

PAULO SÉRGIO MONTEIRO

PARTIÇÃO DE α -LACTOALBUMINA E β -LACTOGLOBULINA POR
EXTRAÇÃO NO PONTO DE NÉVOA EM SISTEMAS BIFÁSICOS CONTENDO
COPOLÍMEROS TRIBLOCOS

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
2005

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

M775p
2005

Monteiro, Paulo Sérgio, 1974-

Partição de α -lactoalbumina e β -lactoglobulina
extração no ponto de névoa em sistemas bifásicos
contendo copolímeros triblocos / Paulo Sérgio Monteiro.
– Viçosa : UFV, 2005.
xii, 71f. : il. ; 29cm.

Orientador: Jane Sélia dos Reis Coimbra.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Proteínas de soro de leite. 2. Partição de fases.
3. α -lactoalbumina. 4. β -lactoglobulina.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 660.2842

PAULO SÉRGIO MONTEIRO

PARTIÇÃO DE α -LACTOALBUMINA E β -LACTOGLOBULINA POR
EXTRAÇÃO NO PONTO DE NÉVOA EM SISTEMAS BIFÁSICOS CONTENDO
COPOLÍMEROS TRIBLOCOS

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*

APROVADA: 31 de outubro de 2005

Prof. Luis Antônio Minim
(Conselheiro)

Prof. Juraci Alves de Oliveira
(Conselheiro)

Prof. Abram Damian Giraldo Zuñiga

Dr. Edwin Elard Garcia Rojas

Profª Jane Sélia dos Reis Coimbra
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade concedida.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro, sem o qual este trabalho não seria possível.

À professora Jane Sélia dos Reis Coimbra, pela orientação, pelo incentivo e confiança, pela amizade e paciência demonstrada ao longo do trabalho.

Aos professores Juraci Alves de Oliveira, Luís Antônio Minim e Luiz Henrique Mendes da Silva, pela ajuda, pelos conselhos, pelos questionamentos e pela amizade.

À minha família, pela confiança, pelo incentivo e pelo incondicional apoio.

À Jildete e ao Luís Vítor, pelo apoio, pela compreensão e pelo carinho.

Aos amigos Edwin e Tarliane, pela amizade, pela paciência, pela disposição em ajudar em todos os momentos e pelo encorajamento nas horas difíceis.

À Regina, ao Oscar, ao Marcelo e aos demais amigos do Laboratório de Processos de Separação, pela amizade, pela cooperação, pelo incentivo e pelo ótimo convívio.

Às amigas Paula, Juliana, Cassinha, Arabi, Gislene e Aline, pela amizade, pela convivência e pela ajuda.

À Geralda, ao Fernando e aos demais funcionários do departamento de Tecnologia de Alimentos, pela colaboração e paciência.

A todos os meus amigos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e não foram aqui citados, meus sinceros agradecimentos.

BIOGRAFIA

Paulo Sérgio Monteiro, filho de João Monteiro e Laudelina Cabral Monteiro, nasceu em 15 de abril de 1974, em Viçosa – MG. Formou-se em Tecnologia de Laticínios em agosto de 1999 e em julho de 2003 ingressou no curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, em nível de mestrado, concluindo-o em outubro de 2005.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	2
CAPÍTULO 1	
PROPRIEDADES DOS SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS E DAS PROTEÍNAS DO SORO DE QUEIJO.....	3
1. Tipos de Sistemas Aquosos Bifásicos.....	4
2. Diagrama de Equilíbrio.....	12
3. Coeficiente de Partição.....	13
4. Proteínas do Soro.....	16
5. Referências Bibliográficas.....	20
CAPÍTULO 2	
PARTIÇÃO DE α-LACTOALBUMINA E β-LACTOGLOBULINA POR EXTRAÇÃO NO PONTO DE NÉVOA.....	27
1. Introdução.....	28
2. Material e Métodos.....	30
2.1 Preparo dos Sistemas de Fases.....	30
2.2 Determinação das Temperaturas do Ponto de Névoa.....	31
2.3 Coeficiente de Partição das Proteínas.....	32
2.4 Quantificação de α -Lactoalbumina e β -Lactoglobulina nas Fases.....	33
3. Resultados e Discussão.....	35
3.1 Determinação do Ponto de Névoa.....	35
3.1.1 Influência da Concentração de Copolímero na Temperatura do Ponto de Névoa.....	35
3.1.2 Influência da Concentração de Sais na Temperatura do Ponto de Névoa.....	40
3.1.3 Influência do Conteúdo de EO na Temperatura do Ponto de Névoa.....	48

3.2 Partição de α -Lactoalbumina e β -Lactoglobulina.....	49
3.3 Seleção e Caracterização dos Sistemas.....	54
4. Conclusões.....	65
5. Sugestões para Trabalhos Futuros.....	66
6. Referências Bibliográficas.....	67

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 – Sistemas aquosos bifásicos típicos.....	6
Tabela 2 – Concentração média das proteínas no soro de queijo <i>in natura</i>	16
Tabela 3 – Funções biológicas das proteínas do soro de queijo.....	17

CAPÍTULO 2

Tabela 1 – Gradiente utilizado nas análises cromatográficas por HPLC-RP.....	33
Tabela 2 – Percentual de proteínas na fase superior (FS) dos sistemas constituídos de 30% (p/p) de copolímero L 31 e solução de sais de fosfato de potássio 45 mM em pH 7, a 17 °C, e de 20% (p/p) de copolímero PE 61 e solução de sais de fosfato de potássio 100 mM em pH 7, a 20 °C.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 – Representação estrutural dos copolímeros triblocos.....	8
Figura 2 – Ilustração esquemática de um sistema reversível monômero-micela em equilíbrio termodinâmico.....	9
Figura 3 – Representação visual da formação da “névoa”, com aquecimento a uma temperatura acima da temperatura do ponto de névoa.....	10
Figura 4 - Diagrama de fases para um sistema PEG 4000/fosfato de potássio, a 20 °C.....	13

CAPÍTULO 2

Figura 1 – Influência das concentrações dos copolímeros L 31(i) e PE 61(?) na determinação da temperatura do ponto de névoa, em meio com sais de fosfato de potássio 15 mM em pH 7.....	36
Figura 2 – Influência das concentrações dos copolímeros L 31 (i) e PE 61 (?) na determinação da temperatura do ponto de névoa, em meio com sais de fosfato de potássio 45 mM em pH 7.....	37
Figura 3 – Influência das concentrações dos copolímeros L 31 (i) e PE 61 (?) na determinação da temperatura do ponto de névoa, em meio com sais de fosfato de potássio 100 mM em pH 7.....	37
Figura 4 – Influência das concentrações dos copolímeros L 35 (?) e L (i) na determinação da temperatura do ponto de névoa, em meio com sais de fosfato de potássio 15 mM em pH 7.....	39
Figura 5 – Influência das concentrações dos copolímeros L 35 (?) e L (i) na determinação da temperatura do ponto de névoa, em meio com sais de fosfato de potássio 45 mM em pH 7.....	39
Figura 6 – Influência das concentrações dos copolímeros L 35 (?) e L (i) na determinação da temperatura do ponto de névoa, em meio com sais de fosfato de potássio 100 mM em pH 7.....	40
Figura 7 – Influência das concentrações de sais de fosfato de potássio na determinação da temperatura do ponto de névoa para os copolímeros L 31 (?) e PE 61 (i), em meio com 5% (p/p) de copolímero, em pH 7.....	42

Figura 8 – Influência das concentrações de sais de fosfato de potássio na determinação da temperatura do ponto de névoa para os copolímeros L 31 (?) e PE 61 (i), em meio com 10% (p/p) de copolímero, em pH 7.....	42
Figura 9 – Influência das concentrações de sais de fosfato de potássio na determinação da temperatura do ponto de névoa para os copolímeros L 31 (?) e PE 61 (i), em meio com 15% (p/p) de copolímero, em pH 7.....	43
Figura 10 – Influência das concentrações de sais de fosfato de potássio na determinação da temperatura do ponto de névoa para os copolímeros L 31 (?) e PE 61 (i), em meio com 20% (p/p) de copolímero, em pH 7.....	43
Figura 11 – Influência das concentrações de sais de fosfato de potássio na determinação da temperatura do ponto de névoa para os copolímeros L 31 (?) e PE 61 (i), em meio com 25% (p/p) de copolímero, em pH 7.....	44
Figura 12 – Influência das concentrações de sais de fosfato de potássio na determinação da temperatura do ponto de névoa para os copolímeros L 31 (?) e PE 61 (i), em meio com 30% (p/p) de copolímero, em pH 7.....	44
Figura 13 – Influência das concentrações de sais de fosfato de potássio na determinação da temperatura do ponto de névoa para os copolímeros L 35 (?) e L (i), em meio com 5% (p/p) de copolímero, em pH 7.....	45
Figura 14 – Influência das concentrações de sais de fosfato de potássio na determinação da temperatura do ponto de névoa para os copolímeros L 35 (?) e L (i), em meio com 10% (p/p) de copolímero, em pH 7.....	45
Figura 15 – Influência das concentrações de sais de fosfato de potássio na determinação da temperatura do ponto de névoa para os copolímeros L 35 (?) e L (i), em meio com 15% (p/p) de copolímero, em pH 7.....	46
Figura 16 – Influência das concentrações de sais de fosfato de potássio na determinação da temperatura do ponto de névoa para os copolímeros L 35 (?) e L (i), em meio com 20% (p/p) de copolímero, em pH 7.....	46
Figura 17 – Influência das concentrações de sais de fosfato de potássio na determinação da temperatura do ponto de névoa para os copolímeros L 35 (?) e L (i), em meio com 25% (p/p) de copolímero, em pH 7.....	47
Figura 18 – Influência das concentrações de sais de fosfato de potássio na determinação da temperatura do ponto de névoa para os copolímeros L 35 (?) e L (i), em meio com 30% (p/p) de copolímero, em pH 7.....	47

Figura 19 – Influência da concentração de EO na determinação da temperatura do ponto de névoa para os copolímeros L 31 (i) e L 35 (?) em meio com sais de fosfato de potássio 100 mM em pH 7.....	49
Figura 20 – Cromatograma da solução de isolado protéico de soro.....	50
Figura 21 – Cromatograma para α -la padrão.....	51
Figura 22 – Cromatograma para β -lg padrão.....	51
Figura 23 – Curva analítica para α -la.....	52
Figura 24 – Curva analítica para β -lg.....	52
Figura 25 – Cromatograma da fase inferior de um SAB formado com 25% (p/p) de copolímero L 31, solução de WPI a 20 mg/mL e solução de sais de fosfato de potássio 45 mM em pH 7.....	53
Figura 26 – Cromatograma da fase superior de um SAB formado com 10 % (p/p) de copolímero PE 61, 1 g de solução de WPI a 20 mg/mL e solução de sais de fosfato de potássio 15 mM em pH 7.....	53
Figura 27 - Percentual de proteínas na fase superior dos sistemas constituídos de 30% (p/p) de copolímero L 31 e solução de sais de fosfato 45 mM em pH 7, a 17 °C, e de 20% (p/p) de copolímero PE 61 e solução de sais de fosfato 100 mM em pH 7, a 20 °C.....	56
Figura 28 - Cromatograma da fase superior de um sistema formado por 30% (p/p) de copolímero L 31 e solução de sais de fosfato de potássio 45 mM em pH 7, a 17 °C.....	56
Figura 29 – Cromatograma da fase superior de um sistema formado por 20% (p/p) de copolímero PE 61 e solução de sais de fosfato de potássio 100 mM em pH 7, a 20 °C.....	57
Figura 30 – Cromatograma da fase superior de um sistema formado a partir de WPI, 5% (p/p) de copolímero PE 61 e solução de sais de fosfato de potássio 15 mM em pH 7.....	58
Figura 31 – Cromatograma da fase superior de um sistema formado a partir de WPI, 10% (p/p) de copolímero PE 61 e solução de sais de fosfato de potássio 15 mM em pH 7.....	59
Figura 32 – Cromatograma da fase superior de um sistema formado a partir de WPI, 15% (p/p) de copolímero PE 61 e solução de sais de fosfato de potássio 15 mM em pH 7.....	59

Figura 33 – Cromatograma da fase superior de um sistema formado a partir de WPI, 20% (p/p) de copolímero PE 61 e solução de sais de fosfato de potássio 15 mM em pH 7.....	60
Figura 34 – Cromatograma da fase superior de um sistema formado a partir de WPI, 25% (p/p) de copolímero PE 61 e solução de sais de fosfato de potássio 15 mM em pH 7.....	60
Figura 35 – Cromatograma da fase superior de um sistema formado a partir de WPI, 30% (p/p) de copolímero PE 61 e solução de sais de fosfato de potássio 15 mM em pH 7.....	61
Figura 36 – Cromatograma da fase superior de um sistema formado a partir de α -la padrão, 5% (p/p) de copolímero PE 61 e solução de sais de fosfato de potássio 15 mM em pH 7.....	61
Figura 37 – Cromatograma da fase superior de um sistema formado a partir de α -la padrão, 10% (p/p) de copolímero PE 61 e solução de sais de fosfato de potássio 15 mM em pH 7.....	62
Figura 38 – Cromatograma da fase superior de um sistema formado a partir de α -la padrão, 15% (p/p) de copolímero PE 61 e solução de sais de fosfato de potássio 15 mM em pH 7.....	62
Figura 39 – Cromatograma da fase superior de um sistema formado a partir de α -la padrão, 20% (p/p) de copolímero PE 61 e solução de sais de fosfato de potássio 15 mM em pH 7.....	63
Figura 40 – Cromatograma da fase superior de um sistema formado a partir de α -la padrão, 25% (p/p) de copolímero PE 61 e solução de sais de fosfato de potássio 15 mM em pH 7.....	63
Figura 41 – Cromatograma da fase superior de um sistema formado a partir de α -la padrão, 30% (p/p) de copolímero PE 61 e solução de sais de fosfato de potássio 15 mM em pH 7.....	64

RESUMO

MONTEIRO, Paulo Sérgio, M.S., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2005. **Partição de α -lactoalbumina e β -lactoglobulina por extração no ponto de névoa em sistemas bifásicos contendo copolímeros triblocos.** Orientadora: Jane Sélia dos Reis Coimbra. Conselheiros: Luis Antônio Minim, Juraci Alves de Oliveira e Luís Henrique Mendes da Silva.

Neste trabalho foi estudada a partição das proteínas do soro de queijo α -lactoalbumina (α -la) e β -lactoglobulina (β -lg) usando sistemas aquosos bifásicos (SAB) pela técnica de extração no ponto de névoa. O ponto de névoa de uma solução copolimérica pode ser afetado por vários fatores, como, adição de sal, massa molar do copolímero, proporção entre óxido de etileno (EO) e óxido de propileno (PO) ou pela concentração de copolímero. Os sistemas foram compostos por copolímero tribloco EO-PO-EO L 31 (Aldrich, Alemanha) e sais de fosfato de potássio e por copolímero tribloco EO-PO-EO PE 61 (Oxiten, Brasil) e sais de fosfato de potássio. As temperaturas do ponto de névoa foram determinadas para os sistemas em diferentes condições de concentrações de copolímero e de sal. A seleção do SAB que proporcionou a melhor separação entre as proteínas estudadas foi determinada avaliando-se o coeficiente de partição das proteínas (k), partindo dos dados de concentração protéica nas fases pela técnica de cromatografia líquida de alto desempenho. Os sistemas com melhor índice de separação de proteínas foram compostos por: i) 30% (p/p) de copolímero L 31, solução de sais de fosfato de potássio 45 mM em pH 7 e 1 g de solução de isolado protéico de soro (WPI) na concentração de 20 mg de WPI/mL de solução, e ii) 20% (p/p) de copolímero PE 61, solução de sais de fosfato de potássio 100 mM em pH 7 e 1 g de solução de WPI na concentração de 20 mg de WPI/mL de solução. Os dados de partição revelaram para os sistemas avaliados, que a α -la permaneceu preferencialmente na fase aquosa, e que a β -lg transferiu-se parcialmente para a fase copolimérica, proporcionando a separação entre as duas proteínas.

ABSTRACT

MONTEIRO, Paulo Sérgio, M.S., Universidade Federal de Viçosa, October of 2005. **Partitioning of α -lactoalbumin and β -lactoglobulin through cloud point extraction in aqueous two phase systems containing triblock copolymers.** Adviser: Jane Sélia dos Reis Coimbra. Committee members: Luis Antônio Minim, Juraci Alves de Oliveira and Luís Henrique Mendes da Silva.

This work focuses on the partitioning study of cheese whey proteins α -lactoalbumin (α -la) and β -lactoglobulin (β -lg) using aqueous two phase systems (ATPS) by the cloud point extraction technique. The cloud point of a copolymeric solution can be affected by several factors, such as salt addition, copolymer molar mass, ratio of ethylene oxide (EO) and propylene oxide (PO) or copolymer concentration. The systems used were formed by EO-PO-EO L 31 triblock copolymer (Aldrich, Germany) and potassium phosphate salts, and EO-PO-EO PE 61 triblock copolymer (Oxitenó, Brazil) and potassium phosphate salts. The cloud point temperatures were determined for the systems at different conditions of copolymer and salt concentrations. The ATPS selection for the best separation between the studied proteins was determined evaluating the proteins partition coefficient (k), from data of proteins concentration in both phases using high performance liquid chromatography. The systems with better index of protein separation were composed by: i) 30% (mass) L 31 copolymer, 45 mM potassium phosphate salts solution at pH 7, and 1 g of whey protein isolate (WPI) solution at the concentration of 20 mg WPI/mL solution, and ii) 20% (mass) PE 61 copolymer, 100 mM potassium phosphate salts solution at pH 7, and 1 g of WPI solution at the concentration of 20 mg WPI/mL solution. The partition data revealed for the evaluated systems, that the α -la remained preferably in the aqueous phase, and β -lg was partially transferred to the copolymeric phase, providing the separation between the two proteins.

INTRODUÇÃO

O soro é um subproduto da fabricação de queijo e de caseína contendo, aproximadamente, 63 g/L de sólidos, dos quais 50 g/L são lactose e 6 g/L são proteínas. No Brasil, parte do soro produzido pelas indústrias de laticínios é ainda descartada diretamente nos rios, causando graves problemas de poluição, uma vez que contém elevado teor de matéria orgânica. Poucas são as indústrias que dispõem de estações de tratamento de resíduos para este fim ou de estrutura para reutilização de todo o volume de soro gerado em sua própria planta industrial.

No mundo são produzidos cerca de 130 milhões de toneladas de soro de queijo por ano (ANUALPEC, 2005), o que equivale a uma produção de cerca de 780.000 toneladas de proteínas. As proteínas do soro são consideradas proteínas completas, pelo fato de conterem todos os aminoácidos essenciais, os quais são vitais para o metabolismo humano. Elas têm alto valor comercial e possuem ampla faixa de atributos funcionais para aplicações nutricionais e biológicas. Adicionalmente, atuam como ingredientes alimentares e outras aplicações como agentes espumantes, emulsificantes e capacidade para substituir outros compostos mais dispendiosos como, por exemplo, a ovoalbumina nos produtos cárneos, de panificação e na fortificação de cereais.

Em função de diferenças nas suas propriedades funcionais e nutricionais tem surgido um crescente interesse na separação e fracionamento das proteínas do soro.

As proteínas α -lactoalbumina (α -la) e a β -lactoglobulina (β -lg) representam, aproximadamente, 70% do total das proteínas do soro e são responsáveis pelas propriedades hidratantes, gelificantes, emulsificantes e espumantes dos ingredientes de proteínas do soro.

Dentro desse contexto de grande potencial de aplicação, torna-se importante o desenvolvimento de processos de separação e de purificação das proteínas do soro de queijo em grande escala e que também sejam economicamente viáveis.

Dentre os diversos processos descritos na literatura, os sistemas aquosos bifásicos adequam-se à separação e à purificação de proteínas devido

ao elevado conteúdo de água dos sistemas, tornando-se um meio propício para a manutenção das características das mesmas.

Assim, neste trabalho, foi avaliado o emprego de uma variante da extração líquido-líquido com sistemas aquosos bifásicos, ou seja, a extração no ponto de névoa, na partição das proteínas α -la e β -lg.

O uso da extração no ponto de névoa justifica-se devido ao alto conteúdo de água dos sistemas, às baixas temperaturas durante o processo, o curto tempo de separação e a possibilidade de recuperação e reutilização do copolímero utilizado, o que representa uma redução significativa dos custos operacionais do processo.

OBJETIVOS

- Determinar as temperaturas de ponto de névoa para os diferentes copolímeros testados em diversas condições de concentração de copolímeros e de sais.
- Avaliar a partição da α -la e da β -lg nos sistemas formados por copolímeros triblocos e sais;

CAPÍTULO 1

PROPRIEDADES DOS SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS E DAS PROTEÍNAS DO SORO DE QUEIJO

1. TIPOS DE SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS

A extração líquido-líquido convencional, na qual se utiliza soluções aquosas e solventes orgânicos, não é adequada para separar componentes de origem biológica, como proteínas e células, devido à instabilidade destes em solventes orgânicos. Uma variante da extração líquido-líquido convencional é a partição em sistemas aquosos bifásicos (SAB), a qual vem sendo utilizada com sucesso no isolamento de proteínas e de outros componentes.

As fases da maioria dos SAB são formadas por 70 a 90% de água, favorecendo a estabilidade de biomoléculas durante a separação, o que não ocorre com os sistemas tradicionais, compostos por solventes orgânicos (HUSTED et al, 1985). Além disso, os SAB apresentam vantagens quando comparados com outros métodos de purificação, tais como volume reduzido, alta capacidade e curtos tempos de processamento (ALBERTSSON, 1986).

O fato que duas ou mais fases formam-se na água com adição de polímeros incompatíveis ou de um polímero e sais é bem conhecido há várias décadas (CABEZAS JR, 1996).

Os primeiros SAB foram descritos por BEIJERINCK, em 1896, formados a partir da mistura de soluções aquosas de gelatina e ágar ou gelatina e amido, sendo a fase superior rica em gelatina e a fase inferior em ágar ou amido (ALBERTSSON, 1986).

Entretanto, o pioneiro na utilização dos sistemas aquosos bifásicos em processos de bioseparação foi ALBERTSSON, que em 1958, utilizou soluções aquosas de polietilenoglicol e dextrana para a separação de diferentes biomoléculas (ANANTHAPADMANABHAN & GODDARD, 1987).

Nos últimos anos, os SAB têm sido utilizados na concentração e purificação de diversas biomoléculas, como na separação de proteínas do soro (COIMBRA, 1995), na partição de citocromo C, inibidor de tripsina da soja, ovoalbumina, albumina de soro bovino (BSA) e catalase (LIU et al, 1998), na extração de DNA plasmidial de células de *Escherichia coli* (KEPKA et al, 2004), dentre outros.

Os sistemas aquosos bifásicos podem ser do tipo “polímero-polímero” ou “polímero-sal” e são formados quando dois polímeros ou um polímero e um sal são misturados acima de certas concentrações. São constituídos por duas fases imiscíveis, que promovem a separação de solutos, a baixas

temperaturas, em um ambiente rico em água, de forma que sejam preservadas as suas principais propriedades (ALBERTSSON, 1986).

Existe grande variedade de polímeros hidrófilos, naturais ou sintéticos, capazes de formar fases quando misturados com um segundo polímero ou com um sal. Os SAB polietilenoglicol (PEG) + dextrana (Dex) ou PEG + sais são usuais, por se encontrarem disponíveis em grandes quantidades no mercado e não serem tóxicos, mas para uso em escala industrial, o custo da dextrana é muito elevado. Assim, o sistema PEG + sal tem sido empregado para a extração de enzimas em larga escala, pelo reduzido custo, baixa viscosidade e elevada seletividade. SAB salinos (PEG + sal) são formados à temperatura ambiente, sendo a fase superior rica em PEG e a fase inferior rica em sal (COIMBRA et al, 2003). Na Tabela 1 podem ser observados diferentes tipos de sistemas aquosos bifásicos avaliados em literaturas.

Ao serem adicionados aos SAB, as biomoléculas distribuem-se entre as fases inferior e superior, sem perda da atividade biológica. A relação entre as concentrações da biomolécula nestas fases define o coeficiente de partição (k) em sistemas aquosos (ALBERTSSON, 1986).

É necessário o estudo do comportamento destes sistemas, por exemplo, em diferentes composições e em variadas condições de temperatura e pH para se obter uma otimização do uso de SAB na partição de biocompostos. Assim, desde 1960, estudos têm sido conduzidos com o objetivo de encontrar as melhores condições para a partição e/ou concentração de células animais ou vegetais, enzimas, proteínas, ácidos nucleicos, vírus, metais, entre outros (CARVALHO, 2004).

Tabela 1 – Sistemas aquosos bifásicos típicos.

Polímero	Polímero
Polietilenoglicol	Dextrana (Dex) Ficoll Hidroxiopropil-amido (HPS) Polivinil Álcool (PVA) Polivinil pirrolidona (PVP)
Polipropilenoglicol	Maltodextrina (MD)
Polímero	Sal
Polietilenoglicol – Copolímeros	(NH ₄) ₂ SO ₄ NH ₂ CO ₂ NH ₄ Na ₂ HPO ₄ K ₂ CO ₃ K ₃ PO ₄ K ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄ Na ₂ SO ₃ FeSO ₄

Fonte: ZUÑIGA (2000).

BALASUBRAMANIAM et al (2003) utilizaram SAB formados por PEG e sais para a extração e purificação das proteínas do tabaco com resultados satisfatórios. Foi também estudada a influência de fatores como a massa molar do PEG, concentração de PEG e de sal na partição das proteínas.

Nos últimos anos, novos sistemas contendo polímeros com propriedades de termoseparação têm sido desenvolvidos, podendo ser utilizados para a purificação de diferentes tipos de biomoléculas (JÖNSSON & JOHANSSON, 2003).

Exemplos de copolímeros com propriedades de termoseparação são os copolímeros randômico, dibloco e tribloco constituídos por uma parte hidrofóbica (óxido de propileno) (PO) e uma parte hidrofílica (óxido de etileno) (EO) (ALEXANDRIDIS & HATTON, 1995). Os copolímeros à base de polietilenoglicol e polipropilenoglicol são polímeros mistos de óxido de etileno e

óxido de propileno, formados por polimerização simultânea. Como resultado, são formados blocos de monômeros com diversos tamanhos. As características físicas dos copolímeros variam intensamente em função dos blocos formados e dos grupos terminais da molécula (PERSSON et al, 2000). Diversas aplicações industriais existem em função da composição final e da massa molar do copolímero, tais como emulsificantes, espumantes, estabilizantes de dispersões, lubrificantes, excipientes para fármacos, entre outros (Catálogo Sigma-Aldrich, 2001; Catálogo Oxiteno, 1998). Os copolímeros do tipo tribloco são normalmente seqüências poliméricas de EO, PO e EO, respectivamente (Figura 1). As extremidades dessas moléculas são compostas por óxido de etileno e a parte central por óxido de propileno fazendo com que, as moléculas adquiram características hidrofílicas nas extremidades e hidrofóbicas no centro (FILHO, 2001).

Os copolímeros triblocos do tipo EO-PO-EO estão disponíveis comercialmente como surfactantes poliméricos não iônicos (HVIDT, 1995). Surfactantes são moléculas anfifílicas compostas de uma porção hidrofílica ou polar conhecida como “cabeça” e uma porção hidrofóbica ou apolar conhecida como “cauda”. O surfactante pode ser carregado (aniônico ou catiônico), dipolar ou não carregado (não iônico) (TANFORD, 1980).

Copolímeros triblocos de EO e PO, com estrutura $(EO)_x(PO)_y(EO)_x$, são sistemas modelos para estudos sobre interações hidrofóbicas. Esses copolímeros têm sido muito utilizados e progressos têm sido observados no entendimento de suas notáveis propriedades e estruturas em solução em função da temperatura (HVIDT, 1995).

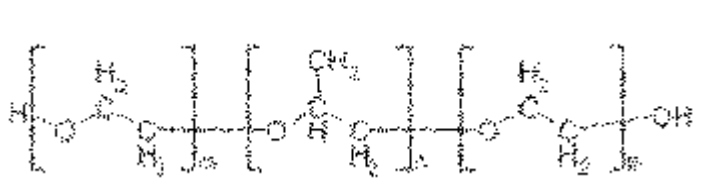


Figura 1 – Representação estrutural dos copolímeros triblocos. (Catálogo Oxiteno, 1998).

Vários estudos mostraram que os copolímeros estão dissolvidos como monômeros a baixas temperaturas, onde a água é um bom solvente para o EO e para o PO. No entanto, a água não é um bom solvente para o bloco de PO a altas temperaturas (ZHOU & CHU, 1988; BROWN et al, 1991; GLATTER et al, 1994).

Em solução aquosa, em baixas concentrações, as moléculas de surfactantes estão presentes, principalmente, na forma de monômeros embora dímeros e trímeros possam ser detectados. Quando essa concentração aumenta acima de certo limite, chamado de concentração micelar crítica (CMC), os monômeros do surfactante se acumulam espontaneamente para formar agrupamentos coloidais, conhecidos como micelas (Figura 2). Elas são formadas com um centro composto por cadeias de PO e uma parte externa composta por cadeias de EO. Dependendo do surfactante e das condições da solução, as micelas podem apresentar diferentes formas, variando de esférica à forma elipsoidal (PALEOLOGOS et al, 2005).

O processo de formação de micelas em água é resultado de um delicado balanço de forças intermoleculares, incluindo interações hidrofóbicas, estéricas, eletrostáticas, ligações de hidrogênio e de van der Waals. A principal força atrativa é resultado de um efeito hidrofóbico associado com as caldas apolares do surfactante, e a principal força repulsiva resulta de interações estéricas e interações eletrostáticas (no caso surfactantes iônicos e dipolares) entre as cabeças polares do surfactante. A micelização ocorre quando as forças atrativas e repulsivas estão balanceadas uma com a outra (TANFORD, 1980; ISRAELACHVILI, 1991).

Em determinadas condições de temperatura e de concentrações de surfactantes, algumas soluções micelares podem separar fases macroscópicas, sendo uma fase rica e a outra pobre em micelas. A separação de fases resulta de uma competição entre efeitos de energia interna, que promovem a separação das micelas da água, e efeitos entrópicos, que promovem a miscibilidade das micelas na água (LIU et al, 1996).

Alguns exemplos de sistemas usados são EO-PO-EO/dextrana e EO-PO-EO/hidroxipropil, onde em ambos os casos, a fase do topo foi constituída pelo copolímero EO-PO-EO. Outra possibilidade é a extração no ponto de névoa, que consiste na dissolução de copolímeros com propriedades de termoseparação em um extrato de proteínas, com posterior aquecimento a uma temperatura acima do ponto de névoa para formação das fases. (RABELO et al, 2004).

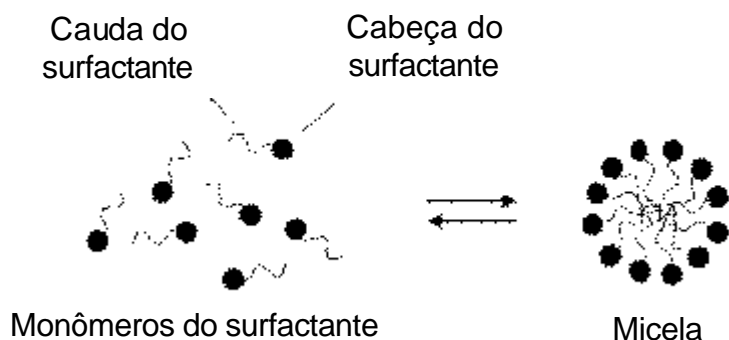


Figura 2 – Ilustração esquemática de um sistema reversível monômero-micela em equilíbrio termodinâmico (adaptado de LIU et al, 1996).

Quando os copolímeros com propriedades de termoseparação, em solução aquosa, são aquecidos acima de uma temperatura crítica, denominada de temperatura do ponto de névoa ou *cloud point*, a solubilidade deles diminui e um sistema composto por uma fase aquosa e outra polimérica é formado (RABELO et al, 2004) (Figura 3). A temperatura do ponto de névoa é a

temperatura na qual se inicia a separação de fases, caracterizada pelo início da turbidez da solução (CAMPESE et al, 2003). Esta técnica também é conhecida como extração por termoseparação. O ponto de névoa é característico de cada polímero e pode ser determinado pela turbidez da solução (RABELO et al, 2004).



Figura 3 – Representação visual da formação da “névoa”, com aquecimento a uma temperatura acima da temperatura do ponto de névoa (adaptado de PALEOLOGOS, 2005).

Na extração no ponto de névoa, quando a solução é aquecida à temperatura acima da temperatura do ponto de névoa do copolímero, ocorre a separação em duas fases, uma fase do topo, rica em água e uma fase do fundo, rica em copolímero (RABELO et al, 2004).

Segundo PALEOLOGOS et al (2005), os pesquisadores WATANABE et al (1976) foram os primeiros a introduzirem a extração no ponto de névoa como uma nova e promissora técnica de separação e extração e como uma alternativa em relação ao uso de solventes orgânicos. GOTO et al (1977) também iniciaram trabalhos envolvendo esta metodologia, que tem atraído considerável atenção nos últimos anos (TANG, 2004).

Para a otimização da partição de biomoléculas por meio do uso de copolímeros de termoseparação, é necessário o estudo de algumas variáveis como a massa molar, a concentração e a porcentagem de EO e PO no copolímero, além da temperatura e a presença de sais.

O comportamento dos polímeros em solução depende do conteúdo percentual de EO e PO, da massa molar do polímero e do tamanho dos blocos de EO e PO (RABELO et al, 2004). A taxa de dissolução diminui quando a massa do copolímero aumenta, para grupos de copolímeros com mesma proporção de PO/EO em sua composição. Isto ocorre, provavelmente, devido ao grau de ligações de hidrogênio entre as moléculas do copolímero e também é refletido na forma física dos copolímeros. Copolímeros de baixa massa molar e baixo conteúdo de EO são líquidos, já copolímeros de alta massa molar e alto conteúdo de EO são sólidos (ALEXANDRIDIS & HATTON, 1995).

JÖNSSON & JOHANSSON (2003) avaliaram a influência de diferentes sais na partição da BSA em sistemas aquosos bifásicos formados por polímeros de óxido de etileno modificados. Para os diferentes sais utilizados, a BSA tendenciou a se concentrar na fase superior, enquanto que para sistemas livres de sais, a tendência foi de concentrar-se na fase inferior do sistema. Entre os sais, o NaCl e o KBr influenciaram mais a partição da BSA para a fase superior que KF e $K_2SO_4^-$.

Uma das principais vantagens da utilização desses polímeros na extração por sistemas aquosos bifásicos é a possibilidade de reciclagem do polímero após a separação, reduzindo os custos (CUNHA et al, 1998). Outras vantagens são o curto tempo e as baixas temperaturas de processamento, ideais para a manutenção da estabilidade das biomoléculas.

RABELO et al (2004) estudaram a partição da enzima bromelina, presente no abacaxi (*Ananas comosus*), utilizando vários copolímeros triblocos (EO-PO-EO) e sais de fosfato de potássio, obtendo uma recuperação da enzima em torno de 79,5%. Constataram também que, para uma concentração fixa de copolímero, o aumento na temperatura resulta na termoseparação, formando uma fase rica em água e a outra rica em copolímero, e que é possível manipular a temperatura do ponto de névoa da solução de copolímero pela adição de sal, pela alteração da massa molar do copolímero, da proporção entre óxido de etileno e óxido de propileno no copolímero ou pela concentração de copolímero.

2. DIAGRAMA DE EQUILÍBRIO

Entende-se como diagrama de equilíbrio uma representação gráfica utilizada para expressar as concentrações de um sistema de fases. Os dados de equilíbrio são representados a temperatura e pressão fixas.

A representação gráfica dos dados termodinâmicos de SAB é de grande importância para os estudos de separação de biomoléculas, já que são usados como ferramenta básica de ponto de partida para o desenvolvimento de um processo de extração (KABIRI-BADR & CABEJAS JR, 1996). Para os sistemas aquosos bifásicos, onde a região de interesse se concentra na parte do diagrama com elevado teor de água, a forma de eixos cartesianos que expressa apenas duas das concentrações do sistema é a mais utilizada (SILVA, 2000).

A Figura 4 apresenta um diagrama de fases típico de SAB polímero (PEG) + sal (fosfato de potássio). A concentração de um dos componentes é representada no eixo horizontal, e o teor do outro componente, no eixo vertical. A quantidade de água (ou do terceiro componente) é calculada por diferença. 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 (região bifásica), e abaixo dela a mistura é totalmente miscível (região monofásica).

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).

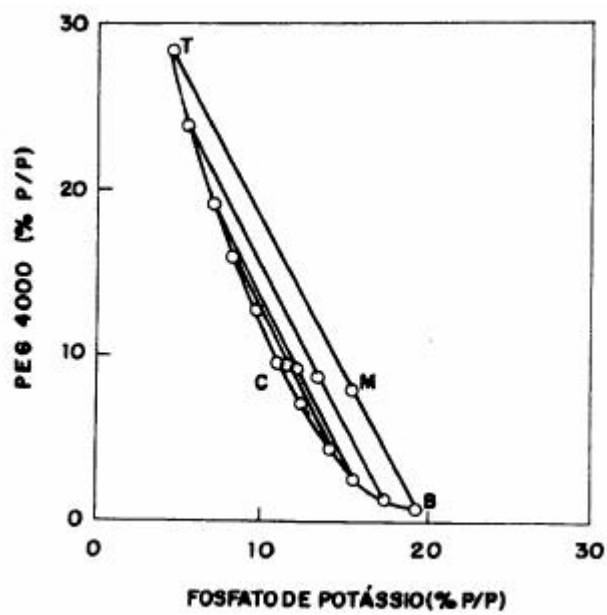


Figura 4 - Diagrama de fases para um sistema PEG 4000/fosfato de potássio, a 20 °C (ALBERTSSON, 1986).

3. COEFICIENTE DE PARTIÇÃO

Materiais biológicos adicionados em SAB distribuem-se entre as fases inferior e superior, sem perda da sua atividade biológica. A relação entre as concentrações de determinada biomolécula nas duas fases, define o coeficiente de partição (k) (ALBERTSSON, 1986).

$$k = \frac{C_1}{C_2}$$

Em que,

C_1 = concentração da biomolécula na fase superior (mg/mL); e

C_2 = concentração da biomolécula na fase inferior (mg/mL).

De acordo com estudos empíricos com SAB observou-se que a distribuição de proteínas é função de diversos fatores, como: massa molar do polímero, concentração dos polímeros, potencial hidrogeniônico, sais, carga dos polímeros, grupos hidrofóbicos e temperatura (COIMBRA et al, 2003).

A massa molar do polímero utilizado influencia diretamente a partição da biomolécula em estudo, alterando o diagrama de fases e o número de interações polímero-proteína. De um modo geral, mantida as condições constantes, quando se aumenta a massa molar de um dos polímeros, a concentração da biomolécula será maior na fase oposta, ou seja, a proteína é fortemente atraída por polímeros menores e repelida por polímeros maiores (BASKIR et al, 1989). Entretanto, o efeito da alteração da massa molar do polímero é, por sua vez, dependente da massa molar da proteína a ser separada. Proteínas com massa molar elevada são mais influenciadas por mudanças na massa molar do polímero do que proteínas com baixa massa molar (FORCINITT et al, 1991; COIMBRA et al, 2003).

Estudos feitos por MACHADO (1999) mostraram que em um sistema formado por PEG e maltodextrina para a partição de células microbianas, o aumento da massa molar do PEG ou da concentração de PEG provocaram aumento na migração das células para a fase inferior rica em maltodextrina, diminuindo o coeficiente de partição. Quando a massa molar do PEG foi aumentada de 4.000 para 8.000 g/mol ocorreu um decréscimo de 70 vezes no valor de k.

O pH influencia na dissociação dos grupos ionizáveis das proteínas, alterando as cargas da sua superfície e, conseqüentemente, o seu coeficiente de partição (LEHNINGER, 1976). SHANG et al (2004) revelaram que, ao se elevar o pH de 6,4 para 8, ocorreu um aumento considerável no coeficiente de distribuição para fenilalanina em sistemas aquosos bifásicos formados por PEG 5000, PEG 6000, PEG 1000 e sais de fosfato de potássio. Fator semelhante foi observado por SCHMIDT et al (1994) em que a elevação do pH de 5,3 para

9,5, resultou num aumento de 29 vezes no coeficiente de partição da α -amilase.

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

GÜNDÜZ & KORKMAZ (2000) estudaram o efeito da concentração de NaCl na partição da albumina de soro bovino (BSA) em sistemas formados por dextrana 37500 e PEG 3350 em pH 7 e relataram que o coeficiente de partição da proteína diminuiu de 0.038 para 0.022 ao se aumentar a concentração de NaCl de 0,06 para 0,2 M.

Polietilenoglicóis quando carregados positivamente, na forma de trimetilamina-PEG, concentram compostos com carga negativa na fase superior, rica em PEG. No caso de PEGs carregados negativamente, a tendência é de uma atuação inversa (ALBERTSSON et al, 1990).

Quando são utilizadas baixas concentrações de PEG carregado com grupos hidrofóbicos (em torno de 1 mM), como o palmitato, ocorre um aumento da afinidade de proteínas com sítios hidrofóbicos pela fase superior, rica em PEG-palmitato (ALBERTSSON et al, 1990).

O efeito da temperatura na partição de uma biomolécula se manifesta através de mudanças na forma da curva binodal (diagrama de fases), ou de alterações na conformação da proteína, interferindo deste modo na partição da mesma (BASKIR et al, 1989). Geralmente, para temperaturas inferiores a 20 °C, a curva binodal desloca-se em direção às baixas concentrações dos componentes que formam as fases, resultando em aumento do comprimento das linhas de amarração. Os sistemas cujas composições se encontram mais próximas do ponto crítico são mais influenciados pela mudança de temperatura, devido à sua instabilidade. Quando a curva binodal é deslocada, o sistema pode atingir facilmente a região monofásica (BAMBERGER et al, 1985; TJERNED et al, 1990). BELVAL et al (1998) revelaram que ao se aumentar a temperatura de 20 para 31 °C em sistemas formados por PEG 1450 e sais de fosfato de potássio, ocorreu um deslocamento da curva binodal em direção às baixas concentrações dos componentes que formam as fases. RABELO et al (2004) revelaram que ao se elevar a temperatura de 25 para 30 °C em sistemas formados por copolímero tribloco e sais de fosfato de potássio, o coeficiente de partição da bromelina diminuiu de 1,4 para 0,85.

4. PROTEÍNAS DO SORO

As proteínas do soro são uma mistura de proteínas com numerosas e diversas propriedades funcionais e, portanto têm varias aplicações tecnológicas em potencial. Dentre as diversas proteínas, aquelas em maior quantidade são a α -la e a β -lg. Outras proteínas, tais como BSA, imunoglobulinas e lactoferrina estão presentes no soro de queijo, em baixas quantidades (Tabela 2).

Tabela 2 – Concentração média das proteínas no soro de queijo *in natura*.

Proteína	Concentração (g/L)	% da proteína total do leite
β -lactoglobulina	2,0 – 4,0	9
α -lactoalbumina	1,0 – 1,5	4
Protease-peptonas	0,6 – 1,8	4
Albumina do soro	0,1 – 0,4	1
Imunoglobulinas	0,6 – 1,0	2

Fonte: FENNEMA, (1996).

O soro apresenta rica e heterogênea mistura de proteínas, que, por conter todos os aminoácidos essenciais são consideradas proteínas completas com ampla faixa de atributos funcionais para aplicações nutricionais, biológicas (Tabela 3) e como ingredientes alimentares (SMITHERS et al, 1996).

Tabela 3 – Funções biológicas das proteínas do soro de queijo.

Proteína	Função Biológica
Proteínas do soro em geral	Anti-carcinogênicas Aumento da resistência do sistema imunológico Aumento da longevidade do organismo Hipocolesterolêmica
β -lactoglobulina	Digestiva Suplemento alimentício
α -lactoalbumina	Anti-carcinogênica Regula o sono e a vigília
Lactoferrina	Antimicrobiana Regulador de transporte de metais Aumento da resistência do sistema imunológico Antiinflamatório Anti-carcinogênica
Lactoperoxidase	Antimicrobiana

Fonte: MCINTOSHI et al., 1998; GRASELLI et al., 1997; citado por ROJAS, 2001)

A BSA é uma proteína com 582 resíduos de aminoácidos e atua como uma proteína carreadora no transporte de moléculas apolares em fluidos biológicos (CAYOT & LORIENT, 1997). Corresponde a cerca de 0,7 a 1,3% das proteínas do soro, tem massa molar de 69 kDa, ponto isoelétrico entre pH 4,7 e 4,8 (KILARA & HARWALKAR, 1996) e pode ser reversivelmente desnaturada pelo aquecimento ou pela adição de ácido ou base entre 40 e 50 °C (CAYOT & LORIENT, 1997).

As imunoglobulinas formam uma família heterogênea de glicoproteínas, com massa molar variando de 148 a 1000 kDa, e que possuem propriedades de anticorpos. Embora apresentem temperatura para serem desnaturadas mais

elevada que aquelas da β -lg e da α -la, elas são muito sensíveis ao aquecimento na presença de BSA, provavelmente devido à interação com o grupo tiol livre (CAYOT & LORIENT, 1997). Existem três classes distintas de imunoglobulinas: IgM, IgA e IgG (IgG1 e IgG2). São heterogêneas em relação ao tamanho, à carga, às funções e à antigenicidade (KILARA & HARWALKAR, 1996).

A lactoferrina é uma metaloproteína com massa molar variando de 80 a 92 kDa e contém 703 resíduos de aminoácidos e 16 pontes dissulfeto e um mol de Fe^{3+} ligado. Devido ao ferro ligado, exibe alta resistência à desnaturação pelo aquecimento e apresenta propriedades antibacterianas similares às daquelas da lisozima e da lactoperoxidase (CAYOT & LORIENT, 1997).

Também presente no soro, o glicomacropéptido (GMP) é um péptido do soro derivado da caseína. Quando o leite é submetido ao tratamento com a enzima quimosina durante a fabricação de queijo, a proteína k-caseína é hidrolisada em dois péptidos. A clivagem ocorre entre os aminoácidos 105 (fenilalanina) e 106 (metionina), liberando um péptido C-terminal solúvel de 6,8 kDa denominado GMP e um péptido insolúvel, denominado para-k-caseína N-terminal de 12271 Daltons (WHITAKER & TANNENBAUM, 1977). O péptido para-k-caseína contém os resíduos de aminoácidos 1 a 105 e se torna parte do queijo, enquanto o GMP, contendo os resíduos de aminoácidos 106 a 169 permanece solúvel no soro (FOX & McSWEENEY, 1998).

Algumas proteínas menores também desempenham papel importante nas propriedades funcionais das proteínas do soro. A fração proteose-peptona, a qual consiste de fragmentos proteolíticos de β caseína, contém péptidos de superfície ativa. Também são encontradas no soro numerosas enzimas, como lactoperoxidase, fosfatase alcalina, catalase, oxidase sulfidril e plasmina (CAYOT & LORIENT, 1997).

A β -lg é encontrada no soro de queijo com uma concentração que varia de 2 a 4 g/L. Possui massa molar de 18,3 kDa e 162 resíduos de aminoácidos, com um grupo tiol e 2 ligações dissulfeto (CAYOT & LORIENT, 1997), com ponto isoelétrico igual a 5,2. É uma proteína termolábil e, à temperatura abaixo de 70 °C, as mudanças na conformação da estrutura proteica são reversíveis (FOX & McSWEENEY, 1998). No leite bovino tem sido encontrados 4 variantes genéticas (A, B, C e D) (FOX & McSWEENEY, 1998). As variantes A e B são as mais abundantes, diferindo uma da outra devido a dois resíduos de

aminoácidos (o resíduo 64 é ácido aspártico para a variante A e glicina para a B; o resíduo 118 é valina para a variante A e alanina para a B) (CAYOT & LORIENT, 1997). A β -lg é uma proteína de elevado valor nutritivo podendo ser utilizada na fortificação de bebidas e sucos de frutas, devido à sua grande solubilidade e estabilidade (ZUÑIGA, 2000). A β -lg é considerada também o principal agente alergênico do leite bovino (MÄKINEN-KILJUNEN & PALOSUO, 1992). A separação da β -lg do soro resultará em uma fração pobre em β -lg, mas com elevadas propriedades químicas, físicas e nutricionais devido à presença das outras proteínas constituintes do soro (CHIACONE & GATTONI, 1993; SMITHERS et al, 1996).

A α -la é uma molécula de 14,2 kDa com 123 resíduos de aminoácidos e quatro pontes dissulfeto, com ponto isoelétrico igual a 5,1, sendo insolúvel na faixa de pH de 4,0 a 5,5 (KILARA & HARWALKAR, 1996). É rica em triptofano, sendo apropriada para a preparação de alimentos infantis e, provavelmente, a de mais baixo custo com essa característica (BRAMAUD et al, 1997). No soro apresenta concentração de, aproximadamente, 1,5 g/L (CAYOT & LORIENT, 1997). Variantes genéticas A, B e C de α -la tem sido observadas, e a sua heterogeneidade é resultado de um resíduo de aminoácido diferente em cada variante (KILARA & HARWALKAR, 1996). O resíduo na posição 10 é glicina para a variante A e arginina para a variante B (CAYOT & LORIENT, 1997).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTSSON, P. A. **Partitioning of cell and macromolecules**, New York: John Wiley, 1986. 346 p.
- ALBERTSSON, P. A., JOHANSSON, G., TJERNELD, F. Aqueous two-phase separations. In: JUAN, A (editor) **Separation processes in biotechnology**. New York, p. 287-327, 1990.
- ALEXANDRIDIS, P., HATTON, T. A. Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly (ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modeling. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 96, p. 1-46, 1995.
- ANANTHAPADMANABHAN, K. P., GODDARD, E. D. Aqueous biphasic formation in polyethylene oxide-inorganic salt systems. **Langmuir**, v. 3, p. 25-31, 1987.
- ANUALPEC**. Instituto FNP. Consultoria & Comércio. São Paulo, 2005. 340 p.
- ASENJO, J. A. **Separation Process in Biotechnology**. Marcell Dekker. New York, p. 287-326, 1990.
- BALASUBRAMANIAM, D., WILKINSON, C., COTT, K. V., ZHANG, C. Tobacco protein separation by aqueous two-phase extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 989, p. 119-129, 2003.
- BAMBERGER, S., BROOKS, D., SHARP, K., ALSTINE, J. V., WEBBER, T. Preparation of phase systems and measurement of their physicochemical properties. In: WALTER, H., BROOKS, D., FISCHER, D. (editors) **Partitioning in aqueous two-phase systems: theory, methods, uses and applications to biotechnology**. Academic Press, New York, p. 85-130, 1985.

- BASKIR, J. N., HATTON, T. A., SUTER, U. W. Protein partitioning in two-phase aqueous polymer systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 34, p. 541-558, 1989.
- BELVAL, S., BRETON, B., HUDDLESTON, J., LYDDIATT, A. Influence of temperature upon protein partitioning in poly(ethylene glycol)-salt aqueous two-phase systems close to the critical point with some observations relevant to the partitioning of particles. **Journal of Chromatography B**, v. 711, p. 19-29, 1998.
- BRAMAUD, C., AIMAR, P., DAVEE, G. Whey protein fractionation: isoelectric precipitation of α -lactalbumin under gentle heat treatment. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 56, n. 3, p. 391-397, 1997.
- BROWN, W., SCHILLEN, K., ALMGREN, M., HVIDT, S., BAHADUR, P. Micelle and gel formation in a poly(ethylene oxide)/poly(propylene oxide)/poly(ethylene oxide) triblock copolymer in water solution: dynamic and static light scattering and oscillatory shear measurements. **Journal of Physical Chemistry**, v. 95, p. 1850-1858, 1991.
- CABEZAS JR, H. Theory of phase formation in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**, v. 680, p. 3-30, 1996.
- CAMPESE, G. M., RODRIGUES, E. M. G., TAMBOURGI, E. B., PESSOA JR., A. Determination of cloud-point temperatures for different copolymers. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 20, n. 3, p. 335-337, 2003.
- CARVALHO, C. P. **Estudo de equilíbrio de fases para sistemas aquosos bifásicos compostos por polietileno glicol, sais e água**. 2004. 70 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 2004.
- CATÁLOGO OXITENO, 1998.
- CATÁLOGO SIGMA-ALDRICH, 2001.

- CAYOT, P., LORIENT, D. Structure-Function Relationships of Whey Proteins. In: DAMODARAN, S., PARAF, A. (editors) **Food proteins and their applications**. Marcel Dekker, Inc., New York, p. 225-256, 1997.
- CHIACONE, E., GATTONI, M. Seletive removal of beta-lactoglobulin directly from cow's milk and preparation of hypoallergenic formulas: a bioaffinity method. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 18, p. 1-8, 1993.
- 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., GIRALDO-ZUÑIGA, A. D., MINIM, L. A., MEIRELLES, A. J. A. **Uso de sistema aquoso bifásico na extração líquido-líquido**. Cadernos didáticos, 95. Viçosa: UFV, 2003. 43 p.
- CUNHA, M. T., TJERNELD, F., CABRAL, J. M. S., AIRES-BARROS, M. R. Effect of electrolytes and surfactants on the thermoseparation of an ethylene oxide-propylene oxide random copolymer in aqueous solution. **Journal of Chromatography B**, v. 711, p. 53-60, 1998.
- FENNEMA, O. R. **Food Chemistry**. Marcel Dekker, Inc., New York, 1996. 1069 p.
- FILHO, E. S. M. **Equilíbrio de fases em sistemas aquosos poliméricos**. 2001. 99p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 2001.
- FORCINITTI, D., KULA, M. R., HALL, C. K. Influence of polymer weight and temperature on phase composition in aqueous two-phase systems. **Fluid Phase Equilibria**, v. 61, p. 243-262, 1991.
- FOX, P. F., McSWEENEY, P. L. H. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. Blackie Academic & Professional. Cork, 1998. 478 p.

- GLATTER, O., SCHERF, G., SCHILLÉN, K., BROWN, W. Characterization of a Poly(ethylene oxide)-Poly(propylene oxide) Triblock Copolymer (EO27-PO39-EO27) in Aqueous Solution. **Macromolecules**, v. 27, p. 6046-6054, 1994.
- GÜNDÜZ, U., KORKMAZ, K. Bovine serum albumin partitioning in an aqueous two-phase system: Effect of pH and sodium chloride concentration. **Journal of Chromatography B**, v. 743, p. 255-258, 2000.
- HUSTED, H., KRONER, K. H., MENGUE, U., KULA, M. R. Partition in aqueous two-phase systems. **Trends in Biotechnology**, v. 3, n. 6, p. 139-144, 1985.
- HVIDT, S. Pressure- and temperature-dependent micellization of a poly (ethylene oxide)-poly (propylene oxide) triblock copolymer in aqueous solutions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 112, p. 201-207, 1995.
- ISRAELACHVILI, J. N. **Intermolecular and Surface Forces**. 2 ed., Academic Press, London, 1991.
- JÖNSSON, M., JOHANSSON, H. O. Protein partitioning in thermoseparating systems of a charged hydrophobically modified ethylene oxide polymer. **Journal of Chromatography A**, v. 983, p. 133-144, 2003.
- KABIRI-BADR, M., CABEZAS JR, H. A thermodynamic model for the phase behavior of salt-polymer aqueous two-phase systems. **Fluid Phase Equilibria**, v. 115, p. 39-58, 1996.
- KEPKA, C., RHODIN, J., LEMMENS, R., TJERNELD, F., GUSTAVSSON, P. E. Extraction of plasmid DNA from *Escherichia coli* cell lysate in a thermoseparation aqueous two-phase system. **Journal of Chromatography A**, v. 1024, p. 95-104, 2004.
- KILARA, A., HARWALKAR, V. R. Denaturation. In: NAKAI, S., MODLER, H. W. (editors) **Food Proteins**. VCH Publishers, Inc., New York, p. 71-165, 1996.

- LEHNINGER, A. L. **Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blucher, 1976, 145 p.
- LIU, C. L., NIKAS, Y. J., BLANKSCHTEIN, D. Novel bioseparations using two-phase aqueous micellar systems. **Biotechnology and Bioengineering** v. 52, n. 2, p. 185-192, 1996.
- LIU, C. L., KAMEI, D. T., KING, J. A. WANG, D. I. C., BLANKSCHTEIN. Separation of proteins and viruses using two-phase aqueous micellar systems. **Journal of Chromatography B**, v. 711, p. 127-138, 1998.
- MACHADO, F. L. C. **Equilíbrio de fases para sistemas aquosos bifásicos (SAB) compostos por polietilenoglicol-maltodextrina-água**. 1999. 87 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- MÄKINEN-KILJUNEN, S., PALOSUO, T. A. Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of bovine β -lactoglobulin in infant feeding formulas and in human milk. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 47, p. 347-352, 1992.
- PALEOLOGOS, E. K., GIOKAS, D. L., KARAYANNIS, M. I. Micelle-mediated separation and cloud-point extraction. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 5, p. 426-436, 2005.
- PERSSON, J., JOHANSSON, H. O., GALAEV, I., MATTIASSON, B., TJERNELD, F. Aqueous polymer two-phase systems formed by new thermoseparating polymers. **Bioseparation**, v. 9, p. 105-116, 2000.
- RABELO, A. P. B., TAMBOURGI, E. B., PESSOA JR., A. Bromelain partitioning in two-phase aqueous systems containing PEO-PPO-PEO block copolymers. **Journal of Chromatography B**, v. 807, p. 61-68, 2004.

- ROJAS, E. E. G. **Separação e Purificação de α -lactoalbumina e β -lactoglobulina pela cromatografia por exclusão molecular após a extração com sistemas aquosos bifásicos.** 2001. 82 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 2001.
- SCHMIDT, A. S., VENTON, A. M., ASENJO, J. A. Partitioning and purification of α -amilase in aqueous two-phase systems. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, p. 131-142, 1994.
- SHANG, Q. K., LI, W., JIA, Q., LI, D. Q. Partitioning behavior of amino acids in aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol and phosphate buffer. **Fluid Phase Equilibria**, v. 219, p. 195-203, 2004.
- SILVA, L. H. M. **Equilíbrio de fases em sistemas aquosos bifásicos: polímero/polímero e polímero/sal.** Campinas, SP: UNICAMP, 2000. 113 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, 2000.
- SMITHERS, G. W., BALLARD, F. J., COPELAND, A. D., SILVA, K. J., DIONYSINS, D. A., FRANCIS, G. L., GORRARD, C., GRIEVE, P. A., MELNTOH, G. H., MICHELL, I. R., PEARCE, R. J., REGESTER, G. O. New opportunities from the isolation and utilization of whey proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 79, p. 1454-1459, 1996.
- TANFORD, C. **The hydrophobic effect: Formation of Micelles and Biological Membranes**, 2 ed., New York: Wiley Interscience, 1980.
- TANG, A. N., JIANG, D. Q., YAN, X. P. Cloud point extraction preconcentration for capillary electrophoresis of metal ions. **Analytica Chimica Acta**, v. 507, p. 199-204, 2004.
- TJERNED, F., JOHANSON, G. Aqueous two-phase systems for biotechnical use. **Bioseparation**, v. 1, p. 225-263, 1990.

ZHOU, Z., CHU, B. Anomalous micellization behavior and composition heterogeneity of a triblock ABA copolymer of (A) ethylene oxide and (B) propylene oxide in aqueous solution . **Macromolecules**, v. 21, p. 2548-2554, 1988.

ZUÑIGA, A. D. G. **Sistemas aquosos polietilenoglicol-sal: separação de a-lactoalbumina e b-lactoglobulina do soro de queijo e hidrodinâmica em um extrator Graesser**. 2000. 78 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 2000.

WHITAKER, J. R., TANNENBAUM, S. R. **Food Proteins**. Avi Publishing, Inc., p. 185. 1977.

CAPÍTULO 2

PARTIÇÃO DE α -LACTOALBUMINA E β -LACTOGLOBULINA POR EXTRAÇÃO NO PONTO DE NÉVOA

1. INTRODUÇÃO

O soro de queijo, de cor amarelo-esverdeada, é um subproduto da indústria de queijos, obtido pela coagulação do leite. O seu sabor é ligeiramente ácido ou doce e a sua composição depende do tipo e do processo de fabricação do queijo. A composição é de, aproximadamente, 93% de água, 5% de lactose, 0,9% de proteínas, 0,3% de gordura, 0,2% de ácido láctico e de pequenas quantidades de vitaminas (BEM-HASSAN & GHALY, 1994).

O soro é uma mistura de proteínas, cada uma tendo atributos únicos para aplicações nutricionais, biológicas e como ingredientes alimentares (DOUTANI et al, 2004).

A α -lactoalbumina (α -la) e a β -lactoglobulina (β -lg) representam, aproximadamente, 70% do total das proteínas do soro e são responsáveis pelas propriedades hidratantes, gelificantes, emulsificantes e espumantes dos ingredientes de proteínas do soro (CAYOT & LORIENT, 1997).

Diferentes métodos para separação de proteínas do soro de queijo têm sido usados, como a filtração em gel (YOSHIDA, 1990), a cromatografia de alta resolução (CHEN et al, 1999), a ultrafiltração (MEHRA & DONNELLY, 1993) e a extração líquido-líquido (TEOTIA & GUPTA, 2004), dentre outros.

A extração líquido-líquido convencional, na qual se utiliza soluções aquosas e solventes orgânicos, não é adequada para separar componentes de origem biológica, como proteínas e células, devido à estabilidade destes ser baixa em solventes orgânicos. Uma variante da extração líquido-líquido tradicional é a partição em sistemas aquosos bifásicos (SAB), a qual vem sendo utilizada com sucesso no isolamento de proteínas e de outros biocompostos (COIMBRA et al, 2003). As fases da maioria dos SAB são formadas por 70 a 90% de água, favorecendo a estabilidade de biomoléculas durante a separação, o que não ocorre com os sistemas tradicionais, compostos por solventes orgânicos (HUSTED et al, 1985).

Além disso, os SAB apresentam vantagens quando comparados com outros métodos de purificação, tais como volume reduzido, alta capacidade e curto tempo de processamento (ALBERTSSON, 1986).

Um dos problemas encontrados em SAB é a dificuldade em separar as biomoléculas de interesse da solução polimérica. Assim, tanto em escala industrial como em processos laboratoriais, métodos de custo elevado e de tempo prolongado, como a ultrafiltração, eletroforese e cromatografia, têm sido empregados para separar biomoléculas das soluções poliméricas. Se o polímero puder ser facilmente removido e reciclado, o custo de se trabalhar com SAB será reduzido (LI et al, 1998). PERSON et al, estudou a recuperação e reciclagem de copolímero do tipo EO-PO analisando a influência da adição de vários componentes aos sistemas, como, sais, proteínas e um segundo polímero, constatando que mais de 90% do copolímero pode ser recuperado. (ALRED et al, 1994).

Nos últimos dez anos, novos sistemas poliméricos contendo polímeros de termoseparação têm sido desenvolvidos, podendo ser usados na purificação de diferentes tipos de biomoléculas (GALAEV & MATTIASSON, 2002; JÖNSSON & JOHANSSON, 2003).

Os copolímeros triblocos são sintetizados pela polimerização simultânea de mais de um tipo de monômero. O resultado dessa síntese é chamado de copolímero bloco se os monômeros individuais ocorrerem como blocos de vários tamanhos na molécula de copolímero (ALEXANDRIDIS & HATTON, 1995).

Os copolímeros triblocos de óxido de etileno (EO) e óxido de propileno (PO), com estrutura $(EO)_x(PO)_y(EO)_x$, são sistemas modelos atrativos para estudos sobre interações hidrofóbicas. Esses copolímeros têm sido empregados nos últimos tempos, e muito progresso tem sido obtido no entendimento de suas propriedades e estruturas em solução em função da temperatura (HVIDT, 1995).

Os copolímeros EO-PO-EO são classificados de acordo com sua faixa de massa molar e também na sua composição, de acordo com a proporção PO/EO (SCHMOLKA, 1977; BASF CORP., 1989). A notação utilizada para estes copolímeros triblocos inicia-se com a letra L (para líquidos), P (para pasta) e F (para flocos). O primeiro ou os dois primeiros números após a letra inicial, indicam a massa molar do bloco PO e o último número significa a fração em massa do bloco EO. Por exemplo, P 104 e F 108 têm a mesma massa molar de PO (na ordem de 3000), mas P 104 tem 40% (p/p) de EO e F 108 tem 80% (p/p) de EO (ALEXANDRIDIS & HATTON, 1995).

Quando esses polímeros são aquecidos acima de uma temperatura crítica, denominada de temperatura do ponto de névoa ou *cloud point*, sua solubilidade diminui e um sistema composto por uma fase aquosa e outra polimérica é formado (RABELO et al, 2004).

Uma vantagem do uso desses polímeros na extração por sistemas aquosos bifásicos é a possibilidade de reciclagem do polímero após a separação sem necessidade de outro método de separação de custo elevado (CUNHA et al, 1998). Assim, nestes casos, são também atrativos o curto tempo de processamento e as baixas temperaturas empregadas, ideais para a manutenção da estabilidade das biomoléculas.

Neste trabalho, avaliou-se a extração no ponto de névoa, objetivando separar as proteínas do soro de queijo, α -la e β -lg, nas duas fases formadas nos SAB, a fase superior (aquosa) e a inferior (copolimérica).

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Processos de Separação (LPS) do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais.

2.1 PREPARO DOS SISTEMAS DE FASES

As características químicas dos reagentes foram obtidas a partir de boletins técnicos de seus respectivos fabricantes e foram utilizados sem nenhuma etapa de purificação adicional.

Os sistemas aquosos bifásicos foram formados por copolímeros triblocos, água, sais de fosfato de potássio e isolado protéico de soro (WPI). Os SAB foram preparados em tubos de centrífuga graduados e sua massa total foi de 12 g para cada sistema. Os copolímeros triblocos utilizados foram ULTRARIC PE 61, com 10% de EO, massa molar média 1925 g/mol e viscosidade de 285 cps (Oxiten, Brasil); L 31, com 10% de EO, massa molar média 2000 g/mol e viscosidade de 325 cps (Aldrich, Alemanha); L 35, com 50% de EO, massa molar média 1900 g/mol e viscosidade de 375 cps (Aldrich, Alemanha) e o copolímero identificado neste trabalho por L (código 43544-9,

Catalog Handbook of Fine Chemicals Aldrich, 1996-1997), líquido, com 40% de EO, massa molar média 2900 g/mol e viscosidade de 850 cps (Aldrich, Alemanha). A solução de sais de fosfato de potássio foi previamente preparada pesando-se quantidades de fosfato de potássio (Vetec, Brasil) monobásico (KH_2PO_4) e dibásico (K_2HPO_4) na proporção de 1:1,82 (p/p) , respectivamente, para que fosse atingido o pH 7 na solução. A solução aquosa de WPI (Davisco Foods, USA) também foi previamente preparada, contendo 20 mg de WPI/mL de solução. As concentrações das proteínas α -la e β -lg nesta solução foram, respectivamente, 1,98 mg/mL e 8,41 mg/mL.

Os componentes foram pesados sequencialmente, utilizando-se balança analítica (Denver Instruments, USA). O copolímero foi adicionado em concentrações variando de 5 a 30% (p/p) do total do SAB. Em seguida foi adicionada solução de sais de fosfato de potássio em concentrações de 15, 45 e 100 mM, e por último foi acrescentado 1 g da solução aquosa de WPI. Os componentes foram misturados, agitados manualmente, por inversão, durante cinco minutos, para então serem centrifugados (Eppendorf 5804, Alemanha) a 3640 x g por 20 minutos. Após a centrifugação, os tubos foram deixados em repouso no banho termostático (Tecnal, modelo TE 184, Brasil) a 10 °C acima da temperatura do ponto de névoa do sistema, durante 16 horas.

2.2 DETERMINAÇÃO DAS TEMPERATURAS DO PONTO DE NÉVOA

As temperaturas do ponto de névoa foram determinadas, a partir de 5 g de sistemas aquosos bifásicos contendo copolímeros triblocos PE 61, L 31, L 35 e L, e sais de fosfato de potássio monobásico e dibásico, mas sem a incorporação do WPI aos sistemas. A concentração de copolímero e das soluções de sais de fosfato de potássio foram as mesmas usadas para o preparo dos SAB, perfazendo um total de 144 experimentos, com duas repetições.

Após a adição dos reagentes (copolímero e solução salina) os sistemas foram agitados manualmente, por inversão, durante 5 minutos e então foram transferidos para um banho termostático. A temperatura do sistema foi aumentada à taxa de 0,5 °C por minuto, a qual foi monitorada com um

cronômetro digital e a temperatura do ponto de névoa foi aquela registrada ao se verificar o início da turbidez do sistema.

2.3 COEFICIENTE DE PARTIÇÃO DAS PROTEÍNAS

O coeficiente de partição das proteínas foi determinado após o preparo dos sistemas adicionados de proteínas e 16 horas de repouso, para garantir que o equilíbrio houvesse sido atingido. Alíquotas das fases superiores foram coletadas com o auxílio de uma pipeta de Pasteur. Após a coleta da fase superior, foi inserida no tubo, cuidadosamente, uma seringa com agulha longa, perturbando a interface o mínimo possível. Após uma hora de repouso, o embolo da seringa foi puxado lentamente para coleta da fase inferior de cada SAB. As fases foram coletadas em recipientes com tampa e armazenadas sob refrigeração até o término das análises. A quantificação da concentração das proteínas α -la e β -lg nos sistemas foi feita por cromatografia líquida de alto desempenho de fase reversa (HPLC-RP). O coeficiente de partição (k), definido como a razão entre a concentração da proteína (α -la ou β -lg) na fase superior, rica em água (C_1) e a concentração da mesma proteína na fase inferior, rica em copolímero (C_2), foi calculado através da seguinte equação:

$$k = \frac{C_1}{C_2}$$

De acordo com o objetivo deste trabalho, o melhor SAB para a partição das proteínas foi aquele que apresentou o maior coeficiente de partição para uma proteína e um menor coeficiente de partição para a outra proteína, possibilitando assim, uma melhor separação entre as duas no sistema.

2.4 QUANTIFICAÇÃO DE α -LACTOALBUMINA E β -LACTOGLOBULINA NAS FASES

As proteínas α -la e β -lg presentes nas fases foram quantificadas simultaneamente por cromatografia líquida de alto desempenho de fase reversa (HPLC-RP), utilizando um cromatógrafo (Shimadzu, modelo LC-10 VP). Todas as soluções e amostras foram filtradas através de membranas de acetato de celulose (Durapor) de 0,2 μ m. Foram injetados automaticamente 20 μ L das amostras em uma coluna de fase reversa (CLC ODS-C18-Shimadzu) de 250 mm por 4,6 mm, acoplada a uma coluna de guarda (CLCG-ODS-Shimadzu) de 10 mm por 4,6 mm, ambas equilibradas com solução de cloreto de sódio (F. Maia, Brasil) 0,15 M, pH 2,5 (solução A) e acetonitrila (Vetec, Brasil) (solução B). A coluna foi eluída com um gradiente formado pelas soluções A e B, a um fluxo de 1 mL/min e todas as análises foram feitas em duplicata. O gradiente de eluição é demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1 – Gradiente utilizado nas análises cromatográficas por HPLC-RP

Tempo (minutos)	Concentração de A (%) (NaCl 0,15 M; pH 2,5)	Concentração de B (%) (Acetonitrila)
0 - 3	85	15
3 - 7	64	36
7 - 20	55	45
20 - 24	55	45
24 - 33	100	0

Cada amostra foi analisada em 33 minutos e a detecção foi a 210 nm com um detector de feixe de diodos (SPD-M10AVP-Shimadzu), com a coluna sendo mantida a 40 °C. A integração dos picos foi pela unidade controle SCL-

10 AVP do cromatógrafo (Shimadzu). As concentrações de cada proteína foram então determinadas através das áreas dos picos, utilizando-se os dados de calibração.

As curvas analíticas foram construídas utilizando-se soluções das proteínas padrão α -la e β -lg (Sigma, USA) em concentrações na faixa de 0,02 a 3,0 mg/mL.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 DETERMINAÇÃO DO PONTO DE NÉVOA

Para uma concentração fixa de copolímero e sais, observou-se que com o aumento da temperatura, ocorreu a termoseparação da solução copolimérica, resultando na formação de duas fases, uma rica em água (fase superior) e outra rica em copolímero (fase inferior). É possível manipular o ponto de névoa de uma solução copolimérica pela adição de sal, pela mudança de massa molar do copolímero, pela mudança na proporção entre EO e PO ou pela mudança na concentração de copolímero (RABELO et al, 2004).

O mecanismo molecular do fenômeno do ponto de névoa ainda não é totalmente compreendido, embora diferentes interpretações baseadas na desidratação do EO, ligações de hidrogênio entre o oxigênio do EO e as moléculas de água e conformações polares e não polares do EO tenham sido relatadas (KJELLANDER & FLORIN, 1980).

As temperaturas do ponto de névoa determinadas neste trabalho tiveram uma precisão de 1 °C para os copolímeros.

3.1.1 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE COPOLÍMERO NA TEMPERATURA DO PONTO DE NÉVOA

Para os copolímeros L 31 e PE 61, com o aumento na concentração dos copolímeros detectou-se temperaturas menores do ponto de névoa. Na Figura 1, com solução de sais de fosfato de potássio 15 mM, o aumento no teor de copolímero L 31 de 5 até 30% (p/p) levou à redução de 20 °C para 9 °C, respectivamente, na temperatura do ponto de névoa. Valores das temperaturas do ponto de névoa para os copolímeros L 31 e PE 61, nas concentrações salinas de 45 e 100 mM estão representados nas Figuras 2 e 3. Pode-se observar que há uma tendência de comportamento nos casos dos copolímeros L 31 e PE 61, ou seja, de uma redução da temperatura do ponto de névoa com o acréscimo de copolímero. Este fato pode ser explicado pelo aumento das

interações entre as moléculas de copolímeros e conseqüente agregação das mesmas, ocasionando a separação de fases (RABELO et al, 2004).

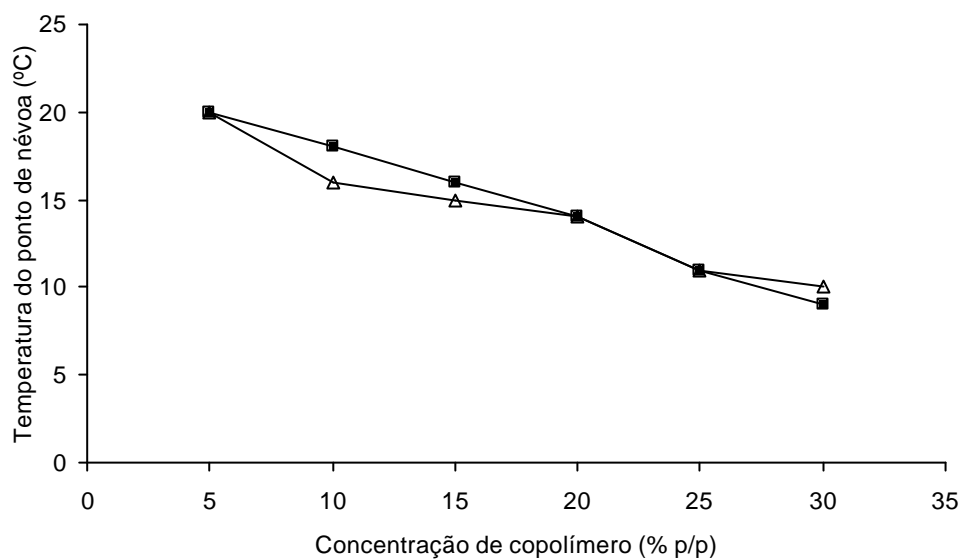


Figura 1 – Influência das concentrações dos copolímeros L 31 (□) e PE 61 (△) na determinação da temperatura do ponto de névoa, em meio com sais de fosfato de potássio 15 mM em pH 7.

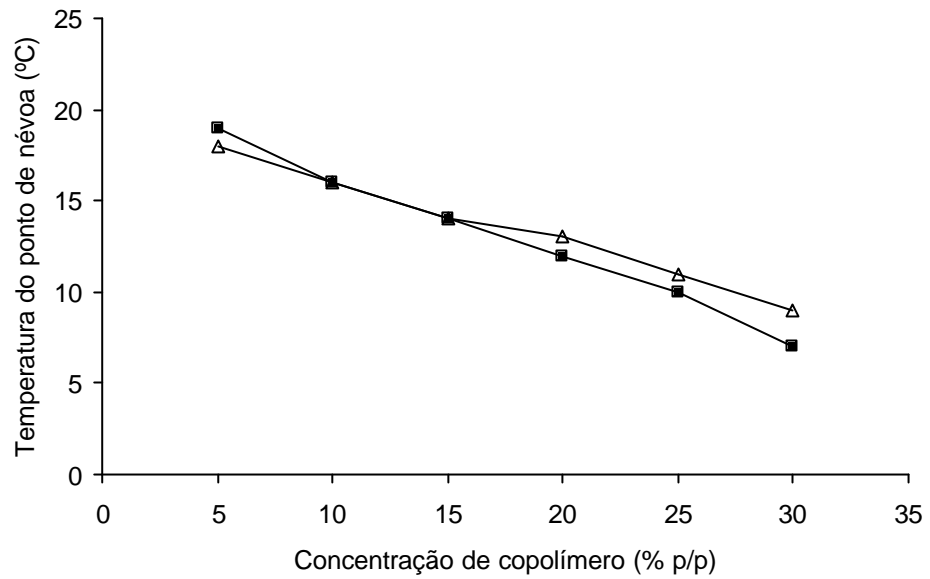


Figura 2 – Influência das concentrações dos copolímeros L 31 (■) e PE 61 (△) na determinação da temperatura do ponto de névoa, em meio com sais de fosfato de potássio 45 mM em pH 7.

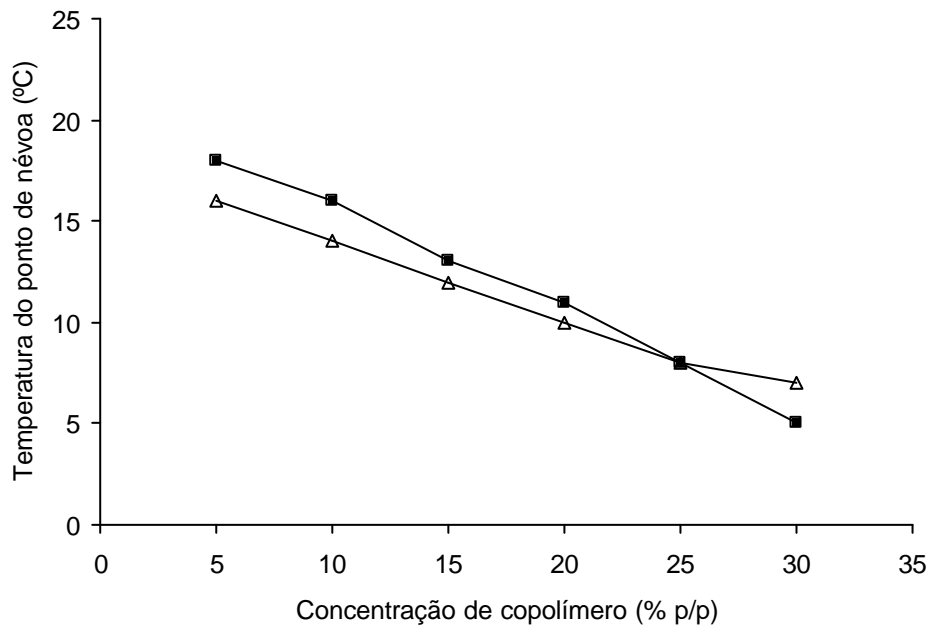


Figura 3 – Influência das concentrações dos copolímeros L 31 (■) e PE 61 (△) na determinação da temperatura do ponto de névoa, em meio com sais de fosfato de potássio 100 mM em pH 7.

O ponto de névoa é atribuído ao aumento do tamanho dos agregados dos polímeros, levando à separação de fases, onde uma fase é rica em polímero e a outra rica em água. Essa ocorrência é reflexo do balanço entre as interações polímero-polímero e polímero-água. Para explicar este fenômeno assume-se que ocorre uma mudança conformacional nos segmentos EO a altas temperaturas (KARLSTRÖM, 1985). A diminuição da conformação polar diminui a solvatação do polímero levando à predominância de interações polímero-polímero e à separação de fases (SILVA & LOH, 1998).

RABELO et al (2004) realizando a determinação das temperaturas de ponto de névoa para estudo da partição da enzima bromelina em SAB formados com copolímeros triblocos EO-PO-EO, constataram que quando a concentração de copolímero variou de 5 para 30% (p/p), a temperatura do ponto de névoa mudou de 32 °C para 18 °C, respectivamente, para sistemas formados por copolímero com 10% de EO e massa molar média de 1100 g/mol e solução de sais de fosfato de potássio 15 mM em pH 6.

Para os copolímeros L 35 e L, cujos teores de EO são 50 e 40% (p/p), respectivamente, as temperaturas do ponto de névoa não seguiram a mesma tendência dos copolímeros L 31 e PE 61, ou seja, não apresentaram uma tendência de diminuição em função do aumento da concentração de copolímeros (Figuras 4, 5 e 6). Observou-se que, para estes copolímeros, as temperaturas do ponto de névoa foram mais elevadas em comparação aos copolímeros L 31 e PE 61, entretanto apresentaram uma tendência de linearidade com o acréscimo de copolímero. Conforme pode ser observado na Figura 4, as temperaturas do ponto de névoa para sistemas formados por copolímero L e solução de sais de fosfato de potássio 15 mM foram de 58 °C e 60 °C para as concentrações de 5 e 30% (p/p) de copolímero, respectivamente.

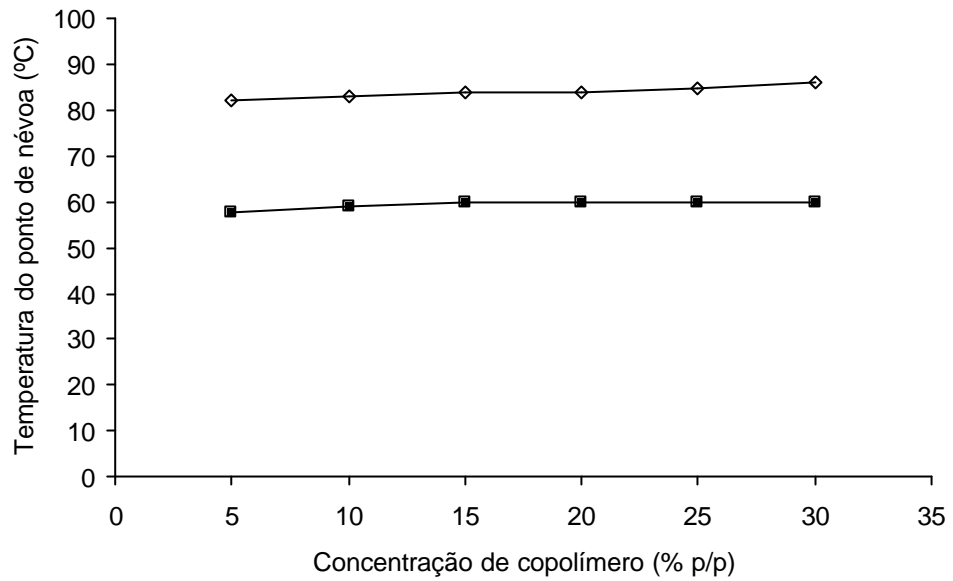


Figura 4 – Influência das concentrações dos copolímeros L 35 (◇) e L 1 (■) na determinação da temperatura do ponto de névoa, em meio com sais de fosfato de potássio 15 mM em pH 7.

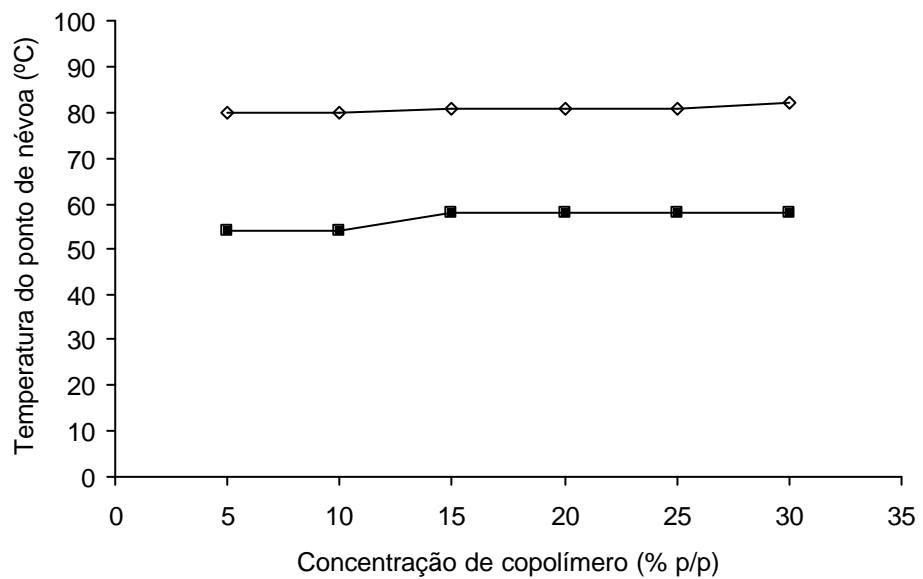


Figura 5 – Influência das concentrações dos copolímeros L 35 (◇) e L 1 (■) na determinação da temperatura do ponto de névoa, em meio com sais de fosfato de potássio 45 mM em pH 7.

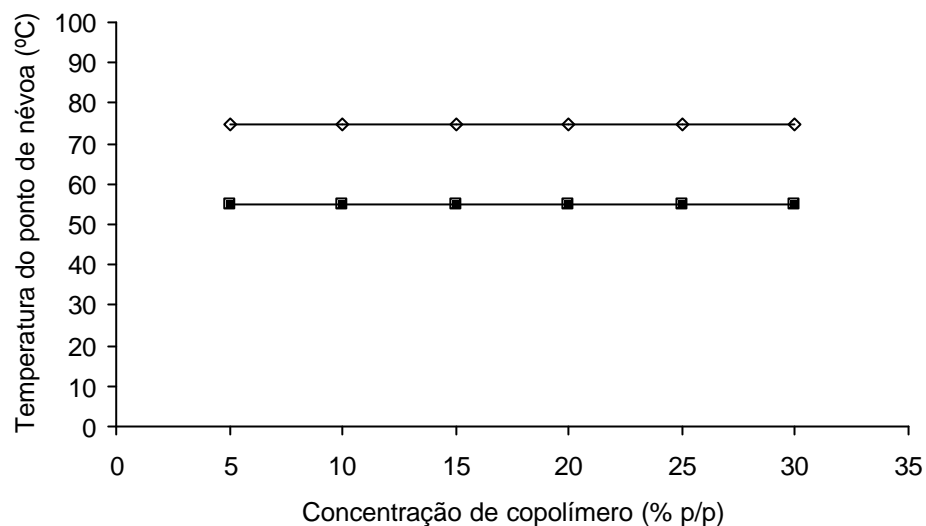


Figura 6 – Influência das concentrações dos copolímeros L 35 (?) e L (1) na determinação da temperatura do ponto de névoa, em meio com sais de fosfato de potássio 100 mM em pH 7.

Os blocos PO são hidrofóbicos e os blocos EO são hidrofílicos, portanto, os copolímeros com alta concentração de EO são mais hidrofílicos, dissolvendo-se mais facilmente na água. Isto é provavelmente o resultado do grau de ligações de hidrogênio entre as moléculas de copolímeros. No entanto, a altas temperaturas a água não é um bom solvente para os copolímeros em comparação à baixas temperaturas (RABELO et al, 2004).

3.1.2 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE SAIS NA TEMPERATURA DO PONTO DE NÉVOA

Os sais apresentam forte efeito sobre o ponto de névoa dos copolímeros EO-PO-EO. A adição de eletrólitos, contendo cátions ou ânions de diferentes tamanhos e polaridades, resulta em aumento ou em uma diminuição da temperatura do ponto de névoa (ALEXANDRIDIS & HATTON, 1995). O aumento da temperatura do ponto névoa representa o efeito *salting in*,

enquanto que a diminuição representa o efeito *salting out* (SCHOTT & HAN, 1976).

Aditivos conhecidos como hidrotrópicos, têm a capacidade de aumentar a temperatura do ponto de névoa de soluções copoliméricas, devido a sua capacidade de aumentar a solubilidade do copolímero (BRESLOW, 1994).

A diminuição da temperatura do ponto de névoa causada pela adição de eletrólitos é atribuída à habilidade de vários íons em modificar a estrutura da água e competir com o copolímero pela mesma, influenciando a hidratação dos blocos de EO e de PO (XIULI et al, 2004).

O ponto de névoa do copolímero F 68 foi diminuído em 50 °C quando KF 1M foi adicionado à solução aquosa de copolímero (BAHADUR et al, 1992).

JAIN et al (1999) observaram que as temperaturas do ponto de névoa para o copolímero P 65 a 1% (p/v) sofreram um decréscimo linear à medida que se aumentou a concentração de NaCl de 0 até 2 M.

Os sais de fosfato são hidrofílicos e apresentam efeito *salting out* (RABELO et al, 2004).

A temperatura do ponto de névoa de soluções contendo 100 mM de sais de fosfato de potássio é menor que aquelas de soluções contendo 45 e 15 mM. Como pode ser observado na Figura 7, as temperaturas do ponto de névoa de sistemas contendo 5% (p/p) dos copolímeros L 31 com 10% de EO (p/p), massa molar média de 2000 g/mol e PE 61 com 10% de EO e massa molar média 1925 g/mol e solução de sais de fosfato de potássio nas concentrações de 15, 45 e 100 mM, foram 20, 19 e 18 °C e 20, 18 e 16 °C, respectivamente. As temperaturas relativas aos copolímeros L 31, PE 61, L 35 e L, em várias concentrações, seguiram a mesma tendência, conforme pode ser observado nas Figuras 8 a 18.

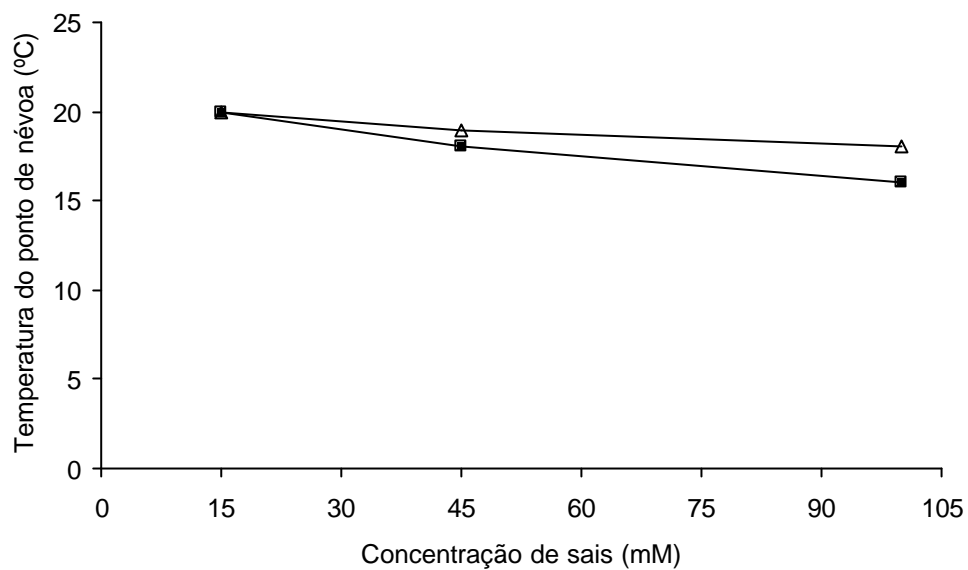


Figura 7 – Influência das concentrações de sais de fosfato de potássio na determinação da temperatura do ponto de névoa para os copolímeros L 31 (△) e PE 61 (■), em meio com 5% (p/p) de copolímero, em pH 7.

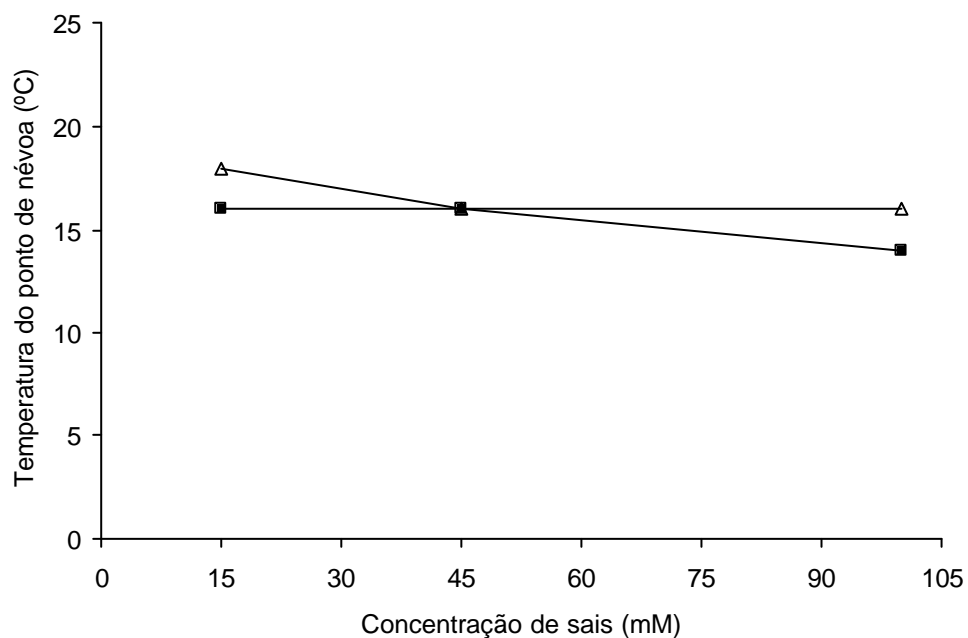


Figura 8 – Influência das concentrações de sais de fosfato de potássio na determinação da temperatura do ponto de névoa para os copolímeros L 31 (△) e PE 61 (■), em meio com 10% (p/p) de copolímero, em pH 7.

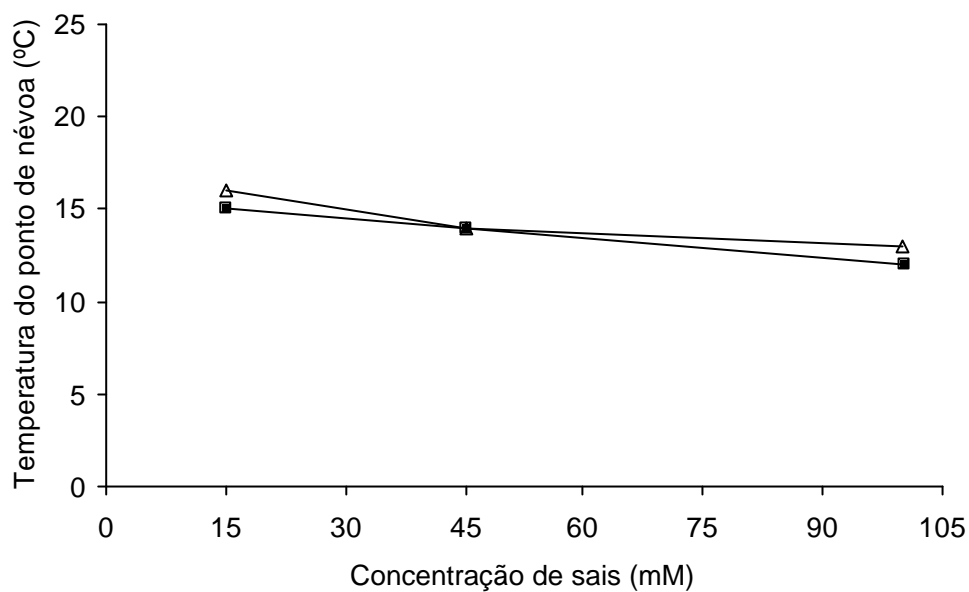


Figura 9 – Influência das concentrações de sais de fosfato de potássio na determinação da temperatura do ponto de névoa para os copolímeros L 31 (Δ) e PE 61 (■), em meio com 15% (p/p) de copolímero, em pH 7.

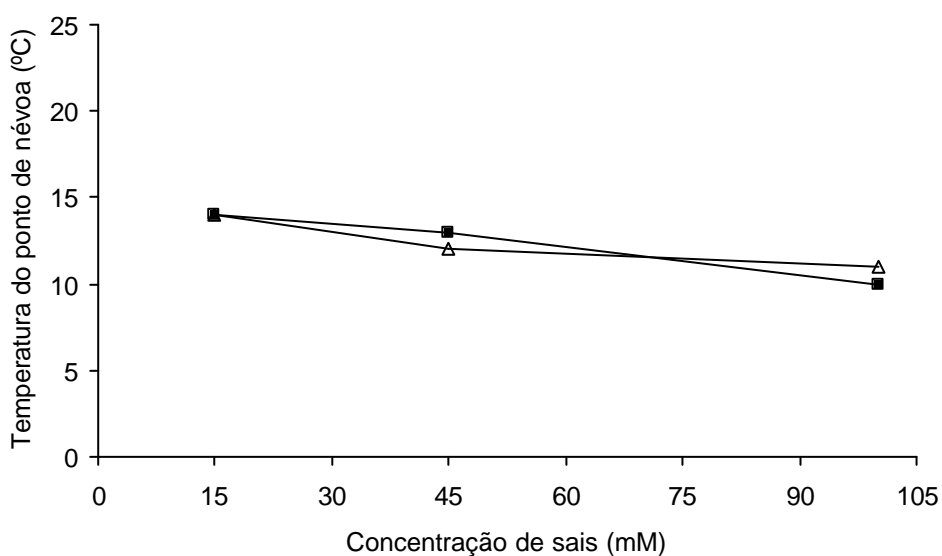


Figura 10 – Influência das concentrações de sais de fosfato de potássio na determinação da temperatura do ponto de névoa para os copolímeros L 31 (Δ) e PE 61 (■), em meio com 20% (p/p) de copolímero, em pH 7.

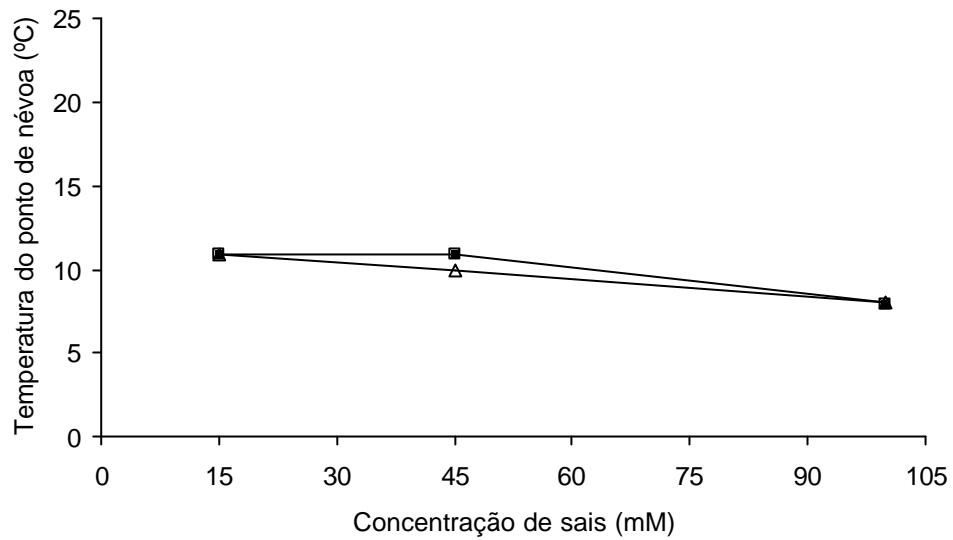


Figura 11 – Influência das concentrações de sais de fosfato de potássio na determinação da temperatura do ponto de névoa para os copolímeros L 31 (■) e PE 61 (▲), em meio com 25% (p/p) de copolímero, em pH 7.

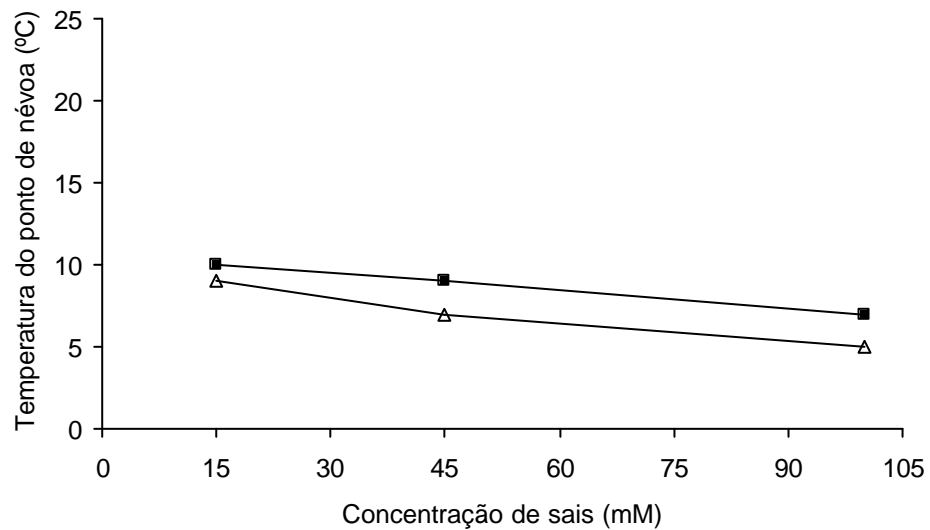


Figura 12 – Influência das concentrações de sais de fosfato de potássio na determinação da temperatura do ponto de névoa para os copolímeros L 31 (■) e PE 61 (▲), em meio com 30% (p/p) de copolímero, em pH 7.

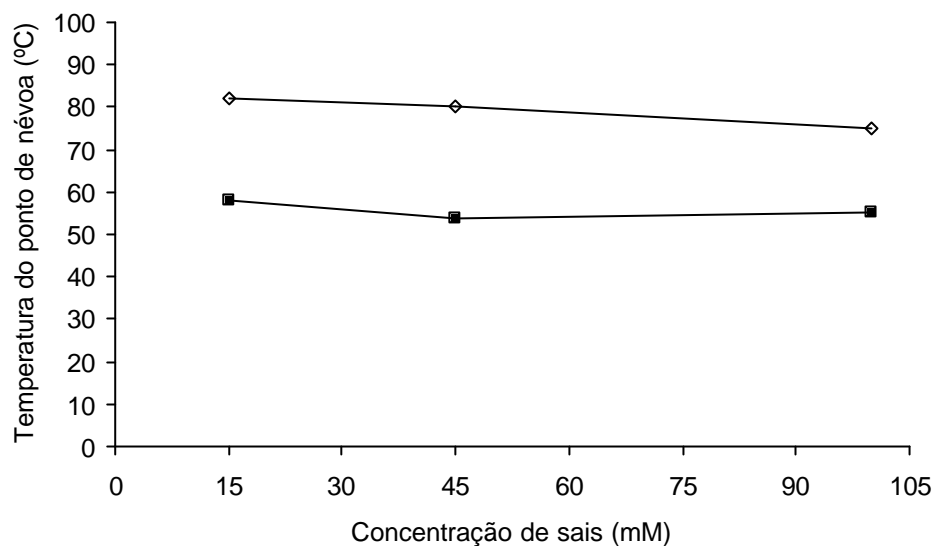


Figura 13 – Influência das concentrações de sais de fosfato de potássio na determinação da temperatura do ponto de névoa para os copolímeros L 35 (?) e L (i), em meio com 5% (p/p) de copolímero, em pH 7.

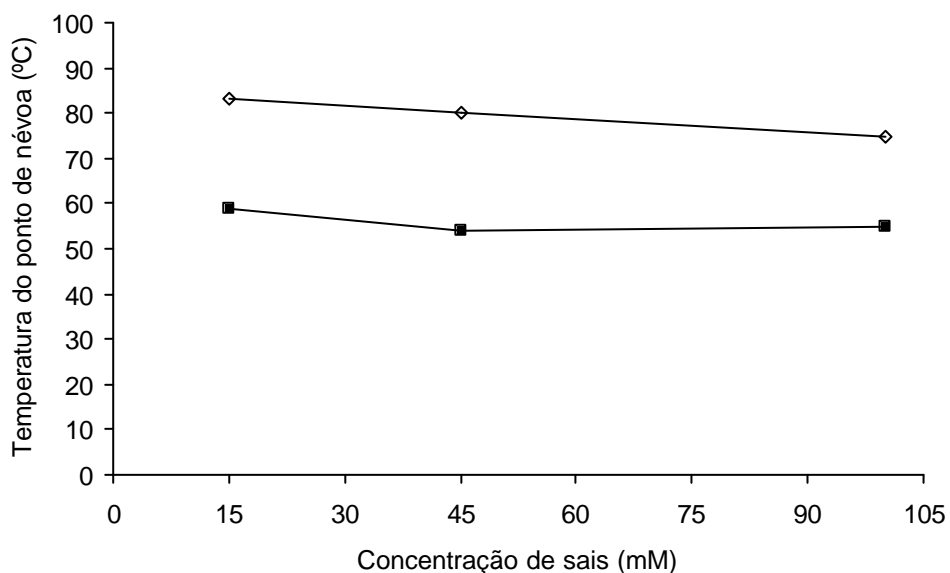


Figura 14 – Influência das concentrações de sais de fosfato de potássio na determinação da temperatura do ponto de névoa para os copolímeros L 35 (?) e L (i), em meio com 10% (p/p) de copolímero, em pH 7.

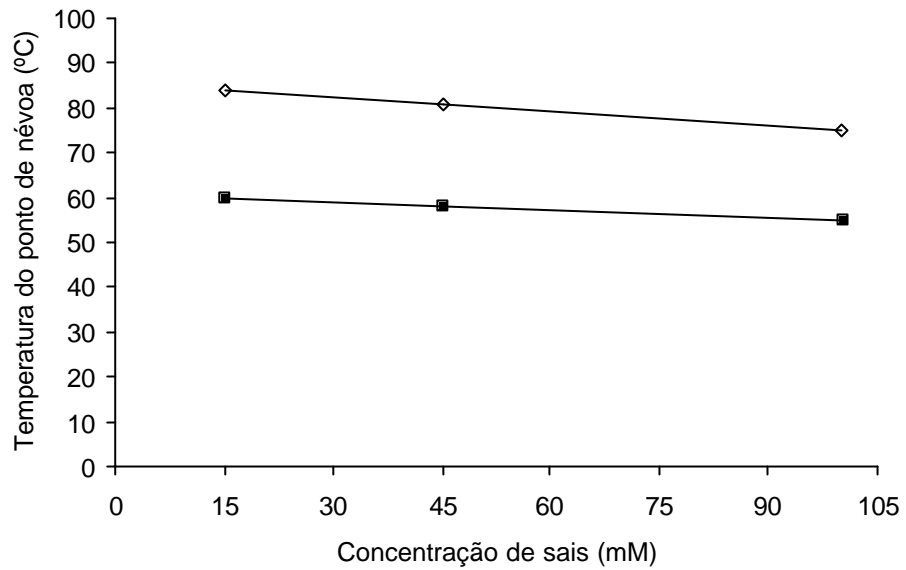


Figura 15 – Influência das concentrações de sais de fosfato de potássio na determinação da temperatura do ponto de névoa para os copolímeros L 35 (?) e L (i), em meio com 15% (p/p) de copolímero, em pH 7.

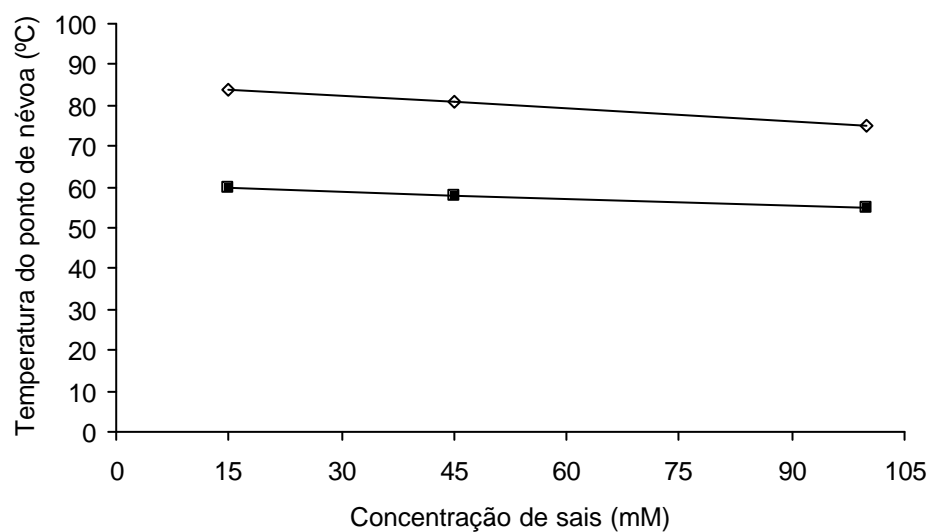


Figura 16 – Influência das concentrações de sais de fosfato de potássio na determinação da temperatura do ponto de névoa para os copolímeros L 35 (?) e L (i), em meio com 20% (p/p) de copolímero, em pH 7.

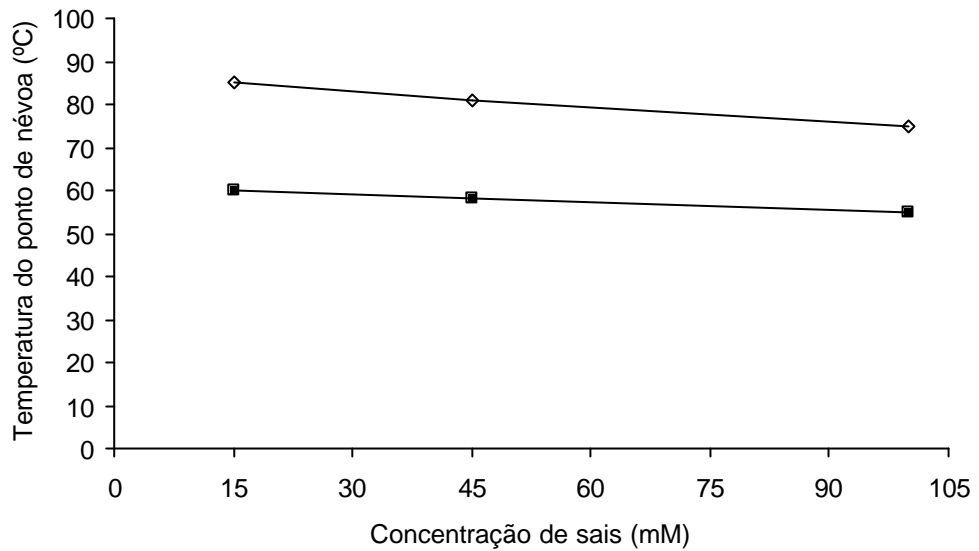


Figura 17 – Influência das concentrações de sais de fosfato de potássio na determinação da temperatura do ponto de névoa para os copolímeros L 35 (?) e L (i), em meio com 25% (p/p) de copolímero, em pH 7.

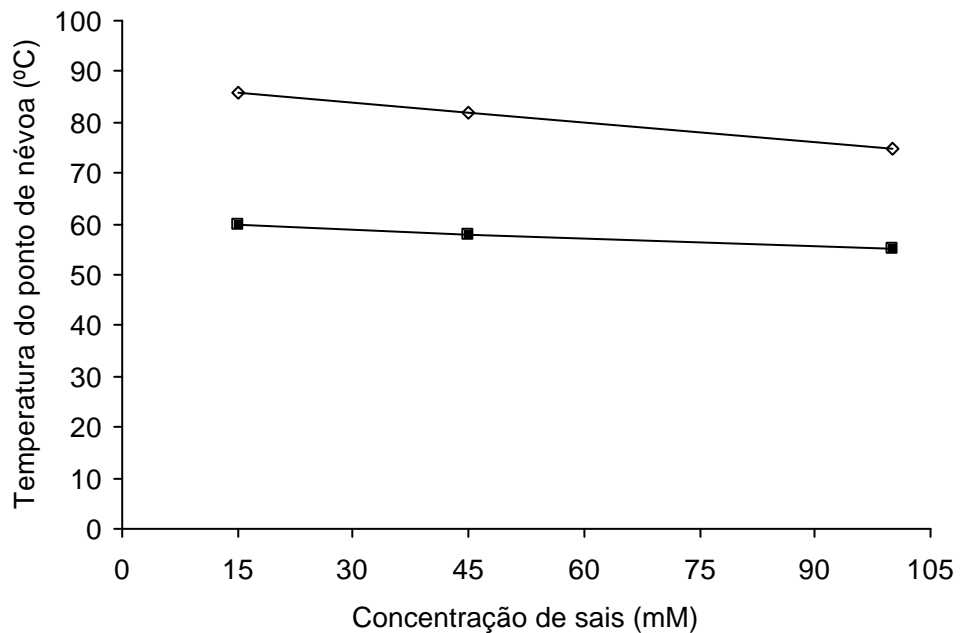


Figura 18 – Influência das concentrações de sais de fosfato de potássio na determinação da temperatura do ponto de névoa para os copolímeros L 35 (?) e L (i), em meio com 30% (p/p) de copolímero, em pH 7.

3.1.3 INFLUÊNCIA DO CONTEÚDO DE EO NA TEMPERATURA DO PONTO DE NÉVOA

Conforme pode ser observado na Figura 19, as temperaturas do ponto de névoa dos copolímeros, em concentrações de 5 até 30% (p/p), tiveram um aumento à medida que se aumentou o conteúdo de EO nos mesmos. Para uma concentração de copolímero de 5%, a temperatura do ponto de névoa foi de 18 °C para o copolímero L 31, que tem 10% de EO (p/p) e massa molar média 2000 g/mol e de 75 °C para o copolímero L 35, que tem 50% de EO (p/p) e massa molar média 1900 g/mol.

O conteúdo de EO influencia a taxa de variação da solubilidade. Ela aumenta à medida que a proporção relativa do bloco EO aumenta e diminui à medida que a massa molar dos copolímeros aumenta para copolímeros com a mesma proporção de composição PO/EO. Provavelmente, este seja o resultado do grau de ligação de hidrogênio entre as moléculas de copolímeros, refletindo-se também na forma física dos copolímeros (líquida para baixa massa molar, baixo conteúdo de EO; sólida para alta massa molar, alto conteúdo de EO) (SCHMOLKA, 1977).

RABELO et al (2004) ao estudar o efeito do conteúdo de EO na temperatura do ponto de névoa, observaram que as temperaturas do ponto de névoa de soluções contendo copolímeros com 50% de EO foram mais altas que as temperaturas das soluções contendo copolímeros com 10% de EO, no caso de copolímeros com massas molares médias similares.

XIULI et al (2004) verificaram que à concentração de 1% (p/p), o ponto de névoa do copolímero tribloco $(EO)_{10}(PO)_{16}(EO)_{10}$ foi 71,5 °C e para o copolímero tribloco $(EO)_1(PO)_{17}(EO)_1$ foi 38 °C. Assim, constata-se que com o aumento do conteúdo de EO, ocorre um aumento da temperatura do ponto de névoa para copolímeros com massas molares similares.

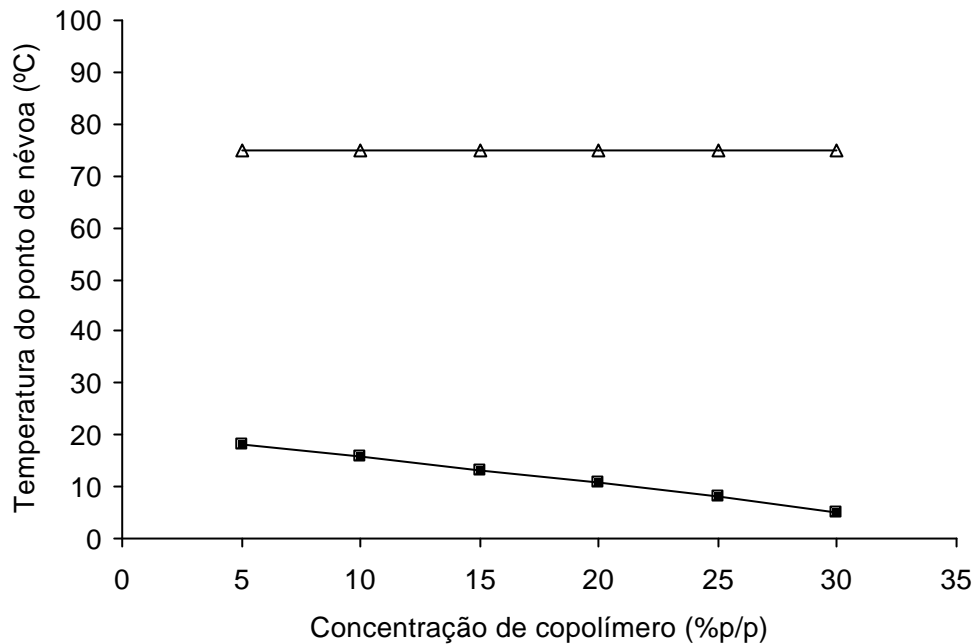


Figura 19 – Influência da concentração de EO na determinação da temperatura do ponto de névoa para os copolímeros L 31 (Δ) e L 35 (■) em meio com sais de fosfato de potássio 100 mM em pH 7.

3.2 PARTIÇÃO DE α -LACTOALBUMINA E β -LACTOGLOBULINA

Os resultados apresentados para a partição da α -la e β -lg referem-se aos copolímeros L 31 e PE 61. Ambos contêm 10 % de EO, porém, apresentam viscosidades diferentes, 285 cps para o PE 61 e 325 cps para o L 31. Os demais copolímeros não foram utilizados, por apresentarem temperaturas do ponto de névoa mais elevadas, o que poderia causar uma desnaturação das proteínas, principalmente para α -la que é susceptível à desnaturação por calor a 65,2 °C em pH 6 (MORR & HA, 1993).

Na Figura 20 é apresentado um cromatograma de uma solução aquosa de isolado protéico de soro (20 mg de WPI/mL de solução) utilizada nos experimentos, onde observa-se a presença de dois picos para β -lg. Portanto, a técnica utilizada possibilita a detecção dos monômeros β -lg A e β -lg B, que formam o dímero de β -lg (CAYOT & LORIENT, 1997).

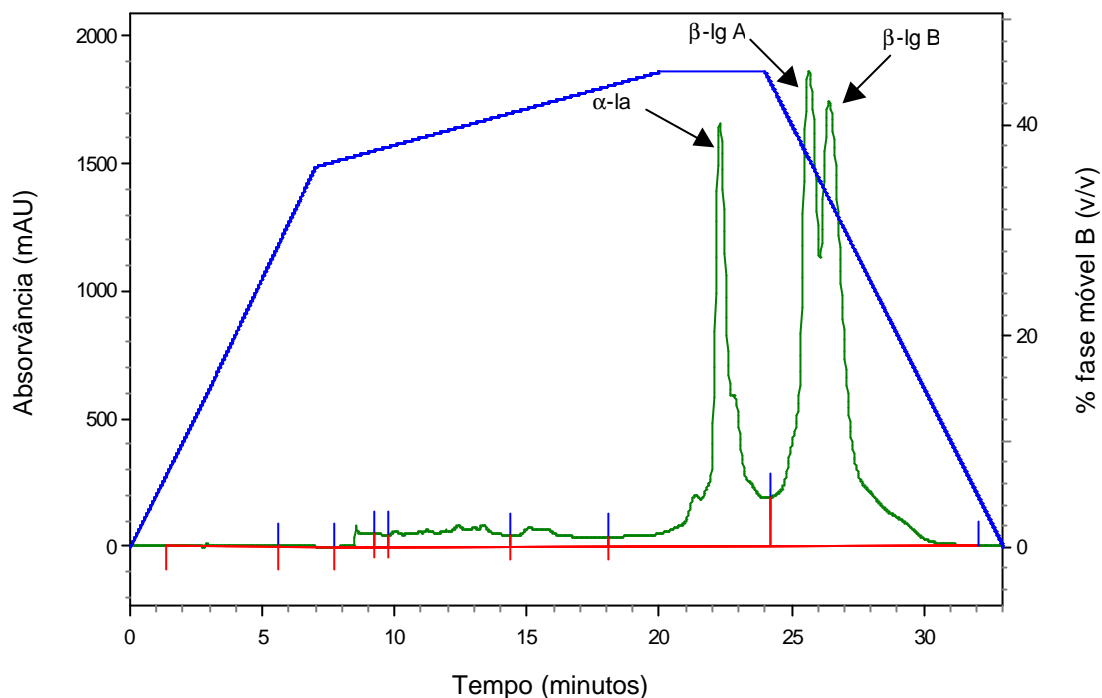


Figura 20 – Cromatograma da solução de isolado protéico de soro.

Nas Figuras 21 e 22 são apresentados os cromatogramas para os padrões de α -la e β -lg. Observa-se 1 pico para a α -la e 2 picos para a β -lg.

As curvas analíticas para α -la e β -lg são apresentadas nas Figuras 23 e 24. Observa-se a linearidade na faixa de concentração estabelecida.

Na Figura 25 é apresentado o cromatograma da fase inferior de um SAB formado com 25% (p/p) de copolímero L 31, 1 g de solução de WPI a 20 mg/mL e solução de sais de fosfato de potássio 45 mM em pH 7, após repouso de 16 horas a 20 °C e diluição de 1:10 com solução alcoólica a 20% (v/v).

Na figura 26 é apresentado o cromatograma da fase superior de um SAB formado com 10 % (p/p) de copolímero PE 61, 1 g de solução de WPI a 20 mg/mL e solução de sais de fosfato de potássio 15 mM em pH 7, após repouso de 16 horas a 26° C.

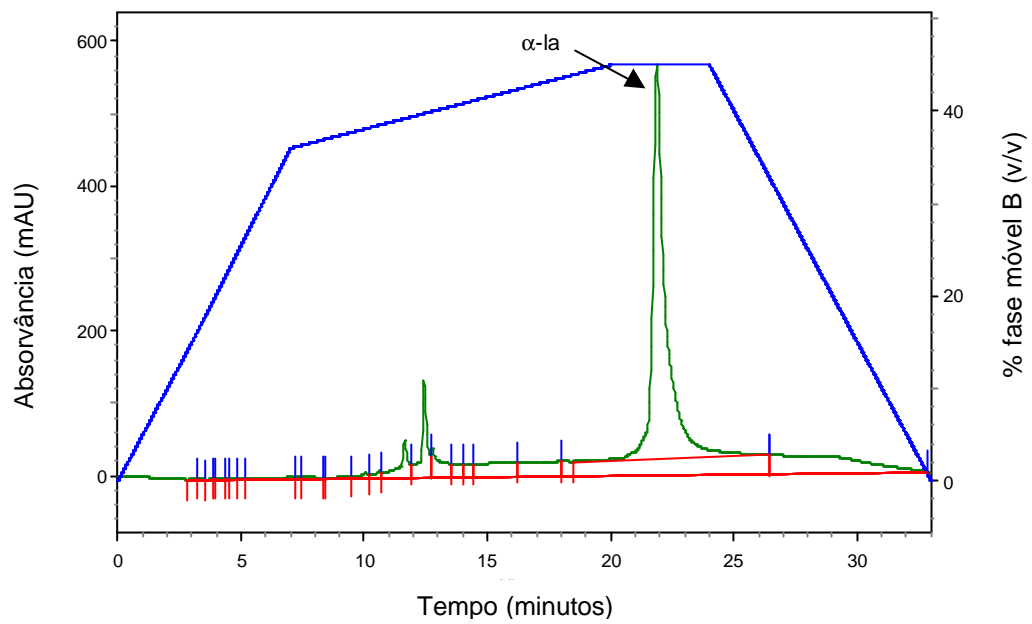


Figura 21 – Cromatograma para α -la padrão.

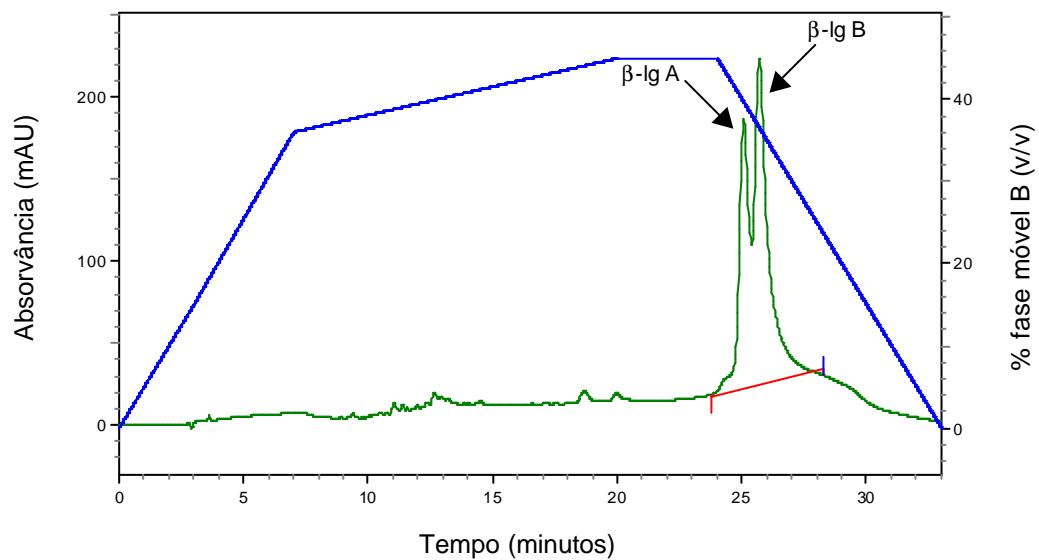


Figura 22 – Cromatograma para β -lg padrão.

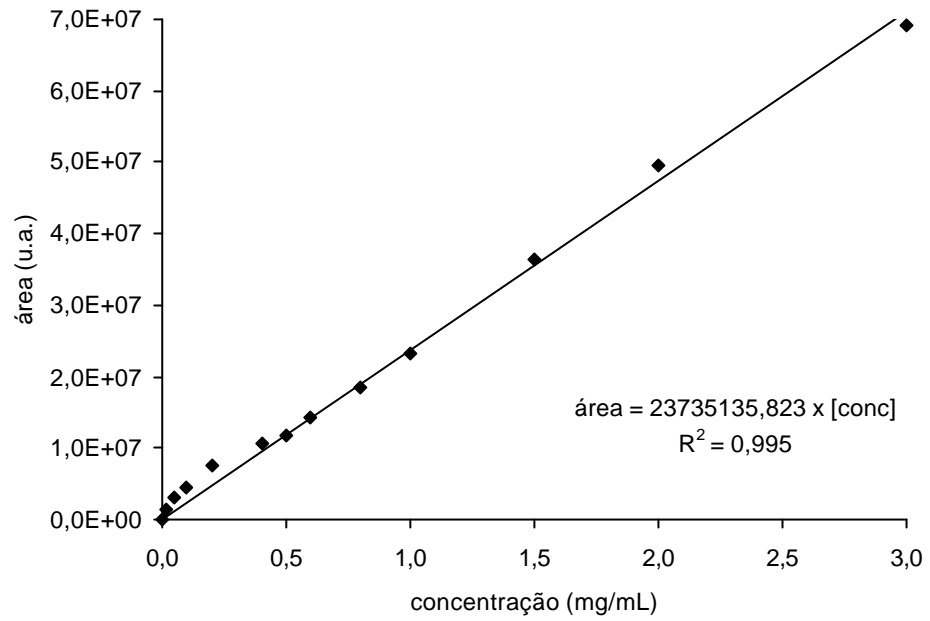


Figura 23 – Curva analítica para α -la.

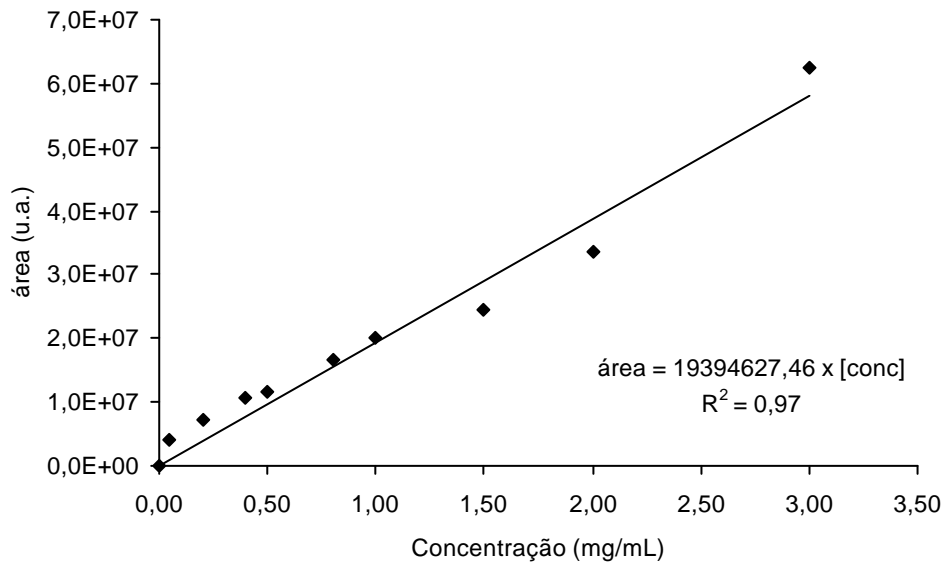


Figura 24 – Curva analítica para β -Ig.

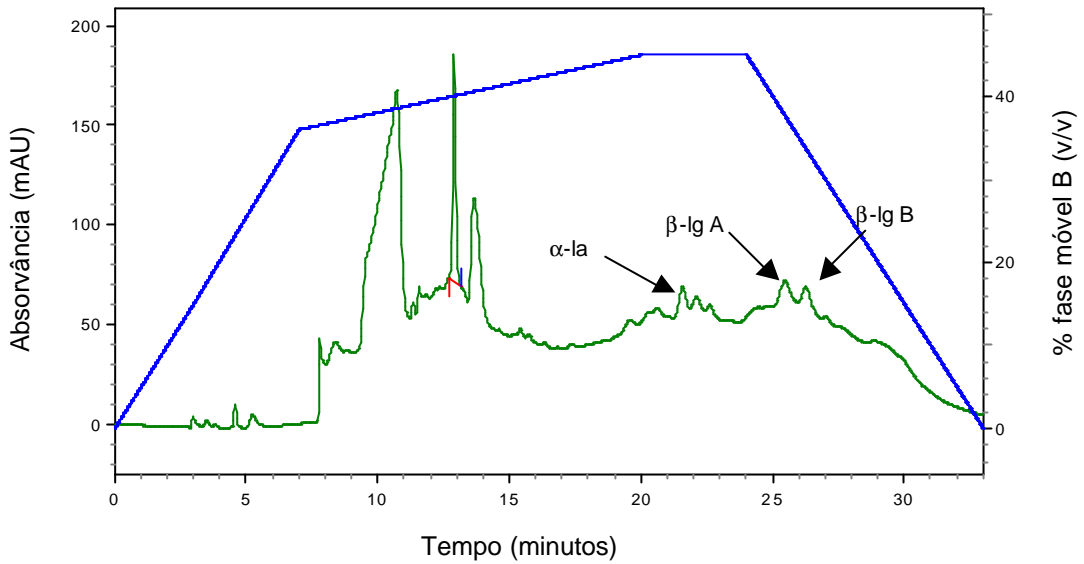


Figura 25 – Cromatograma da fase inferior de um SAB formado com 25% (p/p) de copolímero L 31, solução de WPI a 20 mg/mL e solução de sais de fosfato de potássio 45 mM em pH 7.

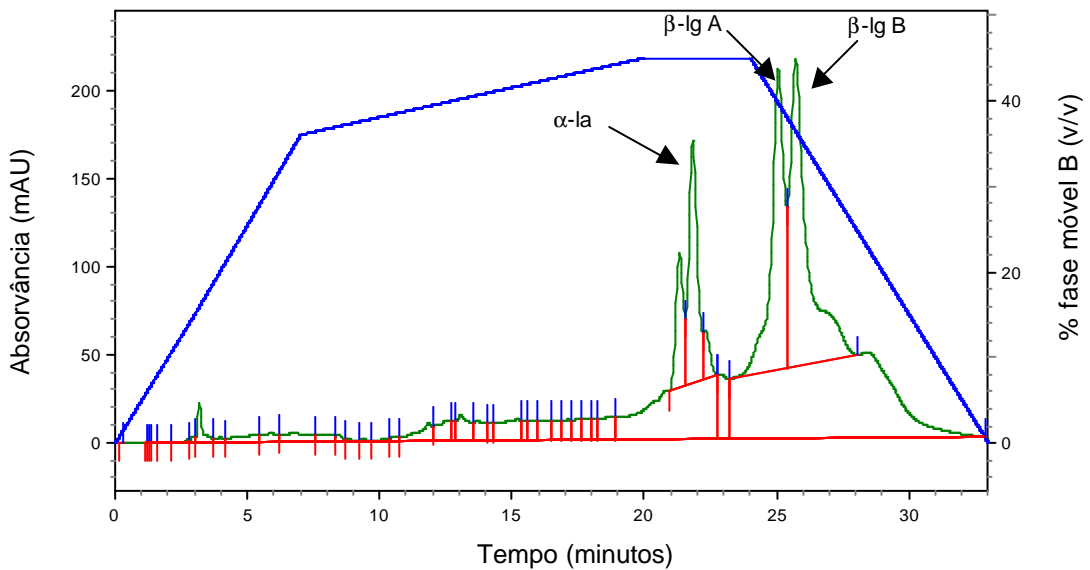


Figura 26 – Cromatograma da fase superior de um SAB formado com 10% (p/p) de copolímero PE 61, 1 g de solução de WPI a 20 mg/mL e solução de sais de fosfato de potássio 15 mM em pH 7.

Nas análises por HPLC-RP, para detecção das proteínas α -la e β -lg foi utilizado o comprimento de onda de 210 nm, onde a absorção depende exclusivamente da presença de ligações peptídicas. Assim, se houve a interferência da presença do copolímero na análise, esta não poderia ser percebida diretamente nesta medida.

Os surfactantes interferem na detecção feita com detector do tipo UV, sobrepondo o sinal do soluto (PALEOLOGOS et al, 2005), podendo esse problema ser resolvido pela diluição da fase rica em surfactante com um solvente orgânico antes da amostra ser injetada na coluna cromatográfica (PALEOLOGOS et al, 2003).

Caso sejam detectados dois picos para a α -la, é possível que a técnica utilizada possa ser capaz de separar variantes genéticas da proteína.

Este fato seria de bastante relevância no que se refere a processos de separação e aplicações das variantes da α -la.

A α -la é um proteína rica em triptofano, sendo neste caso ideal para aplicações em alimentos infantis (BRAMAUD et al, 1997). Também exerce importante papel na síntese de lactose, participando como catalisadora desta reação (FOX & McSWEENEY, 1998).

3.3 SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS

A seleção do melhor SAB foi feita avaliando-se os coeficientes de partição das proteínas. O sistema considerado mais eficaz na separação das proteínas α -la e β -lg foi aquele que apresentou o maior coeficiente de partição para uma proteína e um menor coeficiente de partição para a outra proteína, possibilitando assim, uma melhor separação entre as duas nas fases do sistema. Na Tabela 2 e na Figura 27 podem ser observados os melhores resultados obtidos na separação de ambas as proteínas com os respectivos valores de k para os sistemas formados com os copolímeros L 31 e PE 61. Os cromatogramas referentes a esses resultados estão representados nas Figuras 28 e 29.

Para os SAB formados a partir do copolímero L 31, a melhor separação ocorreu para os sistemas formados com 30% (p/p) de copolímero e solução de

sais de fosfato de potássio 45 mM em pH 7, a 17 °C. Neste caso, para a α -la foi encontrado um valor de k igual a 157,73, o que representa uma concentração de 99,37% da proteína na fase superior e para a β -lg, um valor de k igual a 1,05, o que representa uma concentração de 51,18% da proteína na fase superior ou 48,82% na fase inferior.

No caso dos SAB formados a partir do copolímero PE 61, a melhor separação ocorreu para o sistemas formados com 20% (p/p) de copolímero e solução de sais de fosfato de potássio 100 mM em pH 7, a 20 °C. Neste caso, para a α -la foi encontrado um valor de k igual a 79,65, o que representa uma concentração de 98,76% da proteína na fase superior e para a β -lg, um valor de k igual a 0,98, o que representa uma concentração de 49,45% da proteína na fase superior ou 50,55% na fase inferior.

Tabela 2 – Percentual de proteínas na fase superior (FS) dos sistemas constituídos de 30% (p/p) de copolímero L 31 e solução de sais de fosfato de potássio 45 mM em pH 7, a 17 °C, e de 20% (p/p) de copolímero PE 61 e solução de sais de fosfato de potássio 100 mM em pH 7, a 20 °C.

Copolímero	Proteínas	Percentual de proteínas (FS)	Coefficiente de partição (k)
L 31	α -lactoalbumina	99,37 \pm 0,10	157,73
	β -lactoglobulina	51,18 \pm 1,97	1,05
PE 61	α -lactoalbumina	98,76 \pm 0,20	79,65
	β -lactoglobulina	49,45 \pm 0,18	0,98

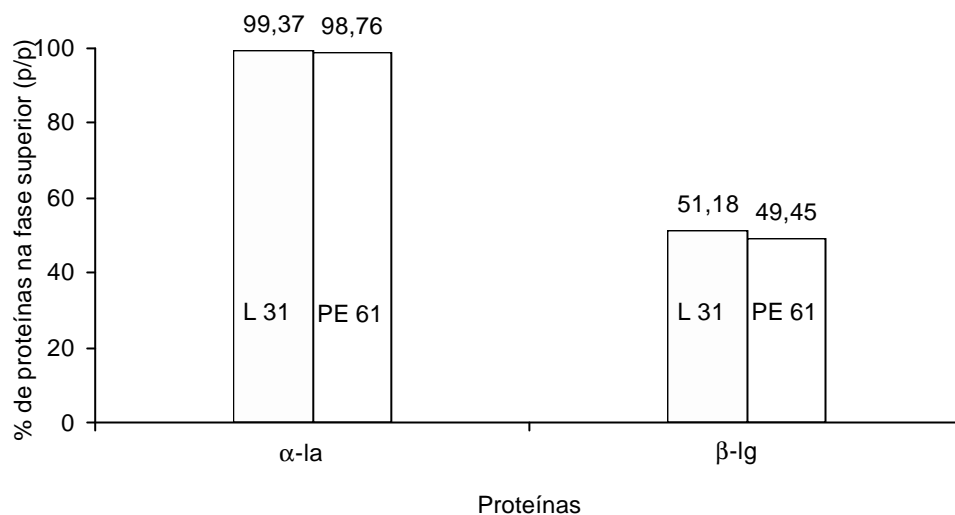


Figura 27 - Percentual de proteínas na fase superior dos sistemas constituídos de 30% (p/p) de copolímero L 31 e solução de sais de fosfato 45 mM em pH 7, a 17 °C, e de 20% (p/p) de copolímero PE 61 e solução de sais de fosfato 100 mM em pH 7, a 20 °C.

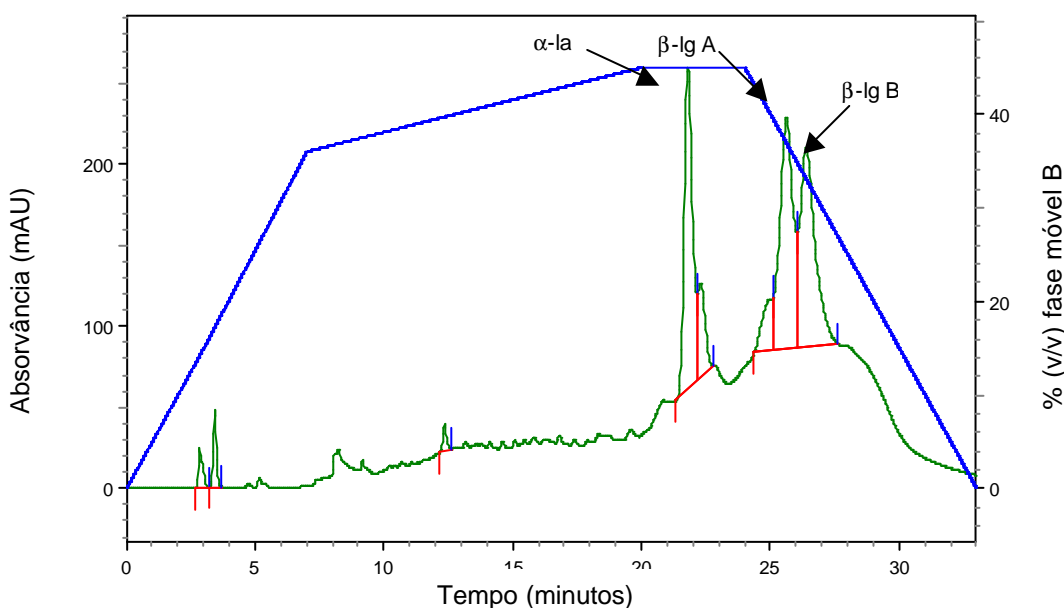


Figura 28 – Cromatograma da fase superior de um sistema formado por 30% (p/p) de copolímero L 31 e solução de sais de fosfato de potássio 45 mM em pH 7, a 17 °C.

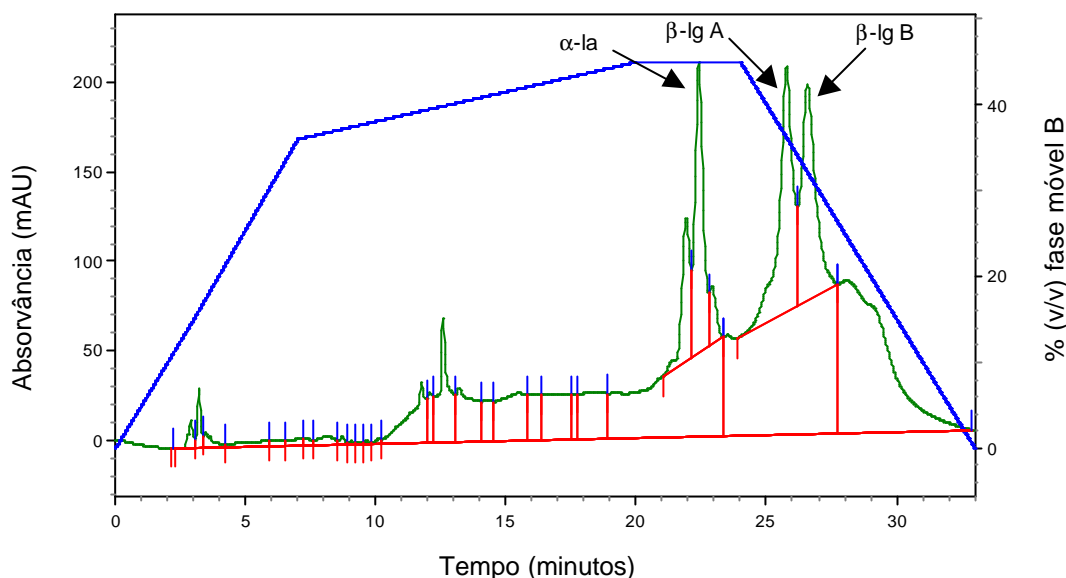


Figura 29 – Cromatograma da fase superior de um sistema formado por 20% (p/p) de copolímero PE 61 e solução de sais de fosfato de potássio 100 mM em pH 7, a 20 °C.

Um ponto importante observado durante as análises das fases dos SAB formados pelos dois copolímeros (L 31 e PE 61) foi serem detectados dois picos para a α -la, os quais foram evidenciados à medida que se aumentou a concentração de copolímero no sistema. Nas figuras 30 a 35 podem ser observados os dois picos detectados para a α -la nas fases superiores de sistemas compostos por copolímero PE 61 na faixa de 5 até 30% (p/p), solução de sais de fosfato de potássio 15 mM em pH 7 e solução de WPI. Para comprovação de tal fato, foram feitas análises de SAB formados a partir de α -la padrão, onde se observou o mesmo comportamento nos cromatogramas dos sistemas formados com WPI para os sistemas compostos pelos dois copolímeros (L 31 e PE 61). Nas Figuras 36 a 41 podem ser observados os dois picos detectados para a α -la (padrão) nas fases superiores de sistemas compostos por copolímero PE 61 na faixa de 5 até 30% (p/p), solução de sais de fosfato de potássio 15 mM em pH 7 e solução de WPI. Uma possível explicação para este comportamento, é que os copolímeros utilizados possam influenciar na separação de variantes genéticas da α -la. Variantes A, B e C de

α -la foram observadas, e a sua heterogeneidade é resultado de um resíduo de aminoácido diferente em cada variante (KILARA & HARWALKAR, 1996). As variantes genéticas A e B diferem entre si devido a um resíduo de aminoácido. O resíduo na posição 10 é glicina para a variante A e arginina para a variante B (CAYOT & LORIENT, 1997).

Nas análises das fases inferiores, foi encontrada bastante dificuldade nas análises por HPLC-RP, devido à viscosidade e à sua baixa solubilidade em água à temperatura ambiente. A medida adotada foi a utilização de acetonitrila e álcool etílico como solvente para diluição das fases, porém, não foi alcançado resultado satisfatório. Os picos das proteínas α -la e β -lg não apresentaram resolução adequada para uma quantificação correta de suas concentrações.

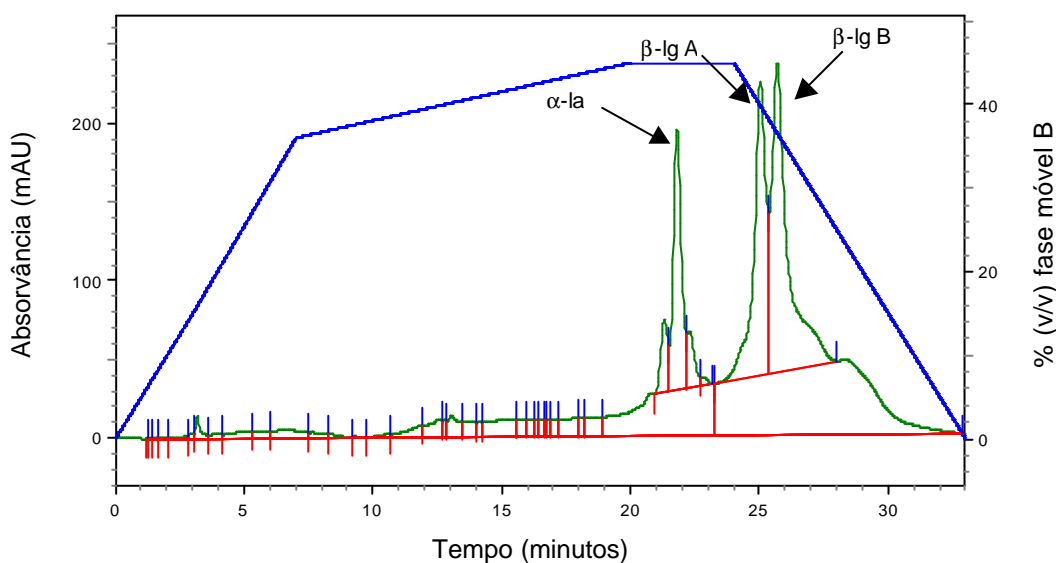


Figura 30 – Cromatograma da fase superior de um sistema formado a partir de WPI, 5% (p/p) de copolímero PE 61 e solução de sais de fosfato de potássio 15 mM em pH 7.

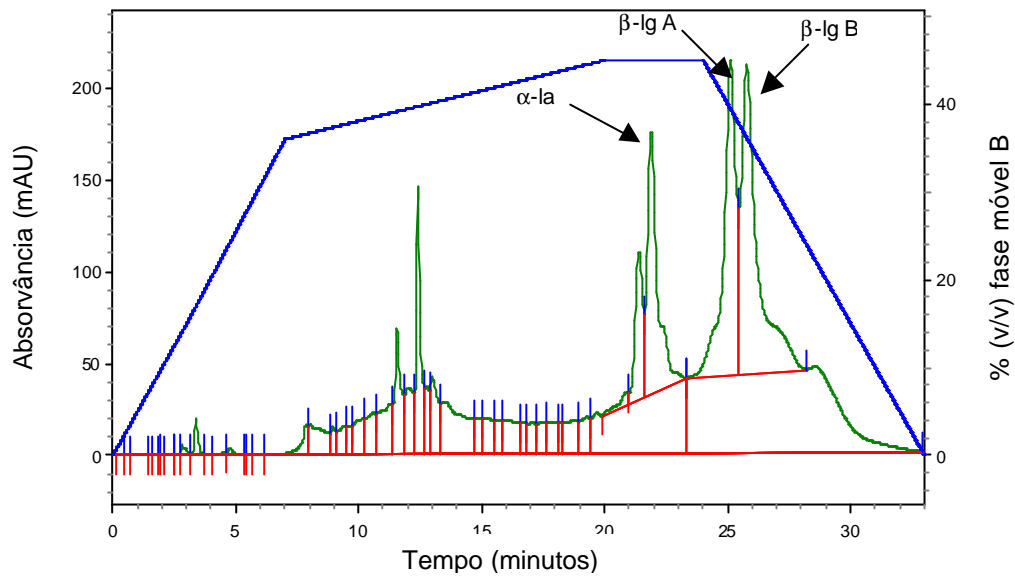


Figura 31 – Cromatograma da fase superior de um sistema formado a partir de WPI, 10% (p/p) de copolímero PE 61 e solução de sais de fosfato de potássio 15 mM em pH 7.

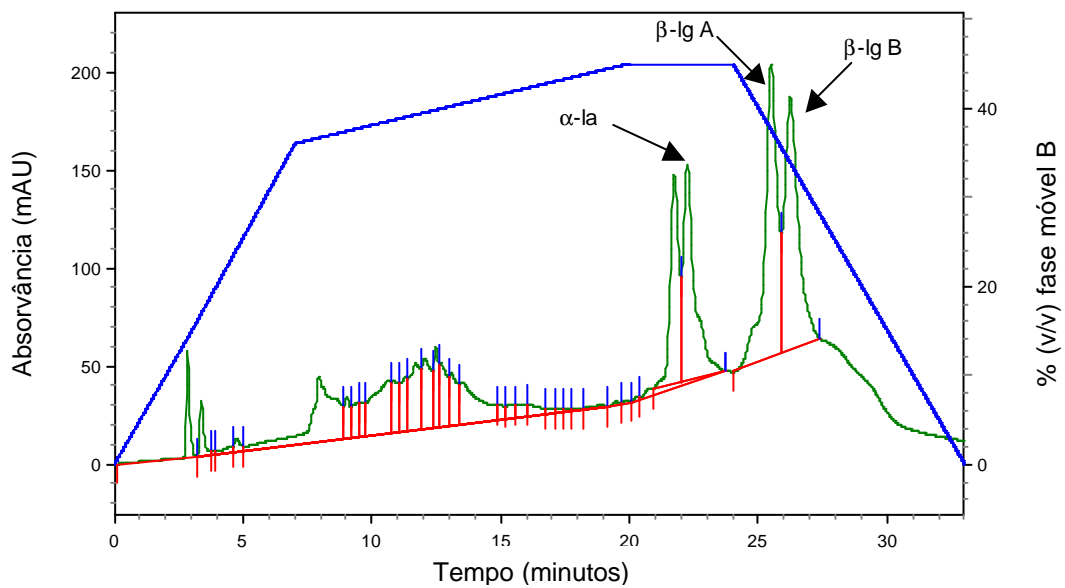


Figura 32 – Cromatograma da fase superior de um sistema formado a partir de WPI, 15% (p/p) de copolímero PE 61 e solução de sais de fosfato de potássio 15 mM em pH 7.

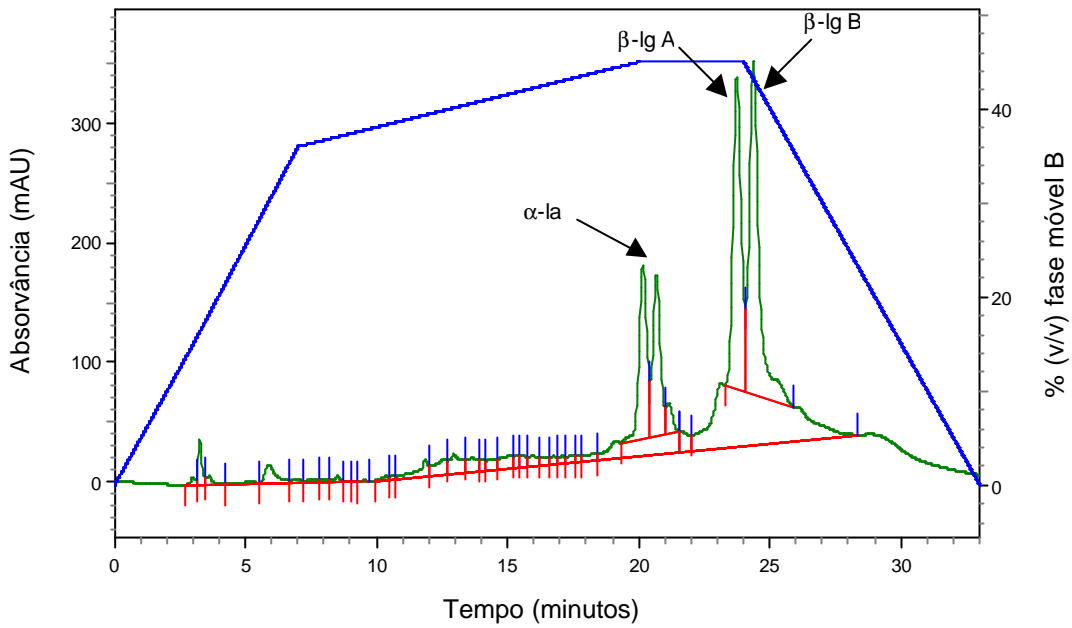


Figura 33 – Cromatograma da fase superior de um sistema formado a partir de WPI, 20% (p/p) de copolímero PE 61 e solução de sais de fosfato de potássio 15 mM em pH 7.

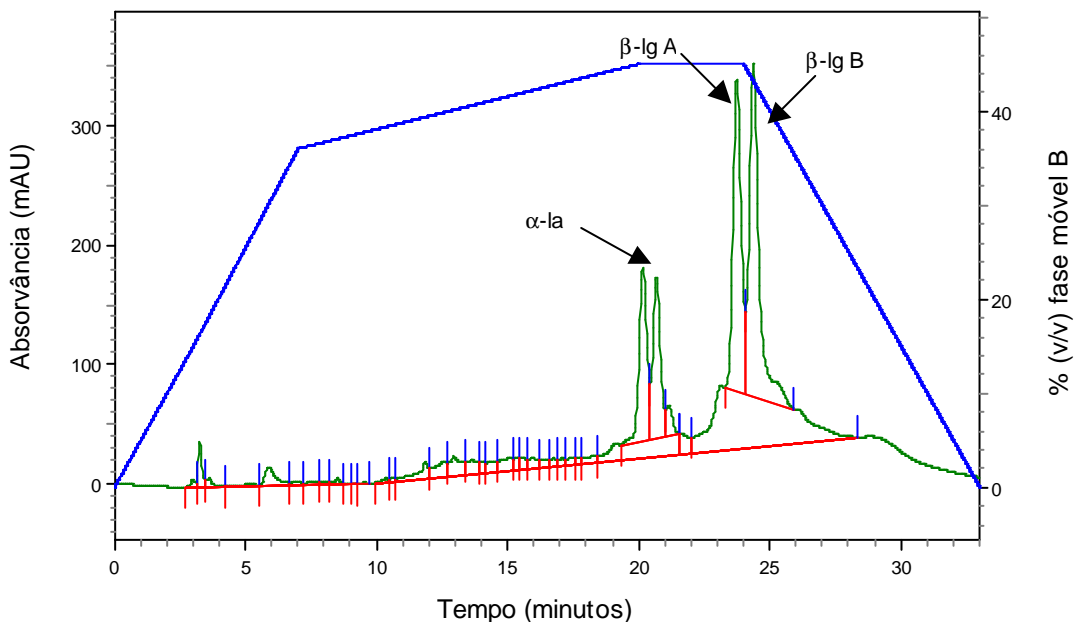


Figura 34 – Cromatograma da fase superior de um sistema formado a partir de WPI, 25% (p/p) de copolímero PE 61 e solução de sais de fosfato de potássio 15 mM em pH 7.

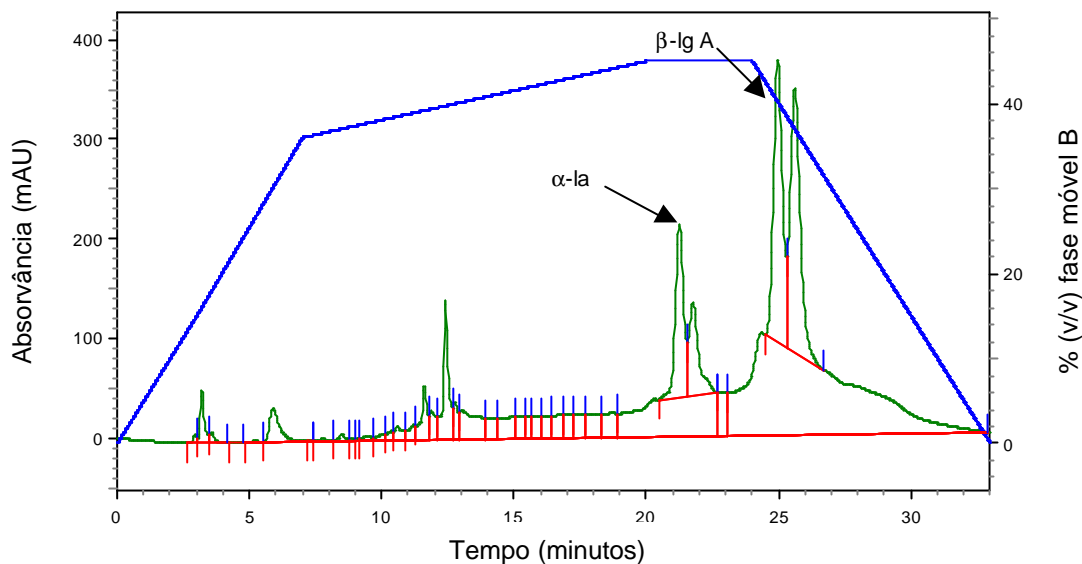


Figura 35 – Cromatograma da fase superior de um sistema formado a partir de WPI, 30% (p/p) de copolímero PE 61 e solução de sais de fosfato de potássio 15 mM em pH 7.

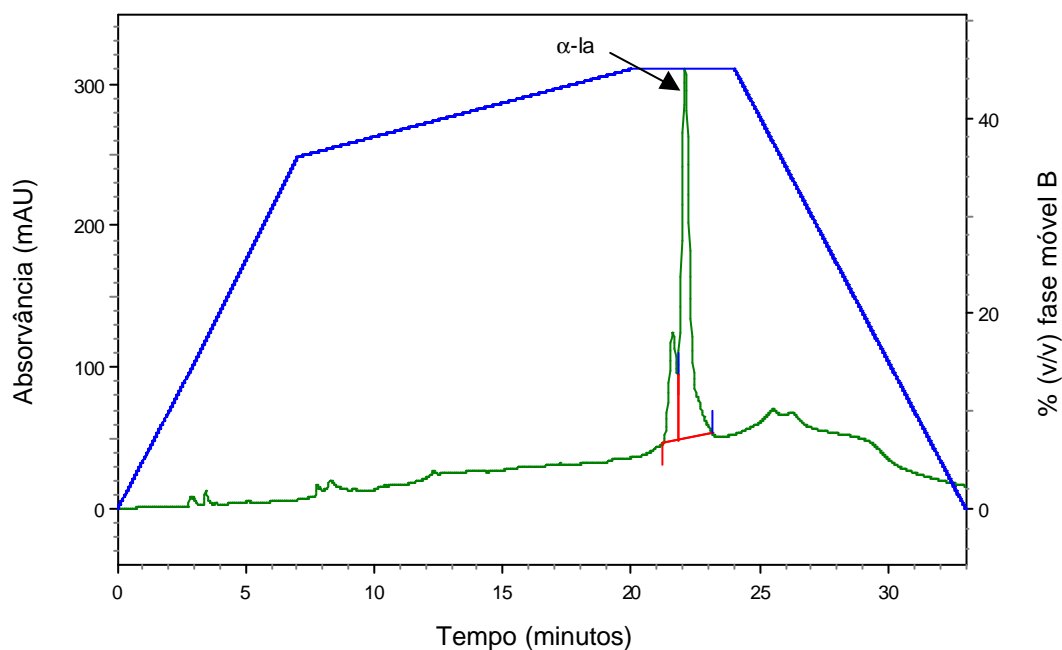


Figura 36 – Cromatograma da fase superior de um sistema formado a partir de α -la padrão, 5% (p/p) de copolímero PE 61 e solução de sais de fosfato de potássio 15 mM em pH 7.

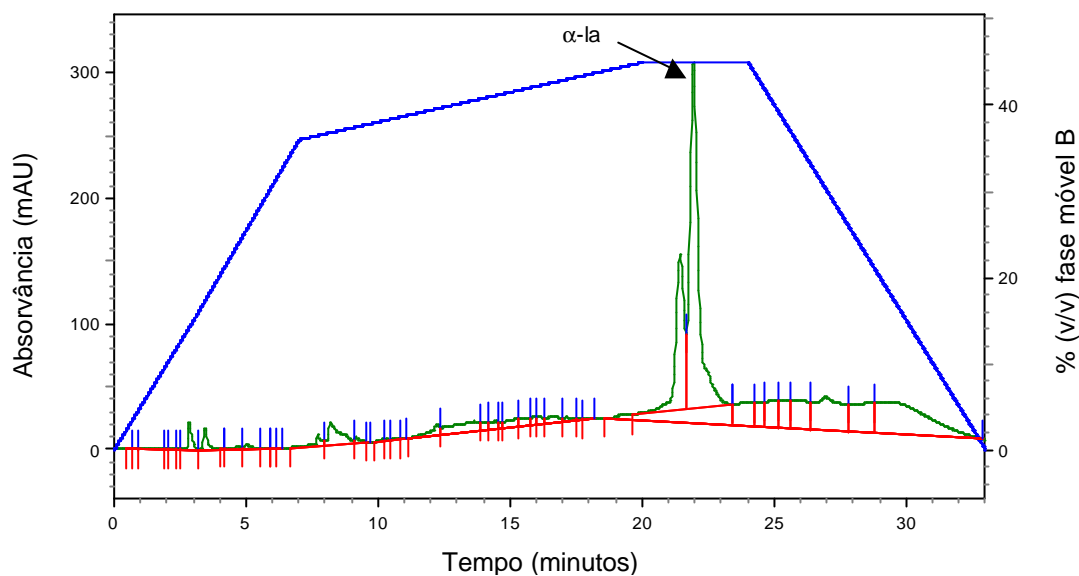


Figura 37 – Cromatograma da fase superior de um sistema formado a partir de α -la padrão, 10% (p/p) de copolímero PE 61 e solução de sais de fosfato de potássio 15 mM em pH 7.

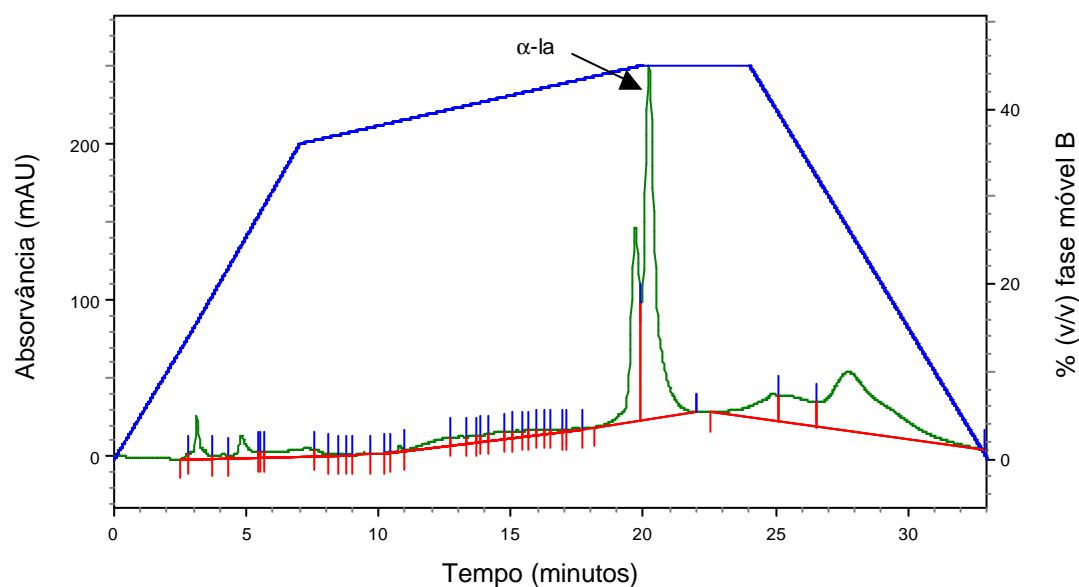


Figura 38 – Cromatograma da fase superior de um sistema formado a partir de α -la padrão, 15% (p/p) de copolímero PE 61 e solução de sais de fosfato de potássio 15 mM em pH 7.

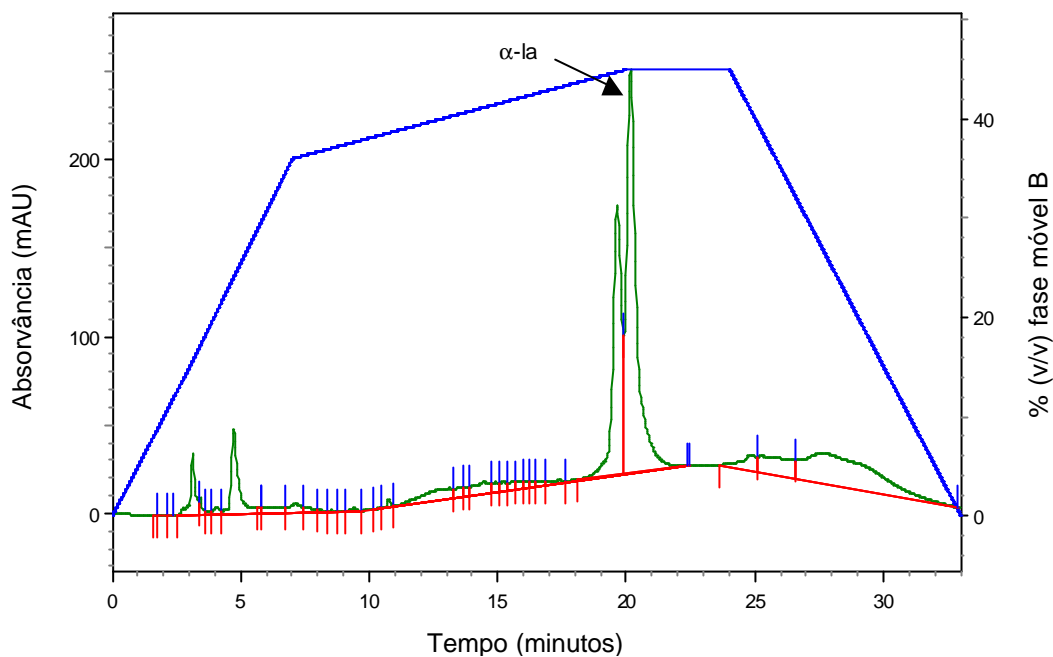


Figura 39 – Cromatograma da fase superior de um sistema formado a partir de α -la padrão, 20% (p/p) de copolímero PE 61 e solução de sais de fosfato de potássio 15 mM em pH 7.

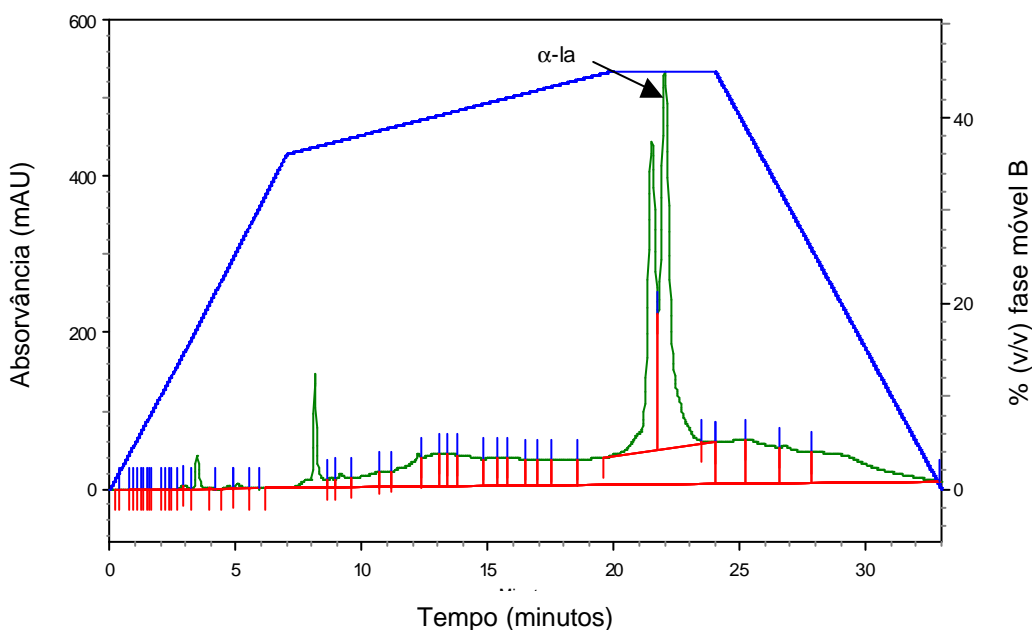


Figura 40 – Cromatograma da fase superior de um sistema formado a partir de α -la padrão, 25% (p/p) de copolímero PE 61 e solução de sais de fosfato de potássio 15 mM em pH 7.

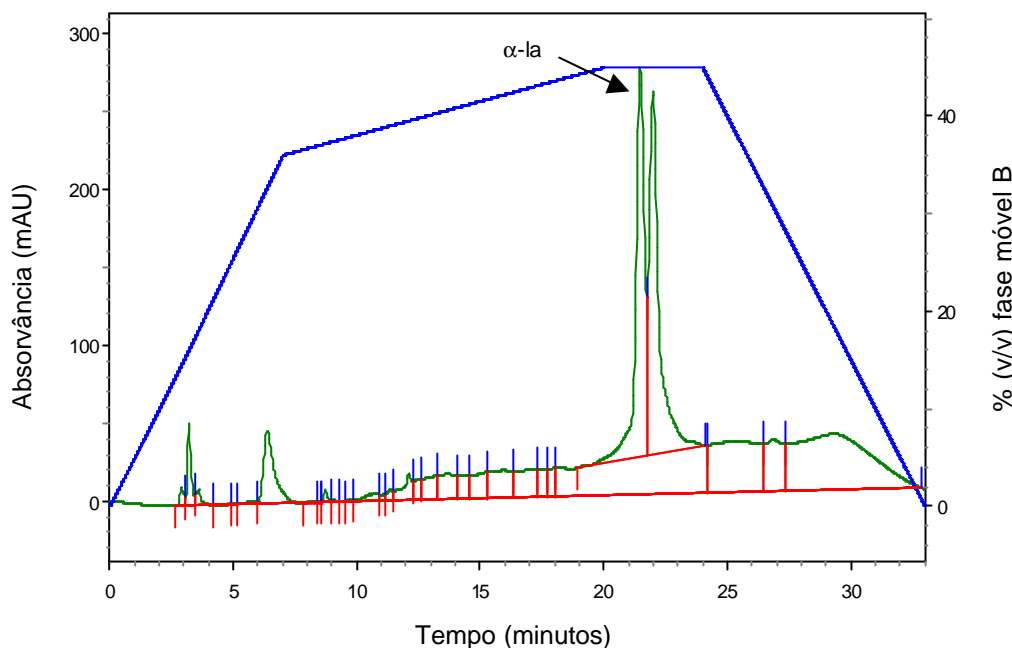


Figura 41 – Cromatograma da fase superior de um sistema formado a partir de α -la padrão, 30% (p/p) de copolímero PE 61 e solução de sais de fosfato de potássio 15 mM em pH 7.

Em todos os SAB analisados, a α -la permaneceu quase que totalmente concentrada na fase superior (fase aquosa) dos sistemas, enquanto que a β -lg distribuiu-se entre as duas fases. Como a β -lg é mais hidrofóbica que a α -la (NAKAI, 1996) possivelmente, há uma maior interação da β -lg com a fase copolimérica, pelo fato do copolímero conter maior número de grupos hidrofóbicos, aumentando o número e a intensidade das interações entre grupos hidrofóbicos. De acordo com SEDEV et al (1999), os copolímeros L 62 e F 68 adsorvem com seus blocos PO a BSA, a qual é conhecida por ter uma forte afinidade por ligantes hidrofóbicos.

A β -lg é capaz de se ligar a muitas moléculas hidrofóbicas, sendo possível que ela atue como carreadora de retinol (FOX & McSWEENEY, 1998). No trabalho ora realizado, além da hidrofobicidade, outros fenômenos podem estar ocorrendo, de forma a promover a partição das proteínas entre as fases.

4. CONCLUSÕES

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

- A composição e a concentração dos copolímeros EO-PO-EO e a concentração de sais de fosfato de potássio influenciaram significativamente na temperatura do ponto de névoa. Os copolímeros L 35 e L não foram adequados para a separação das proteínas, devido às suas elevadas temperaturas do ponto de névoa.
- É possível separar a α -la da β -lg mediante o uso da extração no ponto de névoa em sistemas aquosos bifásicos. A avaliação do grau de partição destas proteínas em SAB foi feito através do cálculo do coeficiente de partição. A α -la permaneceu preferencialmente na fase aquosa e a β -lg transferiu-se parcialmente para a fase copolimérica.
- Os copolímeros PE 61 e L 31 apresentaram a mesma eficiência na partição das proteínas, porém, o PE 61 mostrou ser o melhor sistema devido ao menor consumo de copolímero em relação ao L 31. O custo do copolímero é bem mais elevado em relação ao custo dos sais de fosfato de potássio, consumido em maior quantidade nos sistemas formados pelo copolímero PE 61. Dentre os diferentes sistemas testados, aquele composto por 20% (p/p) de copolímero PE 61 e solução de sais de fosfato de potássio 100 mM foi o mais adequado.
- Não foi constatada influência da diferença de viscosidade dos copolímeros PE 61 e L 31 na partição das proteínas.

5. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

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

- Avaliar a interferência dos copolímeros triblocos em diferentes técnicas analíticas de detecção e quantificação das proteínas do soro de queijo.
- Aumentar o grau de partição das proteínas nos sistemas avaliados.
- Realizar trabalhos utilizando outros copolímeros e sais, objetivando otimizar o processo de separação das proteínas α -la e β -lg por extração no ponto de névoa.
- Realizar ensaios laboratoriais a fim de se verificar a aplicação da técnica de extração no ponto de névoa para outras biomoléculas de interesse da indústria.
- Avaliar a reciclagem dos copolímeros triblocos dos sistemas pela técnica de extração do ponto de névoa.
- Avaliar parâmetros reológicos dos sistemas em outras temperaturas acima do ponto de névoa.
- Determinar os coeficientes de difusão para os copolímeros L 31 e PE 61.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTSSON, P. A. **Partitioning of cell and macromolecules**, New York: John Wiley, 1986. 346 p.

ALEXANDRIDIS, P., HATTON, T. A. Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly (ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modeling. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 96, p. 1-46, 1995.

ALRED, P. A., KOZLOWSKI, A. HARRIS, J. M., TJERNELD, F. Application of temperature-induced phase partitioning at ambient temperature for enzyme purification. **Journal of Chromatograph A**, v. 658, p. 289-298, 1994.

BAHADUR, P., LI, P., ALMGREN, M., BROWN, W. Effect of potassium fluoride on the micellar behavior of Pluronic F-68 in aqueous solution. **Langmuir**, v. 8, p.1903-1907, 1992.

BASF CORP. Pluronic and Technical Brochure: Tetronic Surfactants, Parsipanny, 1989.

BEM-HASSAN, R. M., GHALY, A. E. Continuous propagation of *Kluyveromyces fragilis* in cheese whey for pollution potential reduction. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 47, p. 89-105, 1994.

BRAMAUD, C., AIMAR, P., DAVEE, G. Whey protein fractionation: isoelectric precipitation of α -lactalbumin under gentle heat treatment. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 56, n. 3, p. 391-397, 1997.

BRESLOW, R. In: CRAMER, C. H., TRUHLAR, D. G. (editors) Structure and Reactivity in Aqueous Solutions. **American Chemical Society**, Washington, p. 291, 1994.

CATÁLOGO HANDBOOK OF FINE CHEMICALS ALDRICH, 1996-1997.

CATÁLOGO OXITENO, 1998.

CAYOT, P., LORIENT, D. Structure-Function Relationships of Whey Proteins. In: DAMODARAN, S., PARAF, A. (editors) **Food proteins and their applications**. Marcel Dekker, Inc., New York, p. 225-256, 1997.

CHEN, J., MA, G. X., LI, D. Q. HPCPC separation of proteins using polyethyleneglycol-potassium phosphate aqueous two-phase. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 29, n.1, p.371-383, 1999.

COIMBRA, J. S. R., GIRALDO-ZUÑIGA, A. D., MINIM, L. A., MEIRELLES, A. J. A. **Uso de sistema aquoso bifásico na extração líquido-líquido**. Cadernos didáticos, 95. Viçosa: UFV, 2003. 43 p.

CUNHA, M. T., TJERNELD, F., CABRAL, J. M. S., AIRES-BARROS, M. R. Effect of electrolytes and surfactants on the thermoseparation of an ethylene oxide-propylene oxide random copolymer in aqueous solution. **Journal of Chromatography B**, v. 711, p. 53-60, 1998.

DOUTANI, S., TURHAN, K. N., ETZEL, M. R. Fractionation of proteins from whey using cation exchange chromatography. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1737-1743, 2004.

FOX, P. F., McSWEENEY, P. L. H. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. Blackie Academic & Professional. Cork, 1998. 478 p.

GALAEV, I. Y., MATTIASSON, B. **Smart Polymers for Bioseparation and Bioprocessing**. Taylor & Francis Publishers, London and New York, 2002.

HUSTED, H., KRONER, K. H., MENGUE, U., KULA, M. R. Partition in aqueous two-phase systems. **Trends in Biotechnology**, v. 3, n. 6, p. 139-144, 1985.

- HVIDT, S. Pressure- and temperature-dependent micellization of a poly (ethylene oxide)-poly (propylene oxide) triblock copolymer in aqueous solutions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 112, p. 201-207, 1995.
- JAIN, N. J., GEORGE, A. BAHADUR, P. Effect of salt on the micellization of pluronic P 65 in aqueous solution. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 157, p. 275-283, 1999.
- JÖNSSON, M., JOHANSSON, H. O. Protein partitioning in thermoseparating systems of a charged hydrophobically modified ethylene oxide polymer. **Journal of Chromatography A**, v. 983, p. 133-144, 2003.
- KARLSTRÖM, G. A. New Model for Upper and Lower Critical Solution Temperatures in Poly(ethylene oxide) Solutions. **Journal of Physical Chemistry**, v. 89, p. 4962-4964, 1985.
- KILARA, A., HARWALKAR, V. R. Denaturation. In: NAKAI, S., MODLER, H. W. (editors) **Food Proteins**. VCH Publishers, Inc., New York, p. 71-165, 1996.
- KJELLANDER, R., FLORIN, E. Water Structure and Changes in Thermal Stability of the System Poly(ethylene oxide)-Water. **Journal of the Chemical Society** . Faraday Transactions I, v. 77, p. 2053-2077, 1980.
- LI, M., ZHU, Z. Q., WU, Y. T., LIN, D. Q. Measurement of phase diagrams for new aqueous two-phase systems and prediction by a generalized multicomponent osmotic virial equation. **Chemical Engineering Science**, v. 53, p. 2755-2767, 1998.
- MEHRA, R. K., DONNELLY, W. Fractionation of whey protein components through large pore size hydrophilic, cellulosic membrane. **Journal Dairy Research**, v. 60, n. 1, p. 89-97, 1993.

- MORR, C., HA, E. W. Whey protein concentrates and isolates processing na functional properties critical reviews. **Food Science and Nutrition**, v. 33, n. 6, p. 431-476, 1993.
- NAKAI, S. An Overview. In: NAKAI, S., MODLER, H. W. (editors) **Food Proteins**. VCH Publishers, Inc., New York, p. 1-21, 1996.
- PALEOLOGOS, E. K., CHYTIRI, S. D., SAVVAIDIS, I. N., KONTOMINAS, M. G. Determination of biogenic amines as their benzoyl derivatives after cloud point extraction with micellar liquid chromatographic separation. **Journal of Chromatography A**, v. 1010, p. 217-224, 2003.
- PALEOLOGOS, E. K., GIOKAS, D. L., KARAYANNIS, M. I. Micelle-mediated separation and cloud-point extraction. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 5, p. 426-436, 2005.
- RABELO, A. P. B., TAMBOURGI, E. B., PESSOA JR., A. Bromelain partitioning in two-phase aqueous systems containing PEO-PPO-PEO block copolymers. **Journal of Chromatography B**, v. 807, p. 61-68, 2004.
- SCHMOLKA, I.R. A review of block copolymer surfactants. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 54, n. 3, p.110-116, 1977.
- SCHOTT, H., HAN, S. K. J. Effect of inorganic additives on solutions of nonionic surfactants IV: Krafft points. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 65, n. 7, p. 979-981, 1976.
- SEDEV, R., NÉMETH, Z., IVANOVA, R., EXEROWA, D. Surface force measurement in foam films from mixtures of protein and polymeric surfactants. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 149, p. 141-144, 1999.

- SILVA, R. C., LOH, W. Effect of additives on the cloud points of aqueous solutions of ethylene oxide-propylene oxide-ethylene oxide block copolymers. **Journal of Colloids and Interface Science**, v. 202, p. 385-390, 1998.
- TEOTIA, S., GUPTA, M. N. Purification of phospholipase D by two-phase affinity extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1025, p. 297-301, 2004.
- XIULI, L., JIAN, X., WANGUO, H., DEJUN, S. Effect of additives on the cloud points of two tri-block copolymers in aqueous solution. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 237, p. 1-6, 2004.
- YOSHIDA, S. Isolation of β -lactoglobulin and α -lactoalbumin by gel filtration using sephacryl S-200 and purification by diethylaminoethyl ion-exchange chromatography. **Journal Dairy Science**, v.73, p.2292-2298, 1990.