hidrodinâmica do Equipamento**

Para caracterização hidrodinâmica do extrator Graesser foram usados a distribuição de tempos de residência, o coeficiente de dispersão axial e o “Hold-Up”.

#### **3.2.1. Extrator Graesser**

O extrator Graesser (Figura 7) é constituído por um corpo cilíndrico de vidro, equipado com um motor de 0,25 kW e 35 compartimentos formados por 37 placas circulares de aço inoxidável. Em cada placa estão fixados seis cestos semicilíndricos de aço inoxidável, parcialmente abertos na direção da mistura. As dimensões do extrator estão listadas na Tabela 8.

As fases, escoando em modo contracorrente, foram alimentadas pelas extremidades do corpo cilíndrico. A fase rica em sal foi introduzida e retirada na parte inferior pelos lados esquerdo e direito, respectivamente. A fase rica em PEG foi introduzida e retirada na parte superior pelos lados direito e esquerdo, respectivamente.

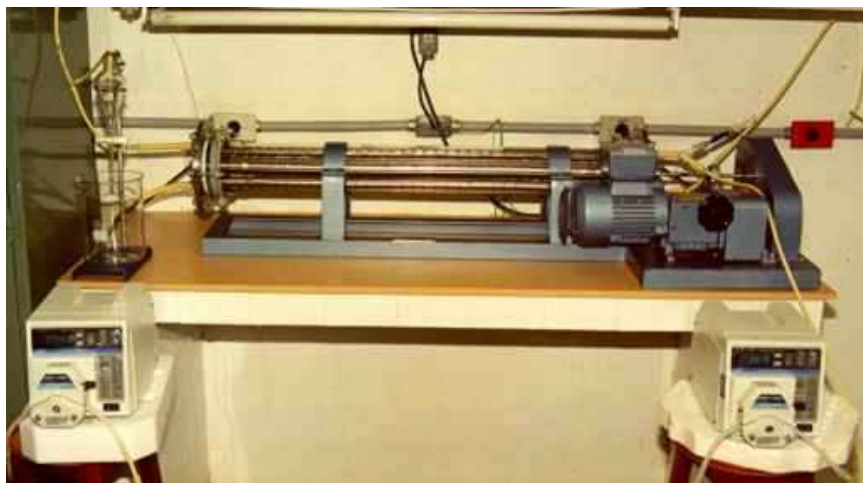


Figura 7 - Montagem experimental do extrator Graesser.

Tabela 8 - Dimensões do extrator Graesser

Diâmetro	(cm)
Interno	10,00
Placa cilíndrica	9,40
Cestos semicilíndricos	2,54
Tubos de entrada e saída	1,30
Eixo do rotor	1,30
Comprimento	(cm)
Total	101,00
Região de mistura	92,00
Região de separação	9,00
Espaçamento entre placas cilíndricas	2,54

### 3.2.2. Condições Operacionais do Extrator

Foram testadas a influência de diferentes velocidades de rotação (6,6; 10; 12,5; e 15,5 rpm) e relações de vazões entre fases polimérica e salina (1:1; 1:0,75; 1:0,5; e 1:0,25) sobre a distribuição de tempos de residência e o "Hold-

Up". Para a medida da velocidade de rotação foi usado um tacômetro digital (AMETEK, modelo 1726).

Para os experimentos de distribuição de tempos de residência nas fases polimérica e salina, as relações entre as fases (rica em FFP/ rica em PEG) escolhidas foram 1:1; 1:0,75; e 1:0,5. As vazões volumétricas para a fase polimérica foram de 40 mL/min e 60 mL/min e, para a fase salina, de 80 mL/min e 60 mL/min. A fase salina foi introduzida como a fase de fundo, e a polimérica, como a de topo.

### **3.2.3. Fração Volumétrica Retida da Fase Polimérica**

Após atingir o estado estacionário, foi determinado o "Hold Up" da fase rica em PEG em uma dada condição de velocidade de agitação e relação de vazões. O "Hold Up" foi obtido pelo método do estancamento, interrompendo-se simultaneamente a agitação e todas as correntes de entrada e saída do extrator. O equipamento foi então descarregado e as fases levadas à decantação para leitura dos volumes, sendo o "Hold-Up" calculado mediante a equação 2. Essa técnica leva a medidas de "Hold-Up" médio.

### **3.2.4. Distribuição de Tempos de Residência**

A distribuição dos tempos de residência (DTR), tanto da fase polimérica como da fase salina, foi obtida pelo método da injeção de um corante, na forma de um pulso Dirac. O traçador foi injetado com o extrator operando em cada uma das velocidades de rotação escolhidas e para as diferentes vazões das fases. O tempo de residência médio foi calculado por meio da equação 1. Foi avaliada a aplicabilidade de quatro modelos de DTR: o da dispersão, para sistemas aberto e fechado, o da difusão molecular e o de tanques em série.

#### **3.2.4.1. Fase Polimérica**

Foi utilizado um pulso de 1 mL de azul-de-cibacrom (concentração de 15 mg/mL e tempo de injeção de 2 s). O traçador foi injetado na entrada da fase PEG. A concentração do traçador na saída da fase polimérica foi determinada

por medidas de absorvância, a 595 nm (espectrofotômetro, Varian-Cary 50). A coleta de amostra foi feita em intervalos de cinco minutos (COIMBRA, 1995).

### 3.2.4.2. Fase Salina

Para a fase salina foi usado um pulso de 1 mL de azul-de-dextrana (concentração de 70 mg/mL, em 5% de uma solução alcoólica, e tempo de injeção de 4 s). O corante foi injetado pela entrada da fase salina e quantificado na saída desta fase por medidas de absorvância a 595 nm (espectrofotômetro, Varian-Cary 50). A coleta de amostra foi feita em intervalos de cinco minutos (COIMBRA, 1995).

## 3.3. Reagentes e Equipamentos

### 3.3.1. Reagentes

	<b>Fabricante</b>
• Polietileno Glicol (PEG) 1500	MERCK/VETC/LABSYNTH
• Polietileno Glicol (PEG) 4000	SIGMA
• Polietileno Glicol (PEG) 6000	SIGMA
• Polietileno Glicol (PEG) 8000	SIGMA
• Fosfato de potássio monobásico e dibásico	MERCK/VETEC/LABSYNTH
• Acetonitrila HPLC	MERCK
• Cloreto de sódio	MERCK
• Azul-de-cibacrom	SIGMA
• Azul-de-dextrana	SIGMA
• Metano HPLC	SIGMA
• $\alpha$ - lactoalbumina	SIGMA
• $\beta$ -lactoglobulina	SIGMA

### 3.3.2. Equipamentos

	<b>Fabricante</b>
• Coluna cromatográfica, 25 cm, C18, CLC ODS(M)	SHIMADZU
• Cromatógrafo HPLC modelo LC-10VP	SHIMADZU
• Auto-Injetor (SIL-10ADVP)	SHIMADZU
• Bombas analíticas dosadoras (LC-10ADVP)	SHIMADZU

- Detector Fotométrico (UV- Visível- SPD-M10AVP) SHIMADZU
- Espectrofotômetro (Cary 50) VARIAN
- Forno para Aquecimento (CTO-10AVP) SHIMADZU
- Sistema de Controle do HPLC (SCL-10AV) SHIMADZU
- Potenciômetro DM20 DIGIMED
- Picnômetro PYREX
- Ultra-som modelo1510 BRANSON
- Extrator Graesser (100 x 10 cm) QVF
- Bombas peristálticas modelo 7523-20 (10-600 rpm) COLEPARMER
- Banho Termostático modeloTE-184 TECNAL
- Reômetro de Ostwald PYREX
- Tensiômetro SITE(Spinning Drop Interfacial Tensiometer) KRUSS
- Balança analítica modelo M-310 DENVER
- Tacômetro digital modelo 1726 AMETEK
- Bomba de vácuo modelo 355.b.2 QUIMIS
- Agitador mecânico modelo 50003-30 COLEPARMER

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos experimentalmente são analisados e discutidos a seguir.

### 4.1 Quantificação de $\alpha$ -lactoalbumina e $\beta$ -lactoglobulina

Na análise do coeficiente de partição foi necessário, primeiramente, definir um método analítico para determinar as concentrações das proteínas presentes em maior quantidade no soro de queijo.

Para quantificação das proteínas  $\alpha$ -la e  $\beta$ -lg, foi desenvolvido um método por cromatografia líquida de alta resolução, em coluna de fase reversa (HPLC-RP), com as seguintes condições cromatográficas: temperatura do forno de 40°C, temperatura ambiente de 25°C, fluxo de 1 mL/min, pressão de 11,76 Mpa e volume da amostra 20  $\mu$ L. As fases móveis selecionadas e o gradiente empregado na determinação analítica da  $\alpha$ -la e  $\beta$ -lg podem ser vistos nas Tabelas 9 e 10, respectivamente. Cabe mencionar que esta metodologia apresentou boa eficiência na separação dos picos, assim como um tempo de análise relativamente curto, igual a 33 minutos.

Tabela 9 - Composição das fases móveis usadas na cromatografia líquida

Fase móvel A	Fase móvel B
0,15M NaCl pH 2,5	Acetonitrila 100%

Tabela 10 - Gradiente empregado na determinação analítica de  $\alpha$ -la e  $\beta$ -lg

	Tempo (min)	Fase móvel B (%)
Gradiente	0 – 3	36
Gradiente	3 – 27	48
Gradiente	27 – 30	0

As curvas-padrão obtidas com soluções puras das proteínas estão representadas nas Figuras 8 e 9. Pode-se observar que os coeficientes de correlação foram elevados para  $\alpha$ -la e  $\beta$ -lg ( $R^2_{\alpha} = 0,9974$  e  $R^2_{\beta} = 0,9972$ , respectivamente).

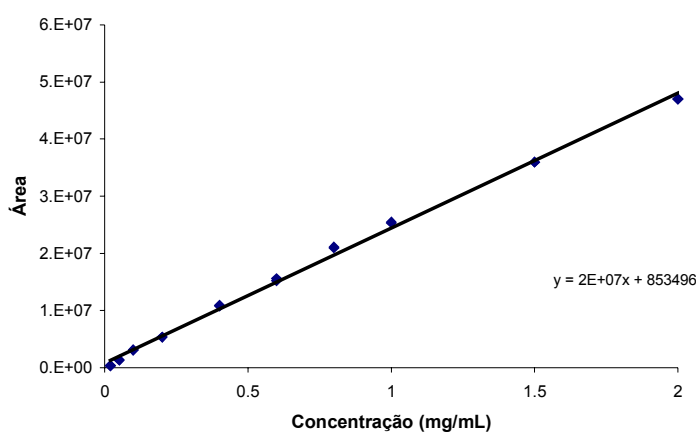


Figura 8 – Curva-padrão para  $\alpha$ -lactoalbumina.

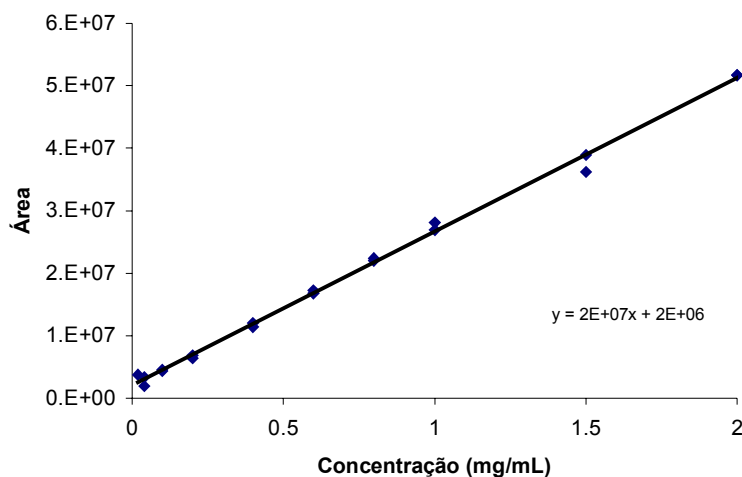


Figura 9 – Curva-padrão para β-lactoglobulina.

Na Figura 10 observa-se um cromatograma das amostras de proteínas puras usadas na construção das curvas-padrão, nas quais foram obtidos dois picos para β-Ig. Essa ocorrência deve-se ao fato de a β-Ig ser um dímero formado por β-Ig A e β-Ig B (CAYOT e LORIENT, 1997). Observa-se que as condições cromatográficas usadas permitiram boa resolução na separação da β-Ig A e β-Ig B em um curto tempo de análise. A β-Ig é considerada o principal componente alergênico do leite bovino, e as variantes genéticas são as que provocam diferentes respostas alergênicas (CAYOT e LORIENT, 1997).

A metodologia mostrou-se também adequada para quantificação das proteínas em amostras de soro de queijo *in natura*, obtido na fabricação de queijo tipo mussarela. Como mostra a Figura 11, para este produto também foram observados os dois picos para a β-Ig. Foram também analisadas amostras de isolado protéico do soro de queijo em pó (BiPro, Davisco Foods), com boa resolução dos picos da α-Ia e β-Ig. As concentrações para ambas as proteínas, nos dois produtos, são apresentadas na Tabela 11.

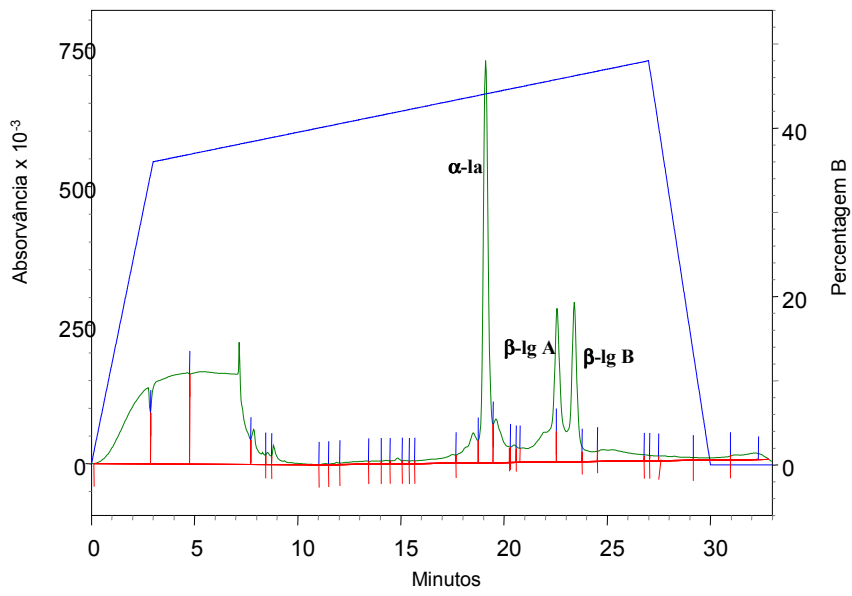


Figura 10 - Cromatograma típico dos padrões de  $\alpha$ -la e  $\beta$ -lg.

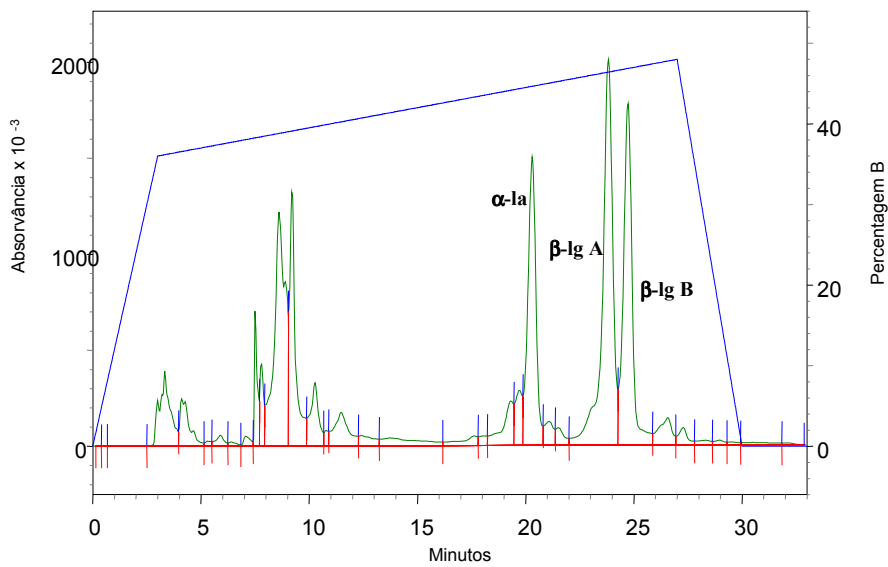


Figura 11 - Cromatograma do soro de queijo *in natura*.

Tabela 11 - Concentração de  $\alpha$ -la e  $\beta$ -lg no soro de queijo *in natura* e no isolado protéico

Amostra	$\alpha$ -la	$\beta$ -lg
Soro <i>in natura</i> (queijo mussarela)	1,12 mg/mL	2,56 mg/mL
Isolado protéico do soro (WPI)	21.63 mg /mL	62,55 mg/mL

## 4.2 Seleção e Caracterização do Sistema de Trabalho

A seleção do SAB foi feita avaliando-se a relação de volume entre as fases e os coeficientes de partição das proteínas, os quais são apresentados a seguir.

### 4.2.1 Relação de Volumes entre as Fases

Foi analisada a influência de concentrações de FFP e PEG, com diferentes massas molares (1.500, 4.000, 6.000 e 8.000 dáltons) sobre a relação de volumes entre as fases formadas. Com PEG de 4.000, 6.000 e 8.000 dáltons foram formados sistemas com proporções de fases distantes da unidade, como mostrado na Tabela 12. Esses sistemas foram então eliminados dos estudos pelo critério da relação de volumes entre as fases. Empregou-se, portanto, PEG de massa molar de 1.500 dáltons nos experimentos de coeficiente de partição. Uma relação de volumes entre as fases muito distante da unidade não inviabiliza o processo, mas leva ao descarte de grande quantidade de uma das fases em detrimento da outra, aumentando os custos do processo. Uma relação de volumes entre as fases distante da unidade poderá ser satisfatória se o composto desejado for coletado na fase que estiver em menor quantidade, o que facilitará a sua separação e pré-concentração.

Os sistemas formados com PEG de 4.000, 6.000 e 8.000 dáltons e com relação de fases próximas da unidade não foram incluídos nas análises posteriores, por apresentarem tempos de separação maiores aos dos sistemas formados com PEG 1500.

Tabela 12 - Relação de volumes entre as fases

PEG (%)	FFP (%)	Vfs/Vfp	Vfs/Vfp	Vfs/Vfp	Vfs/Vfp
		PEG 1500	PEG 4000	PEG 6000	PEG 8000
12	10	NF	0,81	NF	1,90
12	14	1,40	1,65	1,55	1,64
12	16	1,65	1,96	1,76	1,81
12	18	1,87	2,34	2,13	2,15
12	20	2,08	2,26	2,25	2,30
14	10	NF	0,78	1,12	0,97
14	14	1,13*	1,36	1,55	1,59
14	16	1,67	1,68	1,65	1,63
14	18	1,59	1,78	1,73	1,83
14	20	1,76	1,90	2,00	1,95
16	10	0,39	0,74	0,77	0,42
16	14	1,00*	1,29	1,20	0,80
16	16	1,19*	1,46	1,37	1,10
16	18	1,58	1,64	1,52	1,50
18	7	NF	0,14	0,25	0,25
18	10	0,46	0,67	0,73	0,74
18	14	0,90*	1,30	1,12	1,25
18	18	1,17*	1,27	1,35	1,35
22	7	NF	0,25	0,30	0,34
22	10	0,43	0,56	0,59	0,61
22	14	0,74	0,82	0,85	0,89
22	16	0,88	0,93	0,96	0,96
24	7	0,12	0,60	0,29	0,33
24	10	0,42	0,58	0,52	0,58
24	14	0,66	0,73	0,75	0,74

\* Sistemas pré-selecionados; Vfs = volume da fase salina; Vfp = volume da fase polimérica; NF = não formou fases.

A Tabela 13 mostra os sistemas pré-selecionados para os estudos de coeficiente de partição.

Tabela 13 – Sistemas pré-selecionados

Sistema	PEG 1500 (%)	FFP (%)
S1	14	14
S2	16	14
S3	16	16
S4	18	14
S5	18	18

#### 4.2.2 Coeficientes de Partição

Os valores do coeficiente de partição para  $\alpha$ -la e  $\beta$ -lg obtidos com os SABs pré-selecionados e formados com PEG1500 estão apresentados na Tabela 14. Praticamente toda a  $\beta$ -lg permanece na fase salina (baixo valor de K), enquanto a  $\alpha$ -la se transfere em grande parte para a fase polimérica (alto valor de K), o que é indicativo da viabilidade da separação destas proteínas por extração líquido-líquido em sistemas aquosos bifásicos compostos por PEG e fosfato de potássio.

O coeficiente de partição da  $\alpha$ -la é maior que a unidade para todos os sistemas testados, significando que maior quantidade desta proteína migrou para a fase superior. Com a  $\beta$ -lg um efeito inverso foi observado, ocorrendo a sua concentração na fase inferior. Verifica-se, assim, a existência da separação seletiva dessas proteínas do soro de queijo.

Tabela 14 - Coeficientes de partição para  $\alpha$ -Ia e  $\beta$ -Ig

FFP(%)	PEG 1500 (%)					
	$K_{\alpha}$			$K_{\beta}$		
	14	16	18	14	16	18
14	5,46	4,67	4,80	0,160	0,015	0,016
16	NT	4,75	NT	NT	0,021	NT
18	NT	NT	20,55	NT	NT	0,030

NT = Sistemas não testados pelo critério da relação de volume entre as fases.

Os dados obtidos para  $K_{\alpha}$  e  $K_{\beta}$  foram próximos daqueles determinados por CHEN (1992) e COIMBRA (1995). Foi feita uma análise estatística dos dados, por meio do teste de Tukey em nível de significância de 5%, encontrando-se diferenças significativas entre os tratamentos. As Tabelas 15 e 16 mostram a comparação das médias de  $K_{\alpha}$  e  $K_{\beta}$  para os sistemas testados.

Tabela 15 – Médias para  $K_{\alpha}$

Tratamentos	Médias*	
(PEG, FFP)		
S5 (18%,18%)	20,55	<b>a</b>
S1 (14%,14%)	5,46	<b>b</b>
S4 (16%,16%)	4,80	<b>b</b>
S2 (14%,16%)	4,75	<b>b</b>
S3 (14%,18%)	4,67	<b>b</b>

Tabela 16 - Médias para  $K_{\beta}$

Tratamentos	Médias*	
(PEG, FFP)		
S1(14%,14%)	0,160	<b>a</b>
S5(18%,18%)	0,030	<b>b</b>
S3(14%,18%)	0,021	<b>b</b>
S4(16%,16%)	0,016	<b>b</b>
S2(14%,16%)	0,015	<b>b</b>

As médias seguidas de uma mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Pode-se notar que o sistema composto por 18% PEG - 18% FFP (S5) foi o mais indicado para a separação da  $\alpha$ -la e  $\beta$ -lg, por apresentar um valor de k superior ao dos outros sistemas. Observa-se que para os sistemas formados, exceto o S5, os valores de K não diferiram significativamente a 5% de probabilidade. Portanto, este sistema foi escolhido para avaliação da influência da massa molar do PEG sobre o coeficiente de partição das proteínas.

#### 4.2.2.1 Influência da Massa Molar do PEG sobre o Coeficiente de Partição

A Figura 12 mostra o efeito da massa molar do PEG sobre o coeficiente de partição das proteínas  $\alpha$ -la e  $\beta$ -lg. Observa-se que o aumento da massa molar do polímero aumenta a concentração de  $\alpha$ -la na fase inferior, ocasionando a diminuição do coeficiente de partição. Esse comportamento é devido, possivelmente, à elevação da hidrofobicidade do PEG com o aumento da massa molar do polímero. Para a  $\beta$ -lg foi observada uma tendência inversa, isto é, crescimento de K com a elevação da massa molar do polímero, exceto para PEG 8.000. O uso de PEG 1.500 foi, então, o mais apropriado para a separação das proteínas, pois levou a uma separação de  $\alpha$ -la e  $\beta$ -lg em maior proporção.

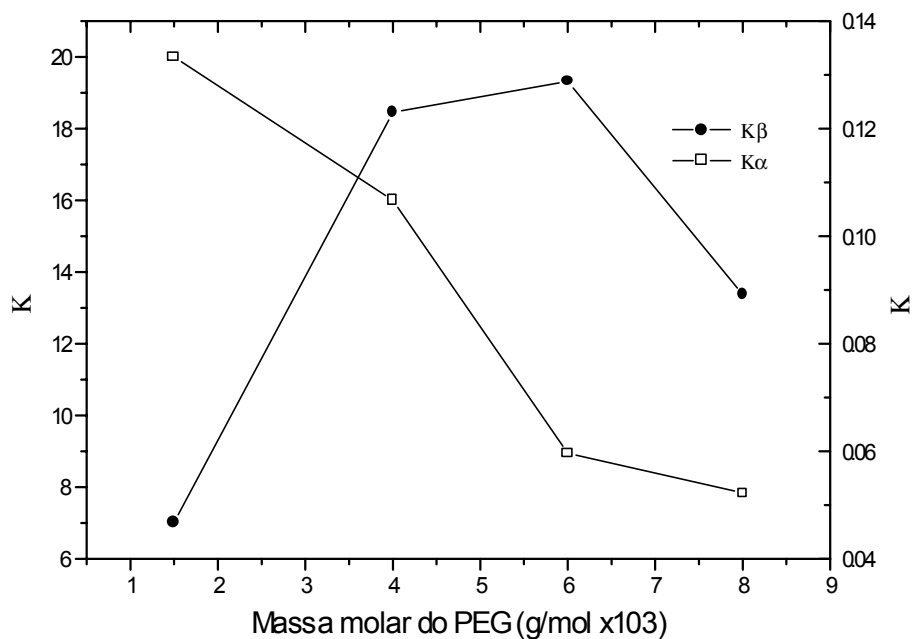


Figura 12 - Efeito da massa molar do PEG na partição de  $\alpha$ -la e  $\beta$ -Ig. Sistema 18% p/p PEG - 18% p/p FFP, a 25 °C.

A influência da massa molar do polímero em sistemas PEG-sal foi estudada por CHEN (1992), e os resultados apresentados na literatura concordam com os deste trabalho.

#### 4.2.3 Propriedades Físicas das Fases e Diagrama de Equilíbrio

##### 4.2.3.1 Densidade

A Figura 13 apresenta as densidades das fases dos sistemas pré-selecionados, a 25°C.

Observou-se diferença de densidade entre as fases. A fase inferior rica em FFP é mais densa que a fase superior rica em PEG. Foi verificado aumento da densidade da fase com a elevação da concentração dos constituintes dos SABs, isto é, de PEG e sal, sendo o sistema que apresentou a maior diferença de densidade aquele composto por 18% de PEG e 18% FFP, como mostrado na Figura 13. Altas diferenças de densidade diminuem o tempo de separação de

fases. O tempo de separação das fases foi relativamente rápido, pois os SABs PEG-sais apresentaram uma diferença de densidades entre as fases na faixa de 8% a 14%.

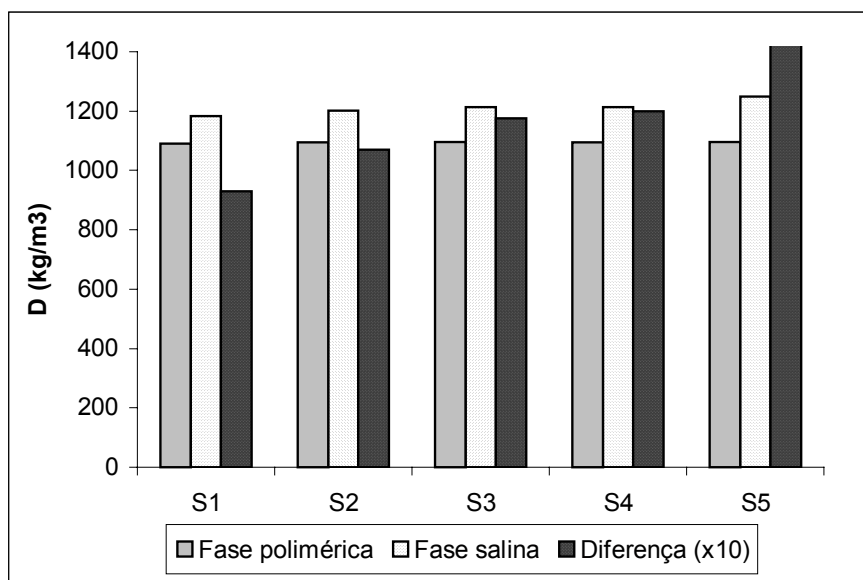


Figura 13 - Densidade das fases para os sistemas pré-selecionados, a 25<sup>0</sup>C.

#### 4.2.3.2. Viscosidade

Na Tabela 17 encontram-se os dados de viscosidade de cada uma das fases a 25<sup>0</sup>C, para o sistema S5, o qual apresentou coeficiente de partição mais afastado da unidade.

Tabela 17 - Viscosidade das fases para o SAB 18% PEG 1500 -18% FFP, a 25<sup>0</sup>C

Fase	Viscosidade (cP)
Polimérica	25,17
Salina	2,50

O sistema S5 apresentou viscosidade elevada da fase polimérica. COIMBRA (1995) também constatou elevada viscosidade da fase polimérica. Esse fato é pouco freqüente na maioria dos casos de extração líquido-líquido tradicional, quando são usados sistemas orgânicos convencionais. Por exemplo, AL-HEMIRI e KAREEM (1990), estudando a distribuição do tamanho de gotas em um extrator Graesser, com sistemas orgânicos compostos por querosene-n-butilamina-água, determinaram viscosidades de 0,84 cP para a fase aquosa e 1,22 cP para a fase orgânica. Como observado na Tabela 17, a diferença de viscosidade entre as fases para o SAB aqui analisado foi da ordem de 22 cP. Essa alta diferença de viscosidade entre as fases terá seu impacto sobre o comportamento hidrodinâmico do extrator. Em estudo feito com SABs compostos por PEG 1550 e FFP foi verificado que as fases exibiam comportamento newtoniano, mostrando que a tensão de cisalhamento é linearmente proporcional à taxa de deformação e não passa pela origem (COIMBRA, 1995).

#### 4.2.3.3. Tensão Interfacial

Observa-se que há elevação da tensão interfacial com o aumento das concentrações de PEG e sal e redução do teor de água dos SABs. A Figura 14 mostra esse comportamento.

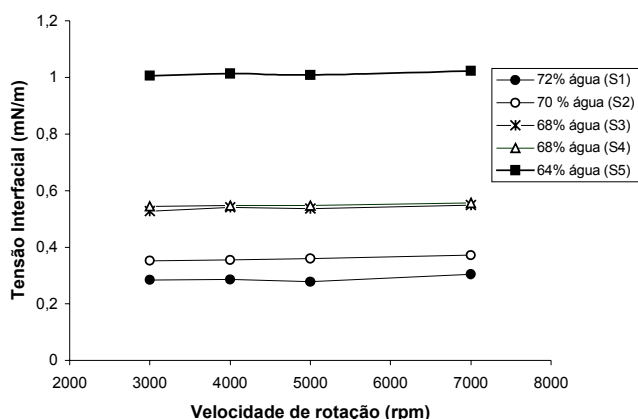


Figura 14 - Tensão interfacial média em função da velocidade de rotação do capilar do tensiômetro.

Como pode ser visto na Figura 14, a velocidade de rotação praticamente não alterou os dados de tensão interfacial para um mesmo sistema, validando assim o uso da equação de VONNEGUT (1942) para SABs compostos por PEG-sal.

A Tabela 18 apresenta dados de tensão interfacial, a 20<sup>o</sup>C, para os sistemas pré-selecionados. As tensões interfaciais obtidas encontram-se na faixa citada por ALBERTSSON (1986). Observa-se que os valores de tensão interfacial dos SABs pré-selecionados foram baixos, quando comparados com os sistemas de extração líquido-líquido convencionais. Por exemplo, ARAVAMUDAN e BAIRD (1999) determinaram para o sistema isopropanol-água um valor de tensão interfacial de 35 mN/m. Uma tensão interfacial elevada, de 20 mN/m, também foi observada para o sistema composto por ácido isobutírico-água (GHALEHCHIAN e SLATER, 1999). Altas tensões interfaciais tendem a promover rápida separação entre as fases, entretanto dificultam a dispersão das fases durante a extração, aumentando o consumo de energia necessária para gerar esta dispersão (TREYBAL, 1968). Por outro lado, baixas tensões interfaciais propiciam a formação de emulsões estáveis, dificultando a separação das fases.

Tabela 18 - Tensão interfacial média dos sistemas pré-selecionados

Sistemas	Tensão Interfacial (mN/m)
S1	0,28
S2	0,36
S3	0,54
S4	0,55
S5	1,01

#### 4.2.3.4. Diagrama de Equilíbrio de Fases

Além da determinação das propriedades físicas, foi construído o diagrama de equilíbrio de fases para o sistema composto por PEG 1500 - FFP - água, a 25°C e pH 7. Três linhas de amarração foram determinadas para este SAB, de acordo com os dados apresentados na Tabela 19. A curva binodal é mostrada na Figura 15. Observa-se que ocorre a formação de duas fases em condições extremas de baixas concentrações de PEG e altas concentrações de FFP ou em altas concentrações de PEG e baixas concentrações de FFP.

Tabela 19 – Composição das fases para o sistema PEG 1.500 - FFP - água, a 25°C e pH 7

Sistema	Ponto de mistura			Fase superior			Fase inferior		
	PEG	FFP	água	PEG	FFP	água	PEG	FFP	água
1(O)	16,9	12,0	71,1	29,8	4,7	65,5	0,86	21,4	77,8
2(□)	18,8	13,4	67,8	35,5	3,5	61,0	1,70	23,2	75,1
3(Δ)	18,0	18,0	64,0	43,1	2,7	54,2	2,30	26,6	71,1

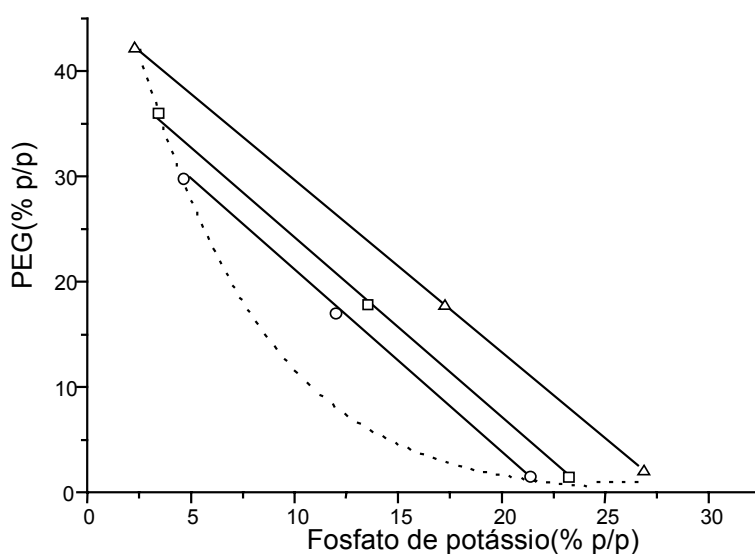


Figura 15 - Diagrama de equilíbrio para o sistema PEG 1.500 - FFP - água, a 25°C e pH 7.

### 4.3. Caracterização Hidrodinâmica do Extrator Graesser

Para caracterizar a hidrodinâmica do extrator Graesser foi avaliada a distribuição de tempos de residência, que gerou os coeficientes de dispersão axial, e foram feitas medidas de “Hold Up”, sob condições de operação preestabelecidas.

#### 4.3.1. Distribuição de Tempos de Residência e Dispersão Axial

Para descrever a DTR foram testados quatro modelos: os modelos de tanques em série e da difusão molecular, aos quais os dados obtidos no extrator não se ajustaram, e o modelo da dispersão axial para sistemas aberto e fechado. Para o sistema fechado, o modelo representou bem os dados experimentais, embora o ajuste tenha sido inferior ao do modelo da dispersão aberto, conforme visto na Figura 16. A partir das equações para o modelo da dispersão aberto (LEVENSPIEL, 1992), foi calculado o número de Peclet (Pe) pelo método de Marquardt, usando-se o procedimento de regressão não-linear do SAS "proc NLIN" (SAS, 1989). O número de Pe foi usado para determinação dos coeficientes de dispersão axial ( $D_x$ ) para cada condição de trabalho.

A equação diferencial básica, em forma adimensional, usada para representar o modelo da dispersão foi (LEVENSPIEL, 1992):

$$\frac{dC}{d\theta} = \left( \frac{1}{Pe} \right) \frac{d^2C}{dz'^2} - \frac{dC}{dz'} \quad (7)$$

Com as variáveis adimensionais:

Pe = número de Peclet ( $UL/D_x$ );

C = concentração adimensional ( $C_i / \sum C_i$ );

$\theta$  = tempo adimensional ( $t/t_r$ );

$z'$  = coordenada espacial ( $z/L$ );

$D_x$  = coeficiente de dispersão axial ( $m^2.s^{-1}$ );

U = velocidade linear média ( $m.s^{-1}$ );

L = comprimento do extrator (m);

$t$  = tempo (s);

$t_r$  = tempo de residência médio (s); e

$z$  = distância axial (m).

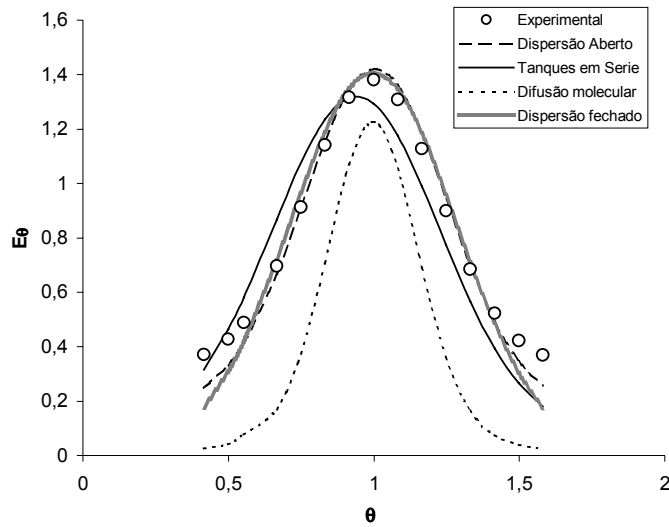


Figura 16 - DTR na fase polimérica para um pulso de azul-de-cibacron ( $Q_p = 40$  mL/min;  $Q_s = 80$  mL/min; 6,6 rpm).

Para obtenção da função distribuição de tempos de residência, foram empregados os termos definidos na Tabela 20.

Tabela 20 - Variáveis usadas nos modelos para predição da DTR

Variável	Definição
$E_i$	$C_i/Q$
$Q$	$\sum (C_i \cdot \Delta t_i)$
$t_r$	$\sum (t_i \cdot C_i \cdot \Delta t_i) / \sum (C_i \cdot \Delta t_i)$
$\theta$	$t/t_r$
$E(\theta)$	$t_r \cdot E_i$

A Figura 17 mostra que os dados obtidos experimentalmente foram bem ajustados àqueles calculados pelo modelo da dispersão aberto, o qual apresentou um coeficiente de determinação igual a 0,93. Os erros não foram tendenciosos, sendo os resíduos distribuídos aleatoriamente.

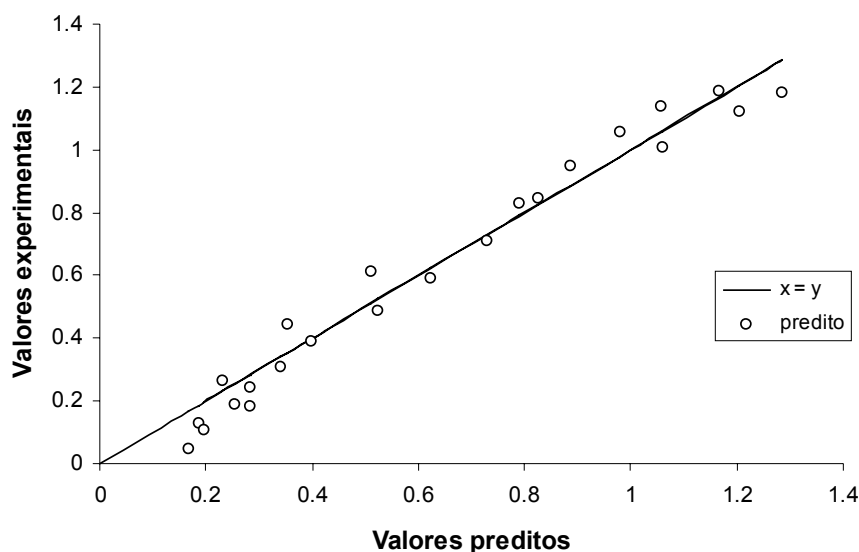
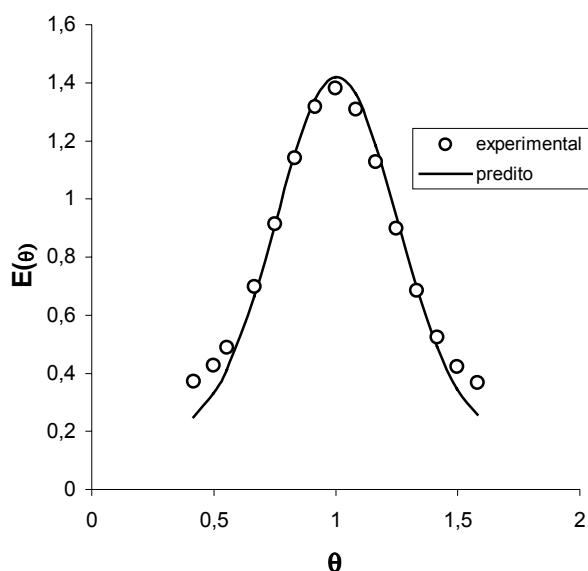


Figura 17 - Dados experimentais versus dados preditos pelo modelo da dispersão, para a fase salina ( $Q_p = 40$  mL/min;  $Q_s = 80$  mL/min; 10 rpm).

#### 4.3.1.1. Fase Polimérica

A Figura 18 é um exemplo da função DTR para a fase polimérica obtida através das concentrações experimentais medidas na saída do extrator e daquelas preditas pelo modelo da dispersão aberto. Pode-se observar que os dados experimentais foram bem reproduzidos pelo modelo da dispersão, validando assim o uso dos resultados de DTR para o cálculo do coeficiente de dispersão axial pelo modelo da dispersão.

COIMBRA (1995) e KADER et al. (1985) usaram o modelo da dispersão aberto para a determinação da DTR em um extrator Graesser e em uma coluna Karr, respectivamente. O comportamento da curva de DTR observado pelos



autores foi semelhante ao obtido neste trabalho.

Figura 18 - DTR na fase polimérica ( $Q_p = 40$  mL/min;  $Q_s = 80$  mL/min; 6,6 rpm).

Por meio dos resultados das medidas de tempos de residência médios para a fase polimérica, foi verificado que a taxa de escoamento da fase salina não influencia a DTR da fase polimérica. A vazão da fase rica em PEG foi mantida fixa para diferentes taxas de escoamento da fase salina. Como apresentado na Tabela 21, os valores de tempo de residência médio foram próximos para a mesma condição de vazão da fase polimérica (60 mL/min), para diferentes vazões da fase salina e velocidades de agitação de 6,6, e 12,5 rpm. Para 10 rpm houve maior variação, de 25%, no tempo de residência médio para os dois sistemas, com vazão da fase polimérica constante. Esta variação para 6,6 rpm foi de 5%, e para 12,5 rpm, de 2%.

Uma alteração na vazão da fase polimérica, mantendo constante a vazão da fase salina (80 mL/min), levou a maiores valores de tempo de residência médio para a mais alta vazão da fase polimérica (60 mL/min). Este comportamento era esperado, por se ter maior quantidade de fase polimérica no interior do equipamento.

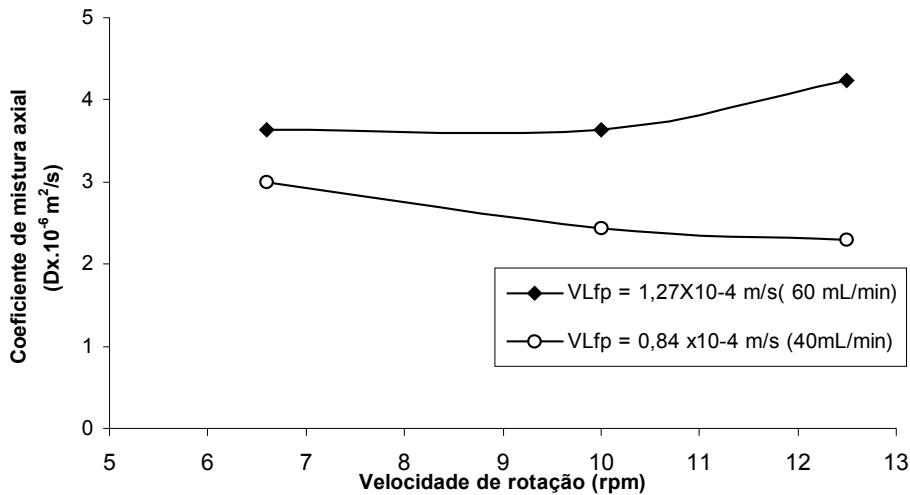
Tabela 21 - Tempos de residência médios para a fase polimérica

Vazões (mL/min) Qs - Qp	Velocidade de rotação (rpm)		
	6,6	10	12,5
80 - 60	66,71 min	55,56 min	68,64 min
60 - 60	70,31min	69,49 min	69,85 min
80 - 40	60,10 min	63,94 min	66,15 min

Para a análise da mistura axial na fase rica em PEG, foi examinada a influência da velocidade de rotação sobre o coeficiente de mistura axial ( $D_x$ ).  $D_x$  foi calculado a partir da equação para o modelo da dispersão, mediante a relação:  $D_x = UL/Pe$ , em que  $D_x$  é o coeficiente de mistura axial ( $m^2.s^{-1}$ ),  $U$  é a velocidade linear da fase ( $m.s^{-1}$ ),  $L$  é o comprimento do extrator (m) e  $Pe$  é o número de Peclet (adimensional) gerado para as diferentes condições de trabalho.

A mistura axial pode ser influenciada pela velocidade da fase ou pela relação entre as velocidades lineares das fases (COIMBRA, 1995). Para analisar essa dependência, foram realizados experimentos em diferentes velocidades lineares da fase polimérica. Como mostrado na Figura 19, foi constatado que o aumento da velocidade linear da fase polimérica elevou o grau de mistura axial, expresso por maiores valores de  $D_x$ . Esse comportamento era esperado, pelo fato de que maiores velocidades lineares podem aumentar a turbulência do sistema e, conseqüentemente, os valores de  $D_x$ . Para a velocidade de  $1,27 \times 10^{-4}$  m/s, o coeficiente de mistura axial foi maior em mais altas velocidades de rotação, as quais podem provocar acréscimo no grau de turbulência do sistema. Entretanto,

para a velocidade de  $0,84 \times 10^{-4}$  m/s,  $D_x$  mostrou comportamento oposto, devido, provavelmente, à maior quantidade de fase menos viscosa, salina, presente no interior do equipamento. WANG et al. (1977), estudando o comportamento hidrodinâmico de um extrator Graesser, operando com um sistema composto por querosene-n-butilamina, observaram que o coeficiente de mistura axial diminuiu tanto com o aumento da vazão da fase de menor viscosidade quanto com o da



velocidade de rotação.

Figura 19 - Influência da velocidade de rotação sobre  $D_x$  na fase polimérica ( $Q_s = 80$  mL/min).

A Figura 20 mostra que o grau de mistura axial para a fase polimérica foi influenciado pela razão entre as vazões das fases. O coeficiente de mistura axial foi maior para a razão 1,33 que para a razão 1, em todas as velocidades de rotação testadas e para a vazão da fase polimérica mantida constante (60 mL/min). Esse comportamento era esperado, pois o aumento de vazões leva a aumento da velocidade linear das fases e, em consequência, a maior grau de turbulência no sistema. Nessas condições, pode-se observar que existe dependência suave de  $D_x$  com a velocidade de rotação.

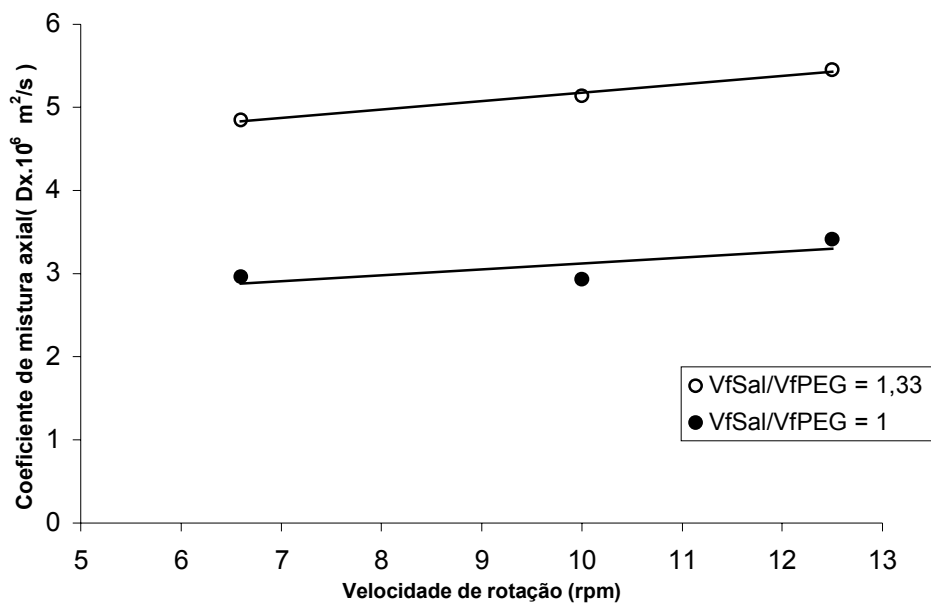


Figura 20 - Influência da velocidade de rotação sobre  $D_x$  na fase polimérica ( $Q_p = 60 \text{ mL/min}$ ).

#### 4.3.1.2. Fase Salina

A Figura 21 apresenta a DTR normalizada para a fase salina. Os pontos referem-se aos dados medidos experimentalmente, e a linha cheia, aos valores calculados pelo modelo da dispersão aberto. Nota-se que o modelo foi bem ajustado aos dados obtidos experimentalmente, com um  $R^2$  igual a 0,92. Neste caso, também foi observado que os resíduos se distribuíram aleatoriamente.

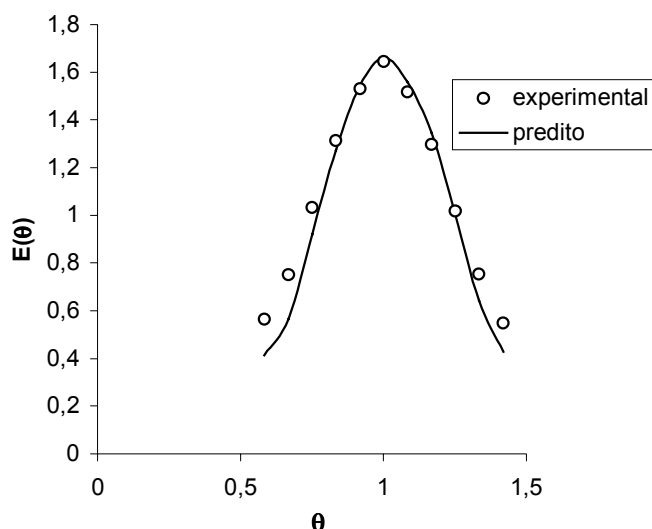


Figura 21 - DTR na fase salina ( $Q_p = 60$  mL/min;  $Q_s = 60$  mL/min; 10 rpm).

A Tabela 22 apresenta os resultados de tempos de residência médios para a fase salina. Verifica-se que, quando a vazão da fase salina permanece constante (80 mL/min), os tempos de residência médios da fase salina são mais influenciados pela vazão da fase polimérica do que os da fase polimérica pela vazão da fase salina. No comportamento da DTR para a fase salina, os valores de tempos de residência médios, sob as mesmas condições de vazão e diferentes velocidades de rotação, variaram entre 36% e 67%. Essas diferenças podem ser atribuídas à elevada viscosidade da fase polimérica, o que pode provocar alterações sobre o escoamento das fases e na hidrodinâmica do equipamento.

Tabela 22 - Tempos de residência médios para a fase salina

Vazões (mL/min) $Q_s - Q_p$	Velocidade de rotação (rpm)		
	6,6	10	12,5
80 – 60	47,46 min	50,80 min	47,14 min
80 – 40	79,54 min	71,63 min	64,55 min
60 – 60	55,86 min	59,92 min	47,16 min

Na Tabela 22 observa-se que, em uma mesma condição de vazão da fase polimérica (60 mL/min), os tempos de residência médios da fase salina diminuíram com o aumento da vazão da fase salina e, portanto, com o aumento da velocidade linear desta fase, para todas as velocidades de rotação testadas. Em estudos de DTR para trocadores de calor do tipo tubular, foram obtidos resultados semelhantes aos deste trabalho. Foi verificado que o tempo de residência médio diminuiu com o aumento da vazão do fluido que escoava no interior dos trocadores de calor (TORRES et al.,1998; ALHAMDAM e SASTRY, 1998; SALENGKE e SASTRY, 1995).

A Figura 22 mostra a dependência da mistura axial na fase salina com o aumento da velocidade de rotação. Observa-se também que maiores vazões da fase salina levaram a um aumento do grau de mistura axial, expresso por maiores valores de  $D_x$ , para velocidades constantes. A mesma tendência foi verificada para a fase rica em PEG. Assim, maiores velocidades de rotação levaram a um maior grau de turbulência do sistema, aumentando os valores de  $D_x$ .

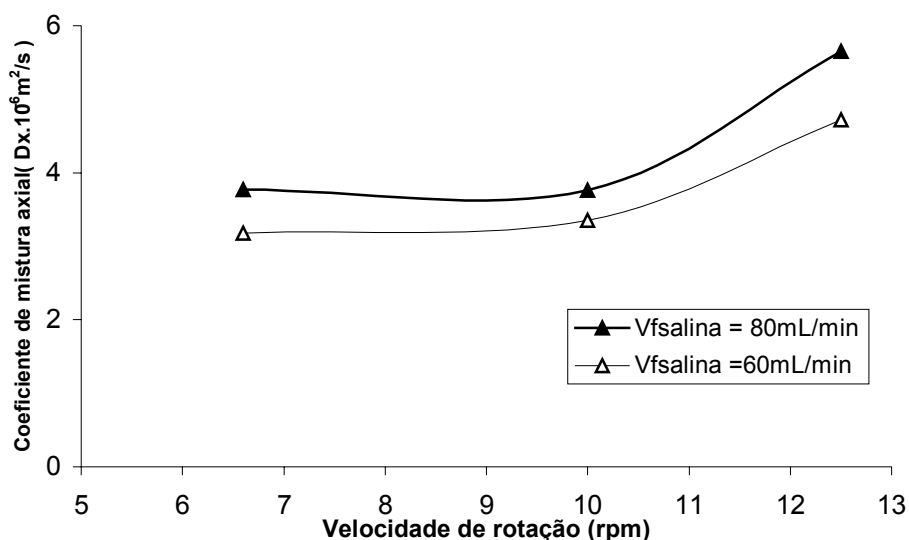


Figura 22 - Influência da velocidade de rotação sobre  $D_x$  na fase salina ( $Q_p = 60$  mL/min).

A Figura 23 indica que a vazão da fase polimérica tem pequena influência sobre o coeficiente de mistura axial da fase salina. Para diferentes velocidades de rotação, na vazão da fase polimérica de 40 mL/min,  $D_x$  da fase salina mostrou comportamento oposto àquele apresentado por  $D_x$  da fase polimérica, possivelmente devido à maior quantidade da fase menos viscosa, salina, no interior do equipamento.

Foi constatado também que os valores de  $D_x$  para a fase rica em sal são levemente maiores do que os da fase polimérica.  $D_x$  variou, para a fase salina, de  $2,8 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$  a  $5,7 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$  e, para a fase polimérica, de  $2,3 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$  a  $5,1 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$ . Em estudos realizados em extrator Graesser, com sistemas de extração líquido-líquido convencionais, foram descritos resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho, no que se refere ao comportamento de  $D_x$  da fase de maior viscosidade; os valores de  $D_x$  para a fase de maior viscosidade foram menores (SHEIKH et al., 1972; WANG et al., 1977).

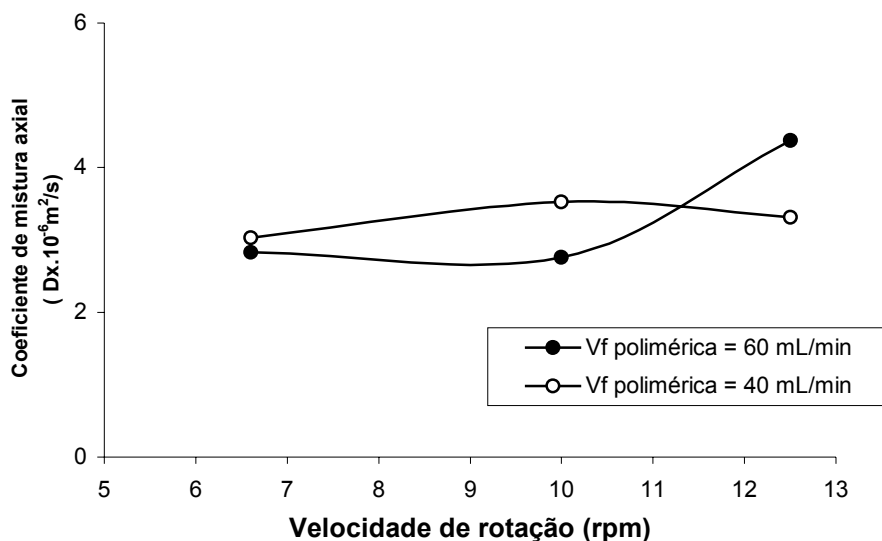


Figura 23 - Influência da velocidade de rotação sobre  $D_x$  na fase salina ( $Q_s = 80 \text{ mL/min}$ ).

COIMBRA (1995) obteve, para um extrator Graesser operando com SAB PEG - FFP, valores de  $D_x$  na ordem de grandeza de  $10^{-6}$ . Os dados deste trabalho encontram-se dentro dessa faixa de  $D_x$  e apresentam a mesma tendência com relação ao aumento da velocidade linear das fases.

#### **4.3.2. Fração Volumétrica Retida da Fase Polimérica (“Hold-Up”)**

Para o projeto de colunas de extração e para cálculos de transferência de massa, é necessário o conhecimento do “Hold-Up”. A literatura relata que, para sistemas de extração tradicionais com solventes orgânicos em extratores verticais, existe a tendência do aumento do “Hold-Up” com o aumento da relação de vazões e da velocidade de rotação (ARAVAMUDAN e BAIRD, 1999; KUMAR e HARTLAND, 1995).

Neste trabalho foram estudados os “Hold-Up” da fase polimérica que praticamente não variaram com o aumento da velocidade de rotação, sendo que diminuiriam com a elevação da relação de vazão e com a redução da vazão da fase polimérica, quando a vazão da fase salina foi mantida constante (80 mL/min). A Figura 24 mostra esse comportamento, gerado pela presença de menores quantidades de fase polimérica no equipamento. As faixas de variação do “Hold-Up” foram: (0,50-0,58), (0,46-0,54), (0,38-0,45) e (0,24-0,27) para as relações de vazão 1; 1,33; 2; e 4, respectivamente. Uma análise da equação (2) mostra que os valores de “Hold-Up” da fase salina, nas mesmas condições de operação, seriam maiores que os da fase polimérica, apresentando também comportamento inverso quando esta fase é mantida fixa.

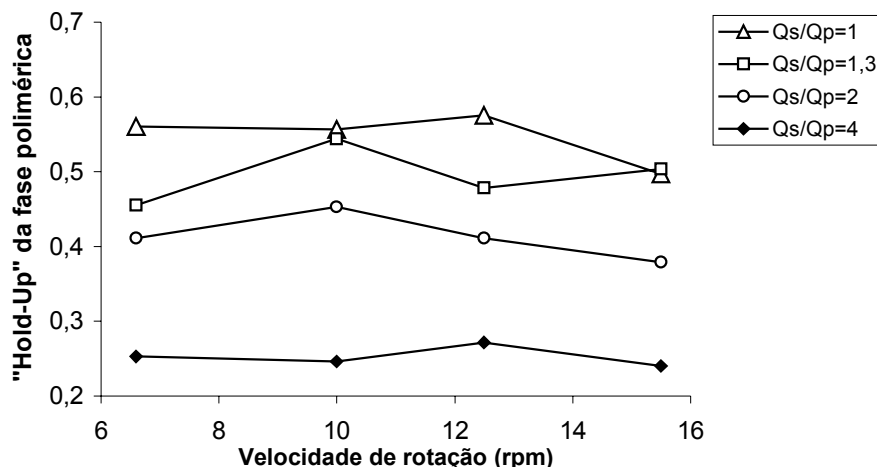


Figura 24 - Dependência do "Hold - Up" da fase polimérica com a velocidade de rotação (Qs: vazão da fase salina- fixa; Qp: vazão da fase polimérica).

Para a vazão da fase polimérica constante (80 mL/min), o "Hold-Up" da fase polimérica diminuiu com o aumento da relação de vazões, exceto quando a relação de vazões variou de 1 a 0,75, onde os valores foram muito próximos. Esse fato foi devido, provavelmente, a uma pequena diferença entre as razões de vazões e a um melhor controle do nível da interface nessas condições de operação, levando a valores de "Hold-Up" próximos. Ao elevar a vazão da fase salina na corrente de entrada do equipamento, o "Hold-Up" da fase polimérica diminuiu, em razão de um aumento do volume da fase salina no interior do extrator.

O "Hold-Up" manteve-se praticamente constante para as diferentes velocidades de rotação testadas, exceto quando a relação de vazões foi muito baixa. Um exemplo é a relação igual a 0,25 (20/80) mL/min, para a qual os valores de "Hold-Up" situaram-se entre 0,62 e 0,73, mostrando variação de 18%. Na Figura 25 é mostrado esse comportamento.

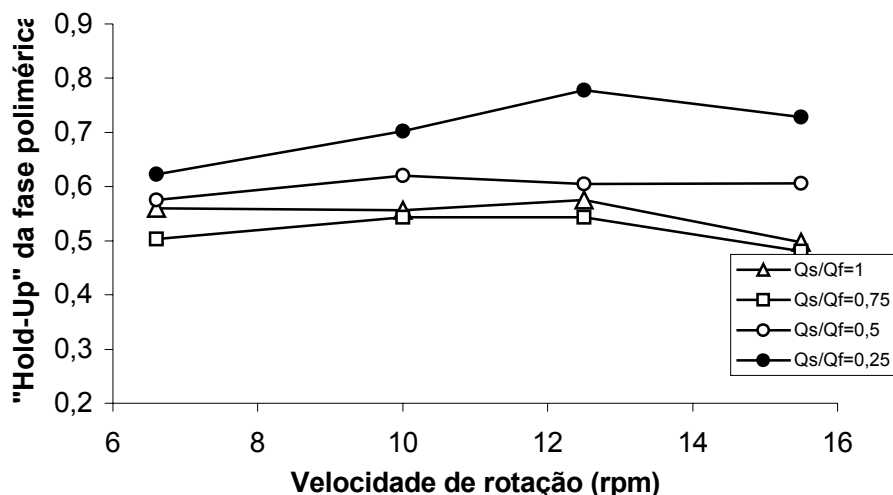


Figura 25 - Dependência do "Hold-Up" da fase polimérica com a velocidade de rotação (Qs: vazão da fase salina; Qp: vazão da fase polimérica-fixa).

Quando a soma das vazões das correntes de entrada no equipamento foi mantida constante, observou-se que a variação do "Hold-Up" da fase polimérica com a velocidade de rotação foi menos dispersa. Por exemplo, para a relação de vazões igual a 0,5, a diferença foi de 5%. Verificou-se, assim, que alterações nas velocidades de rotação não modificaram substancialmente o "Hold-Up" e que este, para diferentes relações de vazões das fases, manteve-se numa faixa estreita, exceto para as relações de vazão de 2 (80/40 mL/min) e 0,5 (40/80 mL/min). Nessas relações de vazões foi observada variação de até 58% no "Hold-Up", como mostrado na Figura 26.

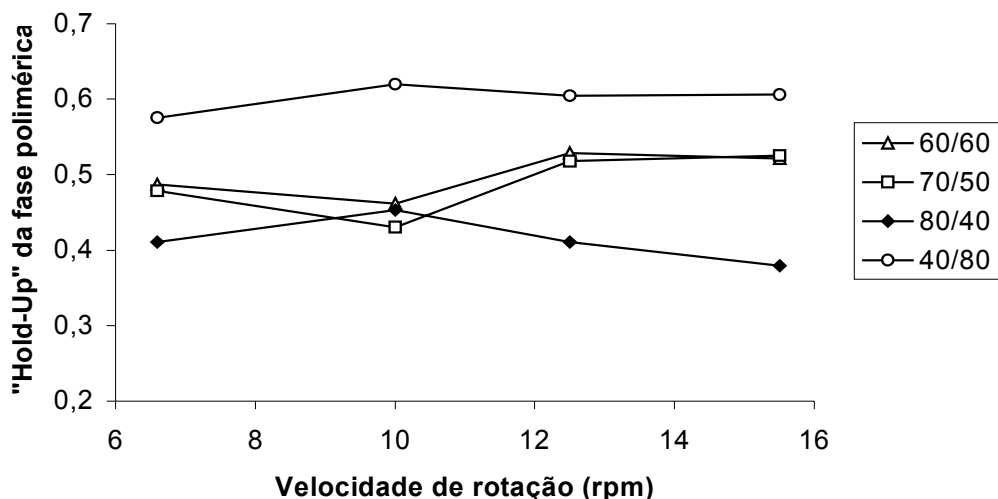


Figura 26 - Dependência do "hold - up" da fase polimérica com a velocidade de rotação. Vazão total de alimentação constante (salina + polimérica= 120 mL/min).

Para os três casos estudados, a velocidade de rotação teve pequena influência sobre o "Hold-Up". Esse comportamento pode ser atribuído ao fato de o extrator Graesser ser controlado através da fixação do nível da interface no centro do equipamento, estabelecendo assim uma pequena faixa para a variação dos valores de "Hold-Up" médios.

SHEIKH et al. (1972) descreveram o mesmo comportamento do "Hold-Up" obtido neste estudo, no que se refere à influência da velocidade de rotação, ao analisarem um extrator Graesser (75 cm de comprimento por 15 cm de diâmetro) operando com um sistema composto por água-n-butilamina-querosene. Os autores constataram também aumento do "Hold-Up" com a relação de vazões, tendência diversa da daqui apresentada. Essa alteração é explicável, pois o "Hold-Up" é um parâmetro dependente tanto do sistema extrativo e de suas propriedades físicas como do equipamento e das condições operacionais deste. Como visto anteriormente, as propriedades físicas dos SABs estudados são muito diferentes das dos sistemas tradicionais de extração, principalmente no que se refere à viscosidade e tensão interfacial. Pode-se, dessa forma, esperar diferenças entre seus comportamentos hidrodinâmicos.

Nas colunas verticais, o aumento do "Hold-Up" com a velocidade de rotação e com a relação de vazões é um efeito já observado. Por exemplo, COIMBRA et al. (1998), usando uma coluna de discos rotativos perfurados (PRDC) com SABs compostos por PEG/fosfato, observaram aumento no "Hold-Up" com a velocidade de rotação dos discos e com a relação de vazão solvente/alimentação.

Para um extrator do tipo Karr, KADER (1985) e ARAVAMUDAN e BAIRD (1999) verificaram aumento do "Hold-Up" com a elevação da velocidade de agitação para os sistemas acetona-tolueno-água, querosene-água e isopropanol-água. ARAVAMUDAN e BAIRD (1999) obtiveram maiores "Hold-Up" na ausência de transferência de massa.

Os valores de "Hold-Up" obtidos neste trabalho estão próximos dos dados de COIMBRA (1995), de 0,55 a 0,63, que usou relação de vazões entre as fases de 2, 0,83 e 0,53 e velocidades de rotação de 3, 5, 7 e 9 rpm, para o mesmo tipo de equipamento.

Dentre as diferentes vazões das fases testadas, na condição de operação de 15 rpm, a interface na zona de extração não foi observada com nitidez. Assim, o controle da interface, que deveria ser feito na região central do extrator, foi mantido somente nas regiões de separação. Essa situação levou a um maior arraste da fase polimérica pela fase salina. O arraste aumentou com a elevação da velocidade de rotação, como mostrado na Figura 27. Esse efeito foi devido, possivelmente, ao aumento do grau de turbulência da mistura, o que dificultou o controle da interface.

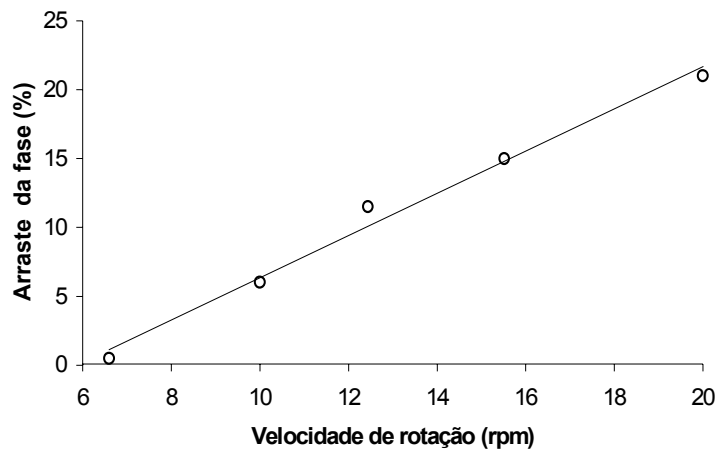


Figura 27 - Arraste da fase salina pela fase polimérica versus velocidade de rotação. Vazão da fase PEG: 80 mL/min; vazão da fase salina = 40 mL/min.

Paralelamente aos estudos de "Hold-Up", foram feitas avaliações do ponto de inundação para a velocidade de agitação de 6,6 rpm. O ponto de inundação foi atingido nas condições de operação de 80 mL/min para a fase salina e de 8 mL/min para a fase polimérica. Pode ser observado na Figura 28 que, nessas condições, ocorreu variação brusca do "Hold-Up" da fase polimérica e do arraste.

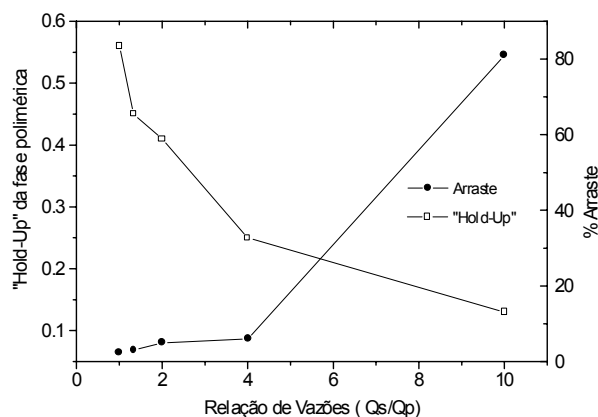


Figura 28 - "Hold-Up" vs. arraste para 6,6 rpm.

## 5. RESUMO E CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, pode-se chegar às seguintes conclusões:

- A  $\alpha$ -lactoalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina foram separadas satisfatoriamente mediante o uso de Sistemas Aquosos Bifásicos. O estudo da separação destas proteínas em SAB foi feito através do cálculo do coeficiente de partição, tendo como controle o balanço de massa das proteínas. Praticamente toda a  $\beta$ -lg permaneceu na fase salina, e a  $\alpha$ -la transferiu-se em grande parte para a fase polimérica.
- O PEG de massa molar 1.500 dáltons mostrou ser o melhor sistema a particionar as proteínas do soro de queijo. Dentre os diferentes sistemas testados, aquele composto por 18% de polietilenoglicol e 18% de fosfato de potássio foi o mais indicado.
- O aumento da massa molar do polímero aumenta a concentração de  $\alpha$ -la na fase inferior, ocasionando a diminuição do coeficiente de partição.
- A velocidade de rotação de 6,6 rpm mostrou ser uma condição de operação favorável em relação ao melhor controle da interface e aos valores de “Hold-Up” da fase polimérica, que se mantiveram restritos a uma pequena faixa de variação (0,56 - 0,62) quando a vazão da fase polimérica foi mantida fixa.

- A velocidade de rotação de 15,5 rpm não foi uma condição apropriada para operação do extrator, por causa da dificuldade de controle da interface e do aumento significativo do arraste das fases.
- Para a fase salina fixa, observou-se leve tendência de redução do “Hold-Up” com o aumento da relação de vazão entre as fases. Quando a fase polimérica foi mantida fixa, o “Hold-Up” também diminuiu com o aumento da relação da vazão entre as fases.
- Na distribuição de tempos de residência, o modelo da dispersão axial aberto foi o que melhor se ajustou aos dados experimentais, validando assim o uso dos resultados de DTR na representação da mistura axial.
- O aumento da velocidade linear das fases elevou o grau de mistura axial. O coeficiente de mistura axial mostrou dependência suave com relação ao aumento da velocidade de rotação.

## 6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

De acordo com os resultados, podem ser feitas as seguintes sugestões:

- ❖ Neste trabalho foi selecionado o SAB para separação das proteínas  $\alpha$ -lactoalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina. Foi feita também uma caracterização hidrodinâmica do extrator Graesser. Para um estudo da separação contínua das proteínas do soro de queijo como meio real, usando o extrator Graesser, é necessário complementar esta pesquisa com a análise de transferência de massa.
- ❖ Avaliar técnicas de recuperação das proteínas das fases polimérica e salina.
- ❖ Formular e avaliar um alimento infantil enriquecido com as proteínas separadas.
- ❖ Testar a separação contínua de outros biocompostos no extrator Graesser.
- ❖ Determinar o ponto de inundação do extrator para outras condições de operação.
- ❖ Avaliar a influência da adição de soro de queijo sobre o diagrama de equilíbrio para o sistema PEG 1.500 - fosfato de potássio.
- ❖ Realizar estudos de custos operacionais no processamento contínuo de separação das proteínas do soro de queijo

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTSSON, P. A . **Partition of cell and macromolecules**. New York: John Wiley, 1986. 346 p.
- ALHAMDAM, A., SASTRY, S. Residence time distribution of food and simulated particles in a holding tube. **Journal od Food Engineering**, v.34, n.2, p.271-292, 1998.
- AL-HEMIRI, A. A., KAREEM, A. Drop size distribution in a graesser contactor. **Can. J. Chem. Eng**, v.68, n.2, p.569-576, 1990.
- AL-MASHIKI, S. A., NAKAI, S. Reduction of  $\beta$ -lactoglobulin content of cheese whey by polyphosphate precipitation. **Journal Food Science**, v.52, n.5, p.1237-1240, 1987.
- ANUALPEC. São Paulo: FNP Consultoria & Comercio, 1999. 571p.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY (AOAC). **Método 31002**. 11 ed. Washington, DC: 1970.
- ARAVAMUDAN, K., BAIRD, M. H. I. Effects of mass transfer on the hydrodynamic behavior of a karr reciprocating plate column. **Ind. Eng. Chem. Res**, v. 38, n.2, p.1596-1604, 1999.
- ASENJO, J. A. **Separation process in biotechnology**. New York: Marcell Dekker, 1990. 287p.
- BAMBERGER, S., BROOKS, D., SHARP, K., VAN ALSTINE, J., WEBBER, T. Preparation of phase systems and measurement of their physicochemical properties. In: WALTER, H., BROOKS D. AND FISCHER, D. (EDS). **Partitioning in aqueous two-phase systems: theory, methods, uses and applications to biotechnology**, New York: Academic Press, p.85-130, 1985.

- BEM-HASSAN, R. M., GHALY, A. E. Continuous propagation of *kluveromyces fragilis* in cheese whey for pollution potential reduction. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.47, p.89-105, 1994.
- BOLAND, M. J., HESSELINK, P. G., PAPAMICHAEL, N., HUSTTED, H. Extractive purification of enzymes from animal using aqueous two-phase systems. **Journal of Biotechnology**, v.19, n.1, p.19-24, 1991.
- BRAMAUD, C., AIMAR, P., DAVEEE, G. Whey protein fractionation: Isoelectric precipitation of  $\alpha$ -lactalbumin under gentle heat treatment. **Biotechnology and Bioengineering**, v.56, n.3, p.391-397, 1997.
- CAYOT, P., LORIENT. Structure-function relationships of whey proteins. In: SRIMIVASN, D., PARAF, A. **Food proteins and their applications**, New Jersey: Marcel Dekker, p. 225-230, 1997.
- CEREDA, M. P., FLORS, A., VALLES, S. Tratamiento anaerobio en dos fases de suspensiones amiláceos. **Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos**, v.26, p.101-108, 1986.
- CHANDARANA, D. I., UNVERFERTH, I. A. Residence time distribution of food at aseptic processing temperatures. **Journal of Food Engineering**, v.28, p.349-360, 1996.
- CHEN, J. P. Partitioning and separation of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin in peg/potassium phosphate two phase systems. **Journal Fer. Bioenging**, v. 73, n.2, p.140-147, 1992.
- CHEN, J., MA, G. X., LI, D. Q. HPCPC separation of proteins using polyethylene glycol-potassium phosphate aqueous two phase. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 29, n.1, p.371-383, 1999.
- COIMBRA, J. R., TÖMMES, J., KULA, M. R., Continuous separation of whey proteins with aqueous two-phase systems in a graesser contactor. **Journal of Chromatography A**, v.668, n.1, p. 85-94, 1994.
- COIMBRA, J. S. R. **Desempenho de um extrator tipo graesser na separação de proteínas do soro de queijo usando sistemas aquosos bifásicos**. Campinas, SP: UNICAMP, 1995. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, 1995.
- COIMBRA, J. S. R., MOJOLA, F., MEIRELLES, A. J. A. Dispersed phase hold-up in a perforated rotating disc contactor (PRDC) using aqueous two-phase systems. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, v. 31, n.2, p.277-280. 1998.
- COLEBY, J. Apparatus for countercurrent treatment of immiscible fluids. **United States patent**, Nr. 3.017, 253, 1962
- COULSON, J. M., RICHARDSON, J. F., BACKHURST, J. R., HARKER, J. H. **Chemical engineering - particle technology and separation processes**. 4<sup>th</sup> ed. Ver. Oxford: Butterworth Heinemann, 1996. v.2.

- CUSACK, R. W., FREMAUX, P., GLATZ, D. A fresh look at liquid-liquid extraction. **Chem. Eng**, v.98, n.2, p.66-76, 1991.
- DE NARDI, I. R., ZAIAT, M., FORESTI. Influence of the tracer characteristics on hydrodynamic models of packed-bed bioreactors. **Bioprocess Engineering**, v. 21, n.4, p.469-476, 1999.
- DE WITH, J. N. Nutritional and Functional characteristics of whey proteins in food products. **Journal Dairy Science**, v.81, n.6, p.597-609, 1998.
- DZIEZAK, J. D. Phosphates improve many Foods. **Food Technology**, v.1, p.80-92, 1990.
- FERRAT, A. Como valorizar o subproduto das fábricas de queijos, o "Lacto Soro". **Boletim do leite**, v.618, p.32-38, 1980.
- FRIEDMAN, M. **Protein nutritional quality of foods and feeds**. New Jersey: Marcel Decker, 1975. 674p.
- GHALEHCHIAM, J. S, SLATER, M. J. A possible approach to improving rotating disc contactor design accounting for drop breakage and mass transfer with contamination. **Chemical Engineering Journal**, v.75, n.1, p.131-144, 1999.
- GODFREY, J. C. SLATER, M. J. **Liquid-liquid Extraction Equipment**. Bradford, U.K: John Wiley & Sons, 1994. 772p.
- GRASSELLI, M., NAVARRO, A., FERNANDEZ, H. L., MIRANDA, M. V., CAMPERI, I., OSVALDO CASCONI. Que hacer com el suero de queso. **Ciencia Hoy**, v.43, n.1, p.27-35, 1997.
- GUAN, Y., WU, X. Y., TREFFRY, T. E., LILLEY, T. H. Studies on the isolation of penicillin acylase from escherichia coli by aqueous two-phase partitioning. **Biotechnology and Bioengineering**, v.40, n.5, p.517-524, 1992.
- HALL, G, M., IGLESIA, O. Functional properties of dried milk whey. **Food Science and Technology International** , v.3, n.3, p.381-383, 1997.
- HARRIS, J. M. **Poly(ethyleneGlycol)chemistry-biotechnical and biomedical applications**. New York: Plenum Press, 1992. 385p.
- HUSTED, H., KRONER, K. H., MENGE, U., 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, n.6, p.1989-2005, 1978.
- HUSTED, H., KRONER, K. H., MENGE, U., KULA, M.R. Partition in aqueous two-phase systems, **Trends Biotech**, v.3, n.2, p.139-144, 1985.

- KADER, B. A. **Hydrodynamics and mass transfer in a reciprocating plate extraction column**. Zurich: Swiss Federal Institute of Technology , Zurich. 1985. 112p. These (PhD) Swiss Federal Institute of Technology , Zurich. 1985.
- KORCHINSKY, W. J. Rotating disc contactors. In: GODFREY, J. C., SLATER M. J. **Liquid-liquid extraction equipment**. Bradford U.K: John Wiley & Sons, 1994. p.97-11.
- KRONER, K. H., HUSTED, H., KULA, M. R. Evaluation of crude dextrana as phase forming polymer for the extraction of enzymes in aqueous two-phase systems in large scale. **Biotechnology and Bioengineering**, v.24, n.5, p.1015-1045, 1994.
- KULA, M. R., KRONER, K. H., HUSTED, H. Purification of enzymes by liquid-liquid extraction. **Adv. Biochem. Engn**, v. 24, p.73-118, 1982.
- KUMAR, A ., HARTLAND, S. Unified correlation for the prediction of disperse-phase hold-up in liquid-extraction columns. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.34, n.11, p.3925-3940. 1995.
- LEHNINGER, A. L. **Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blucher. 1976. p.126-145
- LEVENSPIEL, O. **Chemical Reaction Engineering**, New York: Wiley, 1992.
- LI, M., ZHU, Q. Z., MEI. Partitioning of amino acids by aqueous two-phase systems combined with temperature-induced phase formation. **Biotechnology Progress**, v.13, n.1, p.105-108,1997.
- MACHADO, F. L. C. **Equilíbrio de fases para sistemas aquosos bifásicos (SAB) compostos por polietilenoglicol - maltodextrina - água**. Viçosa: UFV, 1999. 87p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)- Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- MEHRA, R. K., DONNELLY, W. Fractionation of whey protein components through a large pore size hydrophilic, cellulosic membrane. **J. Dairy Res.** v.60, n.1, p. 89-97, 1993.
- MISEK, T. General hydrodynamic design basic for columns. In: **Liquid-liquid extraction equipment**. Bradford U.K: John Wiley & Sons Ltd, 1994. 772p.
- MORR, C., HA, E. W. Whey protein concentrates and isolates processing and functional properties critical reviews. **Food Science and Nutrition**, v.33, n.6, p.431-476, 1993.
- NAUMAM. B, E ., BUFFMAN. B, A. **Mixing in continuous flow systems**. New York: Wiley & Sons, 1983. 177p.
- PALMIERI, L., CACACE, D., DIPOLLINA, G., DALL' AGLIO, G. Residence time distribution of food suspensions containing large particles when flowing in tubular systems. **Journal of Food Engineering**, v.17, n.2, p. 225-239, 1992.

- PAPAMICHAEL, N., BOERNER, B., HUSTED, H. Continuous aqueous phase extraction of proteins: automated processing and recycling of process chemicals. **J. Chem. Tech. Biotechnol**, v. 54, n.1, p. 47-55, 1992.
- PEARCE, J. R. Analysis of whey proteins by high performance liquid chromatography. **The Australian Journal of Dairy technology**, v3, p. 114-117, 1983.
- PLASSARI, E., THERESA, J., LECLERC, J .P., VILLERMAUX, J. Tracer experiments and residence time distributions in the analysis of industrial units: case studies. **Radiation and isotopes applications**, v. 44, n.1, p. 39-58, 1999.
- PRINCEN, H. M., ZIA, I. Y. Z., MASON, S. G. Measurement of interfacial tension from the shape of rotating drop, **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 23, p. 99-107, 1967.
- RENNER, E. **Micronutrients in milk and milk-based food products**. England: Elsevier Science, 1989. 311p.
- ROGERS, R. D. **Utilization of polyethylene glycol in industrial and environmentally important separation**. Tuscaloosa. Department of Chemistry, the University of Alabama, 1999. 23p.
- SADANA, A., BEELARAM, A. M. Efficiency and economics of bioseparation: some case studies. **Bioseparation**, v.4, p.221-235,1994.
- SALENGKE, S., SASTRY, S. K. Residence time distribution of cylindrical particles in a curved section of a holding tube: the effect of particle size and flow rate. **Journal of Food Process Engineering**, v.18, p.363-381, 1995.
- SANCHO, M. F., RAO, M. A. Residence time distribution in a holding tube. **Journal od Food Engineering**, v.15, n.1, p. 1-19, 1992.
- SAS. Institute INC.**SAS/estatic user guide, version 6**, 4<sup>th</sup> ed., Querry, NC: 1989. v. 2, 846p.
- SCHMIDT, A. S., VENTON, A. M., ASENJO, J. A . Partitioning and purification of  $\alpha$ -amylase in aqueous two-phase systems. **Enzyme and Microbial Technology**, v.16, p.131-142, 1994.
- SHEIKH, A. R., INGHAM, J., HANSON, C. Axial mixing in a graesser raining bucket liquid-liquid contactor. **Trans. I. Chem. Engng**, v.50, p.199-207, 1972.
- SILVA, L. H. M. **Equilíbrio de fases em sistemas aquosos bifásicos: polímero/polímero e polímero/sal**. Campinas, SP: UNICAMP, 1995. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, 2000.

- SINGH, B., RIZVI, S. S. H. Residence time distribution (RTD) and goodness of mixing during CO<sub>2</sub>- injection in twin-screw extrusion parte I : RTD studies. **Journal od Food Process Engineering**, v.21, n.2, p.91-110, 1998.
- SINHA, R., SINGH, S. P., AHMED, S., GARG, S. K. Partitioning of *Bacillus alkaline* protease in aqueous two-phase systems. **Bioresource Technology**, v.55, p.163-166,1996.
- STEINER, L., KUMAR, A and HARTLAND, S. Determination and correlation of axial mixing parameters in agitated liquid-liquid extraction column, **Can. J. Chem. Enging**, v. 66, p. 241-247, 1988.
- SUBRAMANIAM, G. **Bioseparation and Bioprocessing**. New York:. Subramaniam, 1998. v.2, 474p.
- TJERNELD, F., JOHANSON, G., JOELSSON, M. Lactate dehydrogenase on large-scale. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, p. 809-816, 1987.
- TJERNELD, F., JOHANSON, G. Aqueous two-phase systems for biotechnical use. **Bioseparation**, v.1, p. 225-263, 1990
- TJERNELD, FOLKE., Aqueous two-phase partitioning on an industrial scale. In: Harris, J. **Poly(ethyleneglycol)chemistry: biotechnical and biomedical applications**. Plenium Press, 1992.
- TORRES, A. P., OLIVEIRA, F. A . R. Residence time distribution studies in continuous thermal processing of liquid foods: a Review. **Journal of Food Engineering**, v.36, n.1, p.1-30, 1998.
- TORRES, A. P., OLIVEIRA, F. A. R., FORTUNA, S. P. Residence time distribution of liquids in a continuous tubular thermal processing system parte I: relating RTD to processing conditions. **Journal of Food Engineering**, v.35, p.147-163, 1998.
- TOSI, E., CAZOOLY., CATALANO, O . Uso de la harina de triticales y suero de leche ultrafiltrado em polvo para la fabricación de pastas frescal. **Alimentaria**, v.39, p.39-41,1997.
- TREYBAL, R.E. **Extracción en fase liquida**. Mexico: UTEHA, 1968. 729 p.
- TSOURIS, C., FERREIRA, R., TAVLARIDES, L. L. Characterization of hydrodynamic parameters in a multistage column contactor. **Can. J. Chem. Enging**, v.69, p.913-923. 1990.
- VEIDE, A ., SMEDS, A, L., ENFORS, S. A process for large scale isolation of  $\beta$ -galactosidase from E.coli in aqueous two-phase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v.25, p.1789-1800, 1983.
- VONNEGUT, B. Rotating bubble method for the determination of surface and interfacial tensions, **Rev. Sci. Instrum**, v.13, p. 6-9, 1942.

WANG, P. M. S., INGHAM, J., HANSON, C. Further studies on the performance of a graesser raining bucket liquid/liquid contactor. **Trans. I. Chem. Eng**, v. 55, p 196-201, 1977.

YOSHIDA, S. Isolation of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactoglobulin by gel filtration using sephacryl s-200 and purification by diethylaminoethyl ion - exchange chromatography. **J. Dairy sci**, v.73, p.2292-2298, 1990.

ZASLAVSKY, B. Y., Bioanalytical applications of partitioning in aqueous polymer two-phase systems. **Analytical Chem**, v.15, p.765-773, 1992.

ZASLAVSKY, B. Y. **Aqueous two phase partitioning**. New York: Marcel Dekker, 1995. 696p.