

LIZZY AYRA PEREIRA ALCÂNTARA

**OTIMIZAÇÃO DO FRACIONAMENTO DAS PROTEÍNAS DE SORO DE
LEITE POR OPERAÇÃO DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO EM
SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS**

Dissertação 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 *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2009

LIZZY AYRA PEREIRA ALCÂNTARA

**OTIMIZAÇÃO DO FRACIONAMENTO DAS PROTEÍNAS DE SORO DE LEITE
POR OPERAÇÃO DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO EM SISTEMAS
AQUOSOS BIFÁSICOS**

Dissertação 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: 27 de Julho de 2009.

Prof^a. Valéria Paula Rodrigues Minim
(Co-orientadora)

Prof. Luis Henrique Mendes da Silva
(Co-orientador)

Prof^a. Renata Cristina Ferreira Bonomo

Prof^a. Maria do Carmo Hespanhol da Silva

Prof. Luis Antonio Minim
(Orientador)

*Ao meu bom Deus, pelas bênçãos concedidas e por me fortalecer nos momentos difíceis.
Aos meus queridos pais, José e Iara, aos meus irmãos Abraão e Isaque e aos meus avôs
Sinézio, Clarice e Gildete, pelo amor, incentivo e por ensinarem a realizar os meus ideais.
Ao meu noivo Marcio, pelo amor, motivação e companheirismo em todos os momentos.
A família Veríssimo, pelo carinho e cuidado dispensado.*

Dedico esta dissertação.

“ Tudo posso Naquele que me fortalece.” Filipenses 4.13

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus por sua maravilhosa graça e amor dispensados diariamente em minha vida. Por sempre me amparar nos momentos de fraqueza e mostrar que por meio Dele todas as coisas são possíveis.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) pela oportunidade e condições de realização do trabalho e pela imensurável experiência acadêmica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelos recursos financeiros e pela bolsa concedida.

Ao meu orientador professor Luis Antonio Minim, pela orientação, pelo aprendizado, pelas sugestões, credibilidade, motivação e essencial colaboração no trabalho.

Ao professor Luís Henrique Mendes da Silva, pela cordialidade, inigualável atenção, ajuda na condução dos experimentos e pela orientação

À professora Valéria Paula Rodrigues Minim, pela gentileza, pela simpatia e valiosas contribuições para a realização do trabalho.

Às professoras Maria do Carmo Hespanhol da Silva e Renata Cristina Ferreira Bonomo, que gentilmente aceitaram o convite de participar como membros da banca que avaliou este trabalho. A vocês os meus sinceros agradecimentos pelas dicas, sugestões, correções e pela amizade.

À minha família, meu referencial e meu porto seguro, que sempre dispensaram apoio e compreensão incondicional para que eu vencesse essa etapa.

Ao meu noivo Marcio, pelo amor e compreensão incondicional.

À minha família em Viçosa, D^a Eneida, Glaucia, Lilian, Ricardo, Gustavo, Lílian e aos meus sobrinhos Luis Guilherme, João Victor, Mariana, Isabela e Luiza, pela recepção acolhedora por todo o carinho, cuidado e incentivo dispensando.

Aos amigos Samuel, Timotheo, Bruna Mara, Isabella, Ariádine, Rita, Roberta, Júnia, Fabíola e Angélica, pela grande amizade, companheirismo, apoio e motivação.

Aos amigos do grupo de convivência pela amizade pela maravilhosa convivência compartilhada.

Aos amigos do laboratório, Ana Alice, Janaína, Renata, Márcia, Milene, Rafael, Ivan, Roney, Maycon, Leandro, Moisés e Alexandre pelos agradáveis momentos proporcionados e pelo aprendizado compartilhado.

A todos os funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos pelos serviços prestados.

A todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho e não foram aqui citados, o meu sincero agradecimento.

BIOGRAFIA

Lizzy Ayra Pereira Alcântara, filha de José da Silva Alcântara e Iara Pereira da Encarnação Alcântara, nasceu em Teófilo Otoni, Minas Gerais, no dia 21 do mês de abril de 1985.

Em maio de 2003, iniciou o curso de graduação em Engenharia de Alimentos na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, colando grau em fevereiro de 2008. No mês seguinte, em março de 2008, ingressou no curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, e em julho de 2009, submeteu-se à defesa de dissertação.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xiii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. OBJETIVO GERAL.....	4
2.1. Objetivos Específicos.....	4
3. REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1. Soro de Leite	5
3.1.1. Proteínas do Soro de Leite e suas Aplicações	6
3.1.1.1. α -Lactoalbumina	9
3.1.1.2. β -lactoglobulina	10
3.1.1.3. Glicomacropéptido	10
3.1.1.4. Albumina de Soro Bovino.....	11
3.1.1.5. Imunoglobulinas	12
3.1.1.6. Peptídeos Secundários.....	12
3.2. Métodos de Fracionamento das Proteínas do Soro	13
3.3. Separação por Extração líquido-líquido.....	13
3.4. Sistemas Aquosos Bifásicos.....	14
3.4.1. Tipos de Sistemas Aquosos Bifásicos.....	16
3.4.2. Constituintes das Fases	18
3.4.2.1. Polietilenoglicol	18
3.4.3. Sais	19
3.4.3.1. Citrato de Sódio	19
3.4.3.2. Fosfato de Potássio e Dibásico	19
3.4.3.3. Sulfato de Lítio.....	20
3.4.4. Diagrama de Equilíbrio do Sistema Aquoso Bifásico.....	20
3.4.5. Variáveis que Influenciam a Partição em SAB.....	22
3.4.5.1. Massa Molar e Concentração do Polímero	22
3.4.5.2. pH.....	23
3.4.5.3. Tipo e Concentração de Sal	24

3.4.5.4. Temperatura	24
3.4.6. Coeficiente de Partição	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1. Materiais.....	27
4.2. Métodos.....	28
4.2.1. Planejamento Experimental	28
4.2.2. Metodologia Experimental.....	31
4.2.2.1. Preparo do Sistema Aquoso Bifásico.....	31
4.2.2.2. Experimentos de Partição.....	32
4.2.2.3. Fracionamento da α -Lactoalbumina, Glicomacropéptido e β -Lactoglobulina de Soro de Leite <i>in natura</i>	33
4.2.3. Metodologia Analítica.....	35
4.2.3.1. Análise da Proteína por Espectrofotometria	35
4.2.3.2. Análise da Proteína por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	35
4.2.3.3. Caracterização da Composição Química do Soro.....	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	37
5.1. Avaliação da Partição das Proteínas do Soro.....	37
5.2. Otimização da Partição das Proteínas do Soro	44
5.2.1. Otimização da Partição da α -La, β -Lg e GMP em Sistemas PEG/Citrato.....	45
5.2.2. Otimização da Partição da α -La, β -Lg e GMP em Sistemas PEG/Fosfato	53
5.2.3. Otimização da partição da α -La, β -Lg e GMP em sistemas PEG/Sulfato.....	61
5.3. Avaliação do SAB para Fracionamento de α -Lactoalbumina, Glicomacropéptido e β -Lactoglobulina de Soro de Leite <i>in natura</i>	67
5.3.1. Curvas Padrão da α -La, β -Lg e GMP.....	67
5.3.2. Quantificação das Proteínas do Soro <i>in natura</i>	68
5.3.3. Caracterização da Composição Química do Soro.....	69
5.4. Fracionamento de α -Lactoalbumina, Glicomacropéptido e β -Lactoglobulina de Soro de Leite <i>in natura</i>	69
6. CONCLUSÃO	74
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação planar parcial da molécula de PEG com os sítios disponíveis para as interações com os demais componentes do sistema.....	19
Figura 2 – Diagrama de fase para sistemas aquosos bifásicos, expresso em coordenadas retangulares.....	21
Figura 3 – Representação esquemática dos 3 estágios de extração líquido-líquido em SAB, em batelada.....	34
Figura 4 A e 4 B – Comportamento da partição da α -la, β -lg e GMP em função dos diferentes níveis de pH (4A) e concentração molar de NaCl (4B).....	43
Figura 5 – Comportamento da partição do GMP em função dos diferentes níveis de concentração de citrato.....	43
Figura 6 – Superfície de resposta para o coeficiente de partição da α -la em sistema PEG/citrato, como função do pH e da concentração molar de NaCl.....	49
Figura 7 – Superfície de resposta para o coeficiente de partição da β -lg em sistema PEG/citrato, como função do pH e da concentração molar de NaCl.....	50
Figura 8 – Superfície de resposta para o coeficiente de partição do GMP em sistema PEG/citrato, como função do pH e da concentração molar de NaCl.....	53
Figura 9 – Superfície de resposta para o coeficiente de partição da α -la em sistema PEG/fosfato, como função do pH e da concentração molar de NaCl.....	58
Figura 10 – Superfície de resposta para o coeficiente de partição da β -lg em sistema PEG/fosfato, como função do pH e da concentração molar de NaCl.....	59
Figura 11 – Superfície de resposta para o coeficiente de partição do GMP em sistema PEG/fosfato, como função do pH e da concentração molar de NaCl.....	60
Figura 12 - Superfície de resposta para o coeficiente de partição da α -la em sistema PEG/sulfato, como função do pH e da concentração molar de NaCl.....	64
Figura 13 - Superfície de resposta para o coeficiente de partição da β -lg em sistema PEG/sulfato, como função do pH e da concentração molar de NaCl.....	65

Figura 14 – Superfície de resposta para o coeficiente de partição do GMP em sistema PEG/sulfato, como função do pH e da concentração molar de NaCl.....	66
Figura 15 – Curva-padrão para α -lactoalbumina.....	67
Figura 16 – Curva-padrão para β -lactoglobulina.....	68
Figura 17 – Curva-padrão para o glicomacropéptido.....	68
Figura 18 – Perfil cromatográfico do soro <i>in natura</i> em coluna C18-HPLC.....	69
Figura 19 – Perfil cromatográfico dos três estágios de extração, empregando a concentração de 3 mL de soro integral e <i>in natura</i> em coluna C18-HPLC.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição do soro de leite em função da origem de obtenção.....	6
Tabela 2 – Composição protéica do soro de leite.....	7
Tabela 3 – Tipos de sistemas aquosos bifásicos e seus componentes.....	17
Tabela 4 – Fatores e níveis do delineamento fatorial fracionado (2^{5-1})	29
Tabela 5 – Condições experimentais testadas no fatorial fracionado (2^{5-1}).....	29
Tabela 6 – Condições experimentais testadas no Delineamento Composto Central Rotacional.....	30
Tabela 7 – Programação do gradiente da fase móvel.....	35
Tabela 8 – Resultados experimentais obtidos para o coeficiente de partição da α -la empregando um delineamento fatorial fracionado 2^{5-1}	38
Tabela 9 – Resultados experimentais obtidos para o coeficiente de partição da β -lg empregando um delineamento fatorial fracionado 2^{5-1}	39
Tabela 10 – Resultados experimentais obtidos para o coeficiente de partição do GMP empregando um delineamento fatorial fracionado 2^{5-1}	40
Tabela 11 – Resultado da ANOVA para o coeficiente de partição da α -la empregando um fatorial fracionado 2^{5-1}	41
Tabela 12 –Resultado da ANOVA para o coeficiente de partição da β -lg empregando um fatorial fracionado 2^{5-1}	41
Tabela 13 – Resultado da ANOVA para o coeficiente de partição do GMP empregando um fatorial fracionado 2^{5-1}	42
Tabela 14 – Resultados experimentais obtidos para o coeficiente de partição da α -la em SAB PEG/citrato empregando um DCCR.....	45
Tabela 15 – Resultados experimentais obtidos para o coeficiente de partição da β -lg em SAB PEG/citrato empregando um DCCR.....	46
Tabela 16 – Resultados experimentais obtidos para o coeficiente de partição do GMP em SAB PEG/citrato empregando um DCCR.....	46

Tabela 17 – Resultado da ANOVA da regressão para o coeficiente de partição da α -la, β -lg e GMP em SAB PEG/Citrato, empregando em DCCR.....	47
Tabela 18 – Resultados experimentais obtidos para o coeficiente de partição da α -la em SAB PEG/fosfato empregando um DCCR.....	54
Tabela 19 – Resultados experimentais obtidos para o coeficiente de partição da β -lg em SAB PEG/fosfato empregando um DCCR.....	55
Tabela 20 – Resultados experimentais obtidos para o coeficiente de partição da GMP em SAB PEG/fosfato empregando um DCCR.....	56
Tabela 21 - Resultado da ANOVA da regressão para o coeficiente de partição da α -la, β -lg e GMP em SAB PEG/Fosfato, empregando em DCCR.....	57
Tabela 22 – Resultados experimentais obtidos para o coeficiente de partição da α -la em SAB PEG/sulfato empregando um DCCR.....	61
Tabela 23 – Resultados experimentais obtidos para o coeficiente de partição da β -lg em SAB PEG/sulfato empregando um DCCR.....	62
Tabela 24 – Resultados experimentais obtidos para o coeficiente de partição da GMP em SAB PEG/sulfato empregando um DCCR.....	62
Tabela 25 - Resultado da ANOVA da regressão para o coeficiente de partição da α -la, β -lg e GMP em SAB PEG/Sulfato de Lítio, empregando em DCCR.....	63
Tabela 26 – Composição química do soro doce, obtido a partir da fabricação de queijo tipo Minas frescal.....	69
Tabela 27 – Resultados médios obtidos para a taxa de redução para a α -la ($TR_{\alpha-la}$), fator de purificação da β -lg ($FP_{\beta-lg}$) e rendimento de extração da α -la ($Y_{\alpha-la}$), da β -lg ($Y_{\beta-lg}$) e do GMP (Y_{GMP}) em função das diferentes diluições de soro <i>in natura</i>	71
Tabela 28 - Resultado da ANOVA da regressão para a α -la ($TR_{\alpha-la}$), fator de purificação da β -lg ($FP_{\beta-lg}$) e rendimento de extração da α -la ($Y_{\alpha-la}$), da β -lg ($Y_{\beta-lg}$) e do GMP (Y_{GMP}) em função das diferentes diluições de soro <i>in natura</i>	73
Tabela 29 – Modelos lineares obtidos para a taxa de redução da a α -la ($TR_{\alpha-la}$) e rendimento de extração da β -lg ($Y_{\beta-lg}$) e do GMP (Y_{GMP}) em função das diferentes diluições de soro <i>in natura</i>	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- α -la - α -lactoalbumina
- β -lg - β -lactoglobulina
- $^{\circ}\text{C}$ - grau Celsius
- g - força gravitacional
- μm - micrometro
- m_i - Massa de proteína na fase inferior
- m_s - Massa de proteína
- m_T - Massa total de proteína adicionada no sistema
- $[\Delta\text{PEG}]$ - Diferença de concentração de PEG nas fases superior e inferior expressa em % em massa
- $[\Delta\text{Sal}]$ - Diferença de concentração de sal nas fases superior e inferior expressa em % em massa
- BSA - Albumina de soro bovino
- $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ - Citrato de sódio
- $[\text{C}]_{\text{sup}}$ - Concentração de equilíbrio da proteína particionada na fase superior
- $[\text{C}]_{\text{inf}}$ - Concentração de equilíbrio da proteína particionada na fase inferior
- CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- CMP - Caseinomacropéptido
- DCCR - Delineamento Composto Central Rotacional
- DNA - Ácido Dexoribonucleico
- ELT - Extração líquido-líquido tradicional
- F - Teste de Fisher
- FAJ - Falta de Ajuste
- FDA - Food and Drug Administration
- F.V - Fonte de Variação
- G.L - Grau de Libertade
- GMP - Glicomacropéptido
- $\text{HO}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{H}$ - Polietileno glicol
- Ig's - Imunoglobulinas
- IGF 1 e IGF 2 - Fatores de crescimento do tipo insulina 1 e 2
- K - Coeficiente de Partição;

$K_{\alpha-la}$ - Coeficiente de Partição da α -lactoalbumina;
 $K_{\beta-lg}$ - Coeficiente de Partição da β -lactoglobulina;
 K_{GMP} - Coeficiente de Partição do glicomacropéptido;
 K_2HPO_4 - Fosfato de Potássio Dibásico
 KH_2PO_4 - Fosfato de Potássio Monobásico
 Li_2SO_4 - sulfato de lítio
mg - miligramas
mL - mililitros
min. - minutos
NaCl - cloreto de sódio
nm - nanômetro
NaPA - Poliacrilato de sódio
PAA - Ácido Poliacrílico
 P_c - ponto crítico
PEG - Polietilenoglicol
pH - Potencial hidrogeniônico
pI - Ponto Isoelétrico
PPG - Polipropilenoglicol
Pr – Probabilidade
Q.M - Quadrado médio
SAB - Sistemas Aquosos Bifásicos
Tie lines - linhas de amarração
TLL - comprimento da linha de amarração
 V_s - Volume da fase superior
 V_I - Volume da fase inferior

RESUMO

ALCÂNTARA, Lizzy Ayra Pereira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2009. **Otimização do fracionamento das proteínas de soro de leite por operação de extração líquido-líquido em sistemas aquosos bifásicos.** Orientador: Luis Antonio Minim. Co-Orientadores: Luis Henrique Mendes da Silva e Valéria Paula Rodrigues Minim.

Neste trabalho, estudou-se o processo de extração líquido-líquido em sistemas aquosos bifásicos (SAB) para a otimização do fracionamento das proteínas do soro de leite α -lactoalbumina (α -la), β -lactoglobulina (β -lg) e glicomacropéptido (GMP). Os SAB avaliados foram compostos por polietilenoglicol (PEG) 2000 gmol^{-1} e sais (fosfato de potássio, citrato de sódio e sulfato de lítio). Inicialmente foi avaliado a influência dos fatores pH, temperatura, concentração de PEG, concentração de sal e concentração de NaCl sobre a partição das proteínas, aplicando-se um delineamento fatorial fracionado. Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância, sendo verificado que o pH e a concentração molar de NaCl afetaram significativamente ($p < 0,05$) a partição da α -la e β -lg. Em seguida, foi empregado um delineamento composto central rotacional (DCCR), testando diferentes níveis dos fatores pH e concentração molar de NaCl. Os resultados obtidos no DCCR foram submetidos as análises de regressão e superfície de resposta, sendo determinadas as melhores condições para a otimização da partição das proteínas, em cada tipo de sal. Para os sistemas PEG/citrato, verificou-se que para valores de pH acima de 5,6, o aumento da concentração de NaCl nos sistemas promoveu um aumento no coeficiente de partição da β -lg. Para a α -la, o incremento do pH proporcionou um aumento do coeficiente de partição, enquanto para o GMP foi obtido um valor máximo de coeficiente de partição ($K=0,912$) em pH 6,35 e $0,441 \text{ molL}^{-1}$ de NaCl. Para os sistemas PEG/fosfato, o acréscimo de NaCl aos sistemas promoveu uma redução no valor do coeficiente de partição da β -lg, e para a α -la, foi obtida uma condição de minimização de seu coeficiente de partição. Já para o SAB PEG/sulfato, em pH 5,67 e $0,276 \text{ molL}^{-1}$ de NaCl foi obtido um mínimo de coeficiente de partição para a β -lg ($K=0,031$). Avaliou-se o fracionamento das proteínas do soro *in natura* em SAB PEG/fosfato de potássio (ambos 13 % em massa), em pH 5,43 com $0,290 \text{ molL}^{-1}$ de NaCl, a 25°C , em função das diferentes diluições do soro (integral, 1:1 e 1:3). Em cada sistema determinou-se o rendimento de extração das proteínas-alvo, fator de purificação da β -lg e a taxa de redução da α -la na fase salina, após 3 estágios

de extração líquido-líquido. Verificou-se que dentre os sistemas avaliados, os SAB adicionados de soro integral, apresentaram: maior taxa de redução da α -la (5,56) na fase inferior e maior fator de purificação da β -lg (96,25 %) na fase salina, após três estágios de extração. Este estudo mostrou que o SAB pode ser utilizado para fracionamento das proteínas α -la, β -lg e GMP do soro de leite na forma *in natura*.

ABSTRACT

ALCÂNTARA, Lizzy Ayra Pereira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2009. **Optimization of fractionation of milk whey proteins by liquid-liquid extraction operation in aqueous two-phase system.** Adviser: Luis Antonio Minim. Co-Advisers: Luis Henrique Mendes da Silva and Valéria Paula Rodrigues Minim.

In this work it was studied the liquid-liquid extraction process, using aqueous two phase systems (ATPS) in order to fractionate whey proteins α -lactoalbumin (α -la), β -lactoglobulin (β -lg) and glycomacropeptide (GMP). The evaluated ATPS were composed by PEG 2000 and inorganic salts (potassium phosphate, sodium citrate and lithium sulfate). Initially a fractionated factorial design was applied in order to evaluate the influence of the factors (pH, temperature, PEG concentration, salt concentration and NaCl concentration) on the proteins partition. The results were submitted to a variance analysis and it was found that pH and NaCl molar concentration affected significantly ($p < 0,05$) the partition of α -la and β -lg. After that, a central composite rotatable design (CCRD) was used to test different levels of pH and NaCl molar. The results obtained from the CCRD were submitted to a regression analysis and response surface analysis in order to determine the appropriate conditions to optimize the partition of such proteins, for the different salts used. On the systems PEG/citrate it was verified that for pH values higher, the increasing of NaCl led to higher partition coefficient values of β -lg. For α -la the increment of the pH increase the partition coefficient while GMP presented a maximum partition coefficient ($K=0,912$) in pH 6,35 e $0,441 \text{ mol L}^{-1}$ of NaCl. For the PEG/phosphate systems, the increasing of NaCl led the partition coefficient of β -lg to lower values, while for α -la it was found a condition of minimum in pH 6,0 and $0,441 \text{ mol L}^{-1}$ of NaCl. On the PEG/sulfato ATPS this time, it was obtained a minimum for the partition coefficient of β -lg ($K=0,031$) in pH 5,67 and $0,276 \text{ mol L}^{-1}$ of NaCl. The fractionation experiments were carried out on PEG/potassium phosphate (13% w/w for both), pH 5,43 and $0,290 \text{ molar}$ of NaCl, at 25°C , using different dilutions of whey (pure, 1:1 and 1:3). The extraction yield for the aimed proteins, the purification factor for β -lactoglobulin and reduction rate for α -lactoalbumin were determinate on each system after 3 steps of liquid-liquid extraction. It was observed that among the ATPS tested,

the ones which used pure whey presented higher reduction rate for α -lactoalbumin (5,56) on the bottom phase and higher purification factor β -lactoglobulin (96,25 %) on the salt phase after three extraction stages. This study showed that ATPS can be used to fractionate the proteins α -lactoalbumin, β -lactoglobulina and glycomacropeptide form *in natura* whey.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O soro de leite é um subproduto da indústria de laticínios resultante da precipitação da caseína do leite durante a fabricação de queijos. Aproximadamente 90% do total de leite usado para produção de queijo é descartado como resíduo. O descarte do soro como resíduo constitui uma perda significativa do potencial alimentício e energético, uma vez que o soro retém 55% de seus nutrientes, dentre eles a lactose (4% a 5%) e proteínas (0,6% a 0,7%) (RICHARDS, 2002). Este desperdício, aliado ao valor nutritivo do soro de queijo, leva a direcionar a atenção do meio científico e industrial para o estudo de técnicas alternativas e economicamente viáveis para o aproveitamento de suas proteínas, que apresentam alto valor biológico e comercial (CHAO, 2001).

A conscientização crescente dos consumidores da importância de alimentos ao mesmo tempo nutritivos e saudáveis, motiva pesquisadores a concentrar esforços nos estudos benéficos do soro e seus constituintes. Há cada vez mais evidências de que o soro contém proteínas e aminoácidos benéficos à saúde e que conferem excelentes propriedades tecnológicas. A β -lg possui aplicações em larga escala na indústria de alimentos, devido a algumas excelentes propriedades tecnológicas, como por exemplo, gelificação e capacidade de formar espuma (RICHARDS, 2002; CHATTERTON et al., 2006, TULLIO, 2007).

Entretanto, alguns indivíduos, particularmente as crianças, exibem uma resposta alérgica à β -lg. Esta sensibilidade não é restrita às crianças, uma pequena população de adultos também pode ser vulnerável a esta condição (YADA, 2004). Assim, há uma necessidade de desenvolver produtos hipoalergênicos também para este público (RICHARDS, 2002).

Frações das proteínas do soro como α -la ou GMP podem ser utilizadas como ingrediente na formulação de alimentos hipoalergênicos ou para fenilcetonúricos, respectivamente.

Devido às propriedades tecnológicas, funcionais e biológicas específicas de cada uma das proteínas do soro, há um crescente interesse no fracionamento dessas proteínas, pois muitas vezes estas características não se fazem notar nos concentrados protéicos devido às interações com outros componentes presentes (BRAMAUD, 1997). Deste modo, torna-se necessário o estudo de processos para a obtenção de frações purificadas das proteínas do soro α -la, β -lg e GMP.

O potencial para aplicações tecnológicas destas proteínas tem estimulado o desenvolvimento de processos para sua separação e purificação visando manter suas características funcionais inalteradas, pois os processos convencionais de separação e purificação de biomoléculas, como precipitação com sais ou extração com solventes, apresentam desvantagens associadas à desnaturação e baixa pureza. Além disso, a nível industrial, a purificação é dificultada, por outros fatores como baixa concentração das proteínas e sensibilidade térmica, o que geralmente obriga o uso de técnicas de custo elevado, como processos cromatográficos. Com isso, o custo final dos processos é elevado, dificultando o acesso a estes produtos de grande aplicação nos campos alimentício e terapêutico.

Assim, torna-se necessário o estudo de técnicas como a extração líquido-líquido por SAB que possibilitem a separação e purificação da proteína mantendo a sua estrutura nativa.

A extração líquido-líquido, utilizando SAB é um processo eficiente para separar bioconstituintes, visto que o tipo de sistema utilizado no processo extrativo apresenta alto teor de água em cada fase (entre 70% e 90%), o que resulta em um ambiente ameno para o trabalho com um componente biologicamente ativo, o qual preserva a sua estabilidade molecular, possibilitando o seu processamento neste meio. Estes sistemas apresentam vantagens como viscosidade e tensão superficial baixas, densidades próximas às da água, curto tempo de processamento e fácil aumento de escala (ALBERTSSON, 1986).

Fatores como constituição, tamanho e estrutura molecular do polímero temperatura, natureza e tamanho da partícula alvo, pH e natureza do eletrólito do sistema bifásico influencia na separação de fases em SAB e, conseqüentemente, o processo extrativo de um determinado biocomposto (BANIK et al., 2003). A partição em SAB baseia-se na distribuição seletiva de compostos entre as duas fases. Portanto, a predição e a interpretação da partição de biocomponentes em SAB é uma tarefa complexa, embora a manipulação das propriedades do sistema tornando predominante um determinado tipo de interação venha a ser uma forma de controlar a partição (HATTI-KAUL, 2001).

O método clássico de otimização variando o nível de um parâmetro de cada vez e mantendo o restante das variáveis constantes, geralmente é demorado e requer um grande número de experimentos a serem realizados (SEN E SWAMINATHAN, 1997). Estas restrições podem ser superadas pelo uso de delineamentos fatorial,

combinado a metodologia de superfície de resposta (RSM), por meio do qual é possível determinar as condições nas quais a variável resposta é otimizada (MONTGOMERY, 2001). Nesta pesquisa, a metodologia de superfície de resposta foi aplicada para otimização do coeficiente de partição, de tal forma que buscou-se as condições para minimização do coeficiente de partição da β -lg.

Portanto, a fim de se obter frações de α -lactoalbumina, β -lactoglobulina e glicomacropéptido e assim agregar valor ao soro, em especial às suas proteínas, devido ao seu potencial para aplicações tecnológicas em alimentos, foi avaliado neste trabalho a: *i*) partição em sistemas aquosos bifásicos para fracionar as proteínas do soro (α -la, β -lg e GMP) verificando simultaneamente o efeito dos fatores pH, temperatura, concentração de PEG, sal e NaCl (mol L^{-1}) sobre o comportamento da partição, *ii*) a otimização da partição das proteínas em sistemas PEG/citrato, PEG/fosfato e PEG/sulfato, avaliando a influência das variáveis pH e concentração de NaCl sobre o coeficiente de partição e *iii*) fracionamento das proteínas do soro *in natura* em SAB. Foi também determinado o fator de purificação da β -lg e a taxa de redução da α -la, presentes na fase inferior (salina), e o rendimento de extração das proteínas do soro nas fases superiores e inferiores.

Na etapa de fracionamento das proteínas do soro em SAB, buscou-se particionar as proteínas de forma que obtivesse duas frações, uma rica em β -lg (fase salina) e outra rica em α -la (fase polimérica). Para o GMP, investigou-se seu comportamento de partição e em qual fase esta proteína apresentou-se em maior proporção. Posteriormente, a fração rica em α -la contendo apenas traços de β -lg, poderá ser empregada em formulações especiais, para crianças que tenham alergia ao leite de vaca e produtos hipoalergênicos. Já a fração de β -lg poderá ser utilizada na indústria de panificação e fabricação de sobremesas, como ingrediente em formulações que necessite de agentes formadores de estrutura, alta capacidade de formação de gel e retenção de água.

2. OBJETIVO GERAL

- Estudar o processo de partição das proteínas do soro de leite, em sistemas aquosos bifásicos, com o objetivo de obter frações das proteínas α -lactoalbumina, β -lactoglobulina e glicomacropéptido.

2. 1. Objetivos Específicos

- Estudar a partição das proteínas α -lactoalbumina, β -lactoglobulina e glicomacropéptido, em sistemas de duas fases aquosas constituídas por polietilenoglicol (PEG, massa molar média 2000 g mol^{-1}) e citrato de sódio e avaliar a influência da concentração do PEG e do citrato, da variação do pH, da temperatura e da adição de cloreto de sódio (NaCl) na partição dessas proteínas.
- Aplicar a metodologia de superfície de resposta e avaliar as condições para a minimização do coeficiente de partição da β -lactoglobulina em sistemas PEG/citrato de sódio, PEG/fosfato de potássio e PEG/sulfato de lítio.
- Avaliar o fracionamento das proteínas do soro *in natura* em SAB PEG/fosfato de potássio e determinar o rendimento de extração da β -lactoglobulina e fator de redução da α -lactoalbumina nas fases inferiores em um sistema de extração multiestágios em fluxo cruzado.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Soro de Leite

O soro de leite é um subproduto da indústria de queijos, de cor amarelo-esverdeada, obtido pela coagulação do leite. O seu gosto, ligeiramente ácido ou doce, e a sua composição dependem do tipo e do processo de fabricação do queijo (BEM-HASSAN e GHALY, 1994).

Segundo Sgarbieri (2004) pode ser obtido em laboratório ou na indústria por três processos distintos: a) coagulação enzimática (enzima quimosina), resultando no coágulo de caseínas, matéria prima para a produção de queijos e soro “doce”; b) precipitação ácida no pH isoelétrico (pI), resultando caseinatos e em soro ácido; e c) separação física das micelas de caseína por microfiltração, obtendo-se concentrado de micelas e as proteínas do soro na forma de concentrado ou isolado protéico. A Tabela 1 apresenta a composição do soro em função da origem.

No Brasil, a produção de soro é constituída quase que exclusivamente de soro doce, provindo da fabricação de queijos de coagulação enzimática (Minas Frescal, Cheddar, Meia, Cura, Prato e Mussarela dentre outros). Já para o soro ácido, obtido a partir da fabricação de queijo tipo “Cottage”, a quantidade de soro gerada pela produção de queijo é insignificante (VIOTTO, 1993).

A produção nacional de soro é de aproximadamente 7 milhões de toneladas por ano, o que renderia 56 mil toneladas de proteínas. Estima-se que 50% deste total é descartado no ambiente; entretanto, segundo dados da Secex (Secretaria de Comércio Exterior), no mês de agosto (2007) o principal produto importado no setor de lácteos foi o soro de leite (49% das compras externas), representando um total de 2,2 mil toneladas. É importante mencionar que o soro causa sérios problemas de poluição quando é descartado diretamente no solo ou em leito de rios, devido à sua alta demanda bioquímica de oxigênio, que pode variar de 40.000 – 60.000 mg kg⁻¹ (BEM-HASSAN e GHALY, 1994).

O soro de leite deixou de ser processado somente para sua simples comercialização evoluindo para sua transformação em uma variedade de produtos com valor agregado muito superior ao soro *in natura* (MOOR e HA, 1993).

A crescente demanda por alimentos cada vez mais nutritivos, acessíveis e com menor custo de produção, tornam o soro uma importante fonte de nutrientes nobres, passíveis de serem recuperados e empregados na elaboração de uma grande quantidade de produtos alimentícios (MAROULIS e SARAVACOS, 2008). Como exemplo, uso em formulações infantis, alimentos para pessoas doentes, em produtos de panificação, entre outros (LIU, 2007).

Dentre as proteínas presentes no soro de leite, duas se destacam pelo seu elevado valor nutricional e funcional, a α -lactoalbumina e a β -lactoglobulina, consideradas quantitativamente as duas mais importantes proteínas do soro (CHATTERTON et al., 2006). Nas últimas décadas, foram desenvolvidos tecnologias e métodos que permitem recuperá-las, em escala industrial, sem perdas significativas em suas funcionalidades, o que representa uma grande vantagem, pois, nesta forma, essas proteínas apresentam-se solúveis em água, facilitando sua adição em formulações alimentícias (LUCENA et al., 2007).

Tabela 1. Composição do soro de leite em função da origem de obtenção (Adaptado de YADA, 2004; CHATTERTON et al., 2006).

Constituinte	Soro Doce (pH 5,8 - 6,5)	Soro ácido (Ph 4,5 – 4,8)
Água (%)	93 - 95	93
Lactose (g L ⁻¹)	47 – 50	47,1
Proteínas (g L ⁻¹)	6,0 – 9,0	6,2 – 7,5
Gordura (g L ⁻¹)	0,3 – 0,5	0,3
Cinzas (%)	0,5 – 0,8	0,69
Ácido Lático (% m/v)	0,15	0,55

3.1.1. Proteínas do Soro de Leite e suas Aplicações

As proteínas do soro de leite apresentam uma estrutura globular contendo algumas pontes de dissulfeto, que conferem um certo grau de estabilidade estrutural. As frações, ou peptídeos do soro, são constituídas de: β -lactoglobulina (β -lg), α -lactoalbumina (α -la), albumina do soro bovino (BSA), imunoglobulinas (Ig's) e glicomacropéptido (GMP). Essas frações podem variar em tamanho, peso molecular e função, fornecendo às proteínas do soro características especiais (SGARBIERI, 2004).

A proteína do leite bovino contém cerca de 80% de caseína e 20% de proteínas do soro, percentual que pode variar em função da raça do gado, da ração fornecida e do país de origem. Sgarbieri (2004) relatou várias atividades dessas proteínas como: imunomoduladora (imunoglobulinas); antimicrobiana (lactoferrina, lactoperoxidase, β -lactoglobulina, α -lactalbumina e imunoglobulinas); antiviral (β -lactoglobulina); anticancerígena (concentrado de proteínas do soro; lactoferrina; β -lactoglobulina); antiúlcera (concentrado de proteínas do soro; α -lactoalbumina) e proteção ao sistema cardiovascular. A Tabela 2 apresenta as principais proteínas presentes no soro de leite e suas propriedades.

Devido às propriedades tecnológicas, funcionais e biológicas específicas de cada uma das proteínas do soro, há um crescente interesse no fracionamento dessas proteínas, pois muitas vezes estas características não se fazem notar nos concentrados protéicos devido às interações com outros componentes presentes (BRAMAUD, 1997).

As duas principais proteínas do soro, α -la e β -lg, são produzidas comercialmente como frações de proteínas isoladas de pureza relativamente alta utilizando diversos procedimentos patenteados ou registrados. Estes tipos de produtos são utilizados como ingredientes alimentícios, tanto por utilidade tecnológica como nutritiva, e são vendidos a preços elevados em lojas especializadas de produtos para atletas ou para pessoas que precisam de dietas especiais (RICHARDS, 2002).

Tabela 2. Composição protéica do soro de leite (Adaptado de MORR e HA,1993; MILLER et al.,2000).

Proteína	Concentração (gL⁻¹)	Ponto Isoelétrico	Massa Molar (Da)
β -lactoglobulina	2,0 – 4,0	5,2	18.283
α -lactoalbumina	0,6 – 1,7	4,8	14.176
Glicomacropéptídeo	1,2 – 1,5	4,7-4,8	7.000
BSA	0,3 – 0,6	4,9	66.267
Imunoglobulinas	0,6 – 1,0	5,5 – 8,3	\geq 146.000
Lactoperoxidase	0,02 – 0,06	9,5 – 9,6	89.000
Lactoferrina	0,05 – 0,1	9,0	78.000

Nos últimos tempos, vem-se estudando o possível papel da α -la na formulação de agente antitumorais (RICHARDS, 2002). Em nível tecnológico, a β -lg tem maior capacidade de gelificação que a α -la (ZYDNEY, 1998). A cadeia de β -lg possui vários pontos de ligação para minerais, vitaminas lipossolúveis e lipídios. Estes pontos de ligação podem ser usados para incorporar compostos lipofílicos desejáveis como tocoferol e retinol (vitamina A) em produtos com baixo teor de gordura. (FOX e McSWEENEY, 1998)

A proteína do leite humano consiste em proteína do soro e caseína na proporção 70:30, enquanto que o leite de bovinos tem a proporção de 20:80. O componente protéico principal do soro no leite humano é a α -la, o restante são BSA, lactoferrina e Ig's. A β -lg, o componente principal da proteína do soro de bovinos (45 % a 57 % m/m) não está presente no leite humano, porém a α -la dos bovinos assemelha-se a do soro humano. Os substitutos de leite humano são compostos formulados para imitar a relação soro:caseína do leite humano, quando o soro de bovinos é adicionado na mistura resulta em elevadas concentrações de β -lg que é um potencial alergênico. Assim, está crescendo o interesse de fabricar fórmulas infantis com níveis reduzidos de β -lg (OUTINEN et al., 1996).

A utilização da α -la em formulações infantis tem sido defendida como forma de tornar a composição desses alimentos mais próximas da composição do leite humano e de criar produtos hipoalergênicos para pessoas que exibem alguma resposta alérgica à β -lg. Além do mais, a α -la tem 4 resíduos de triptofano por molécula e devido à necessidade deste aminoácido para o desenvolvimento do organismo infantil, é mais adequada para a formulação de alimentos para crianças do que os concentrados protéicos (FOX e McSWEENEY, 1998).

Por outro lado, a fração enriquecida de β -lg poderia ter aplicações em larga escala na indústria de alimentos, devido a algumas excelentes propriedades tecnológicas, como por exemplo, gelificação e capacidade de formar espuma (OUTINEN et al., 1996).

Em produtos como sorvetes, flans, pudins e demais tipos de sobremesas, a adição de soro em pó, enriquecido de β -lg conferem propriedades tecnológicas como formação de espumas e géis estáveis e facilidade de aeração do produto (BYLUND, 1995). Em iogurtes, essa proteína contribui na melhoria da textura e consistência do produto, sendo que nos iogurtes light's um dos benefícios mais significativos ao

substituir parte do leite desnatado por concentrado protéico, rico em β -Ig, é a redução no efeito da sinerese durante o período de estocagem do produto (USDEC, 2002).

Entretanto, alguns indivíduos, particularmente as crianças, exibem uma resposta alérgica à β -Ig. Esta sensibilidade não é restrita às crianças, uma pequena população de adultos também pode ser vulnerável a esta condição (YADA, 2004). Assim, há uma necessidade de desenvolver produtos hipoalergênicos também para este público (RICHARDS, 2002).

Dentre todas as proteínas presentes no soro, este trabalho visa fracionar as proteínas em maiores concentrações, isto é, β -lactoglobulina, α -lactoalbumina e glicomacropéptido.

3.1.1.1. α -Lactoalbumina

A α -lactoalbumina (α -la) é uma proteína cujo percentual corresponde a aproximadamente 15% a 25% (m/m) da quantidade de proteínas presentes no soro de leite bovino (aproximadamente 3,5% (m/m) do total de proteínas do leite). É a principal proteína do leite humano e desenvolve um importante papel na síntese da lactose. É uma proteína pequena, cuja massa molar é de $14.176 \text{ g mol}^{-1}$. A α -la possui, em sua estrutura primária, 123 resíduos de aminoácidos, sendo o triptofano o mais abundante nessa proteína, aproximadamente, 6%. É apropriada para a preparação e fortificação nutricional de alimentos e possui um custo relativamente baixo (BRAMAUD et al., 1997). O seu ponto isoelétrico (pI) é 4,8 e é facilmente desnaturada em pH 6,7 à temperatura de $65,2^\circ\text{C}$ (FOX e McSWEENEY, 1998). A partir da α -la são obtidos peptídeos que contém triptofano, precursores da serotonina, uma substância que regula a vigília e o sono (GRASSELLI et al., 1997).

A α -la apresenta forte habilidade de ligação ao íon cálcio e zinco, sendo classificada como uma metaloproteína. À temperatura ambiente e na ausência de cálcio, a estrutura terciária da α -la está parcialmente desdobrada, e grupos hidrofóbicos do interior da proteína se tornam acessíveis ao seu meio externo. Na presença de cálcio, o estado nativo da proteína é recuperado e o interior hidrofóbico se torna novamente inacessível (NOPPE et al., 1999).

3.1.1.2. β -Lactoglobulina

A β -lactoglobulina (β -lg) está presente em maior quantidade no soro de leite, representando cerca de 45% a 57 % (m/m) do total das proteínas do soro e até 12 % (m/m) das proteínas presentes no leite (FOX e McSWEENEY, 1998). Assim, suas propriedades tendem a dominar as propriedades das formulações alimentícias elaboradas a partir do soro de leite.

A β -lg é uma proteína globular, possui massa molar de $18.283 \text{ g mol}^{-1}$, contendo 162 resíduos de aminoácidos, principalmente os sulfurados, o que a confere um elevado valor biológico. Seu ponto isoelétrico é 5,2, é termolábil e apresenta mudanças conformacionais reversíveis a 70°C (MOOR e HA, 1993).

Chatterton et al. (2006), atribuem à β -lg algumas propriedades funcionais, entre as quais pode-se destacar:

- Excelentes características de formação de gel e espuma para aplicações na indústria alimentícia e farmacêutica,
- Atividade antimicrobiana, antiviral e anticarcinogênica,
- Inibição nos processos de adesão microbiana, prevenindo a colonização de patógenos quando nos estágios iniciais da infecção, entre outras.

A β -lg, porém, devido ao fato de não estar presente no leite humano, é apontada como potencial fonte de alergias em crianças, e isso ocorre quando se faz o consumo de alimentos elaborados com leite, soro ou algum de seus derivados contendo essa molécula, razão pelo qual um dos objetivos do processamento das proteínas do soro é a redução de seu conteúdo, ao mesmo tempo em que são retiradas as outras proteínas (GARCÍA et al., 1998; WOOD, 2007).

3.1.1.3. Glicomacropéptido

O glicomacropéptido (GMP) é um péptido composto de 64 aminoácidos, presentes no soro de leite em uma concentração de $1,2\text{-}1,5\text{g L}^{-1}$. Quando o leite é submetido ao tratamento com a enzima quimosina (ou pepsina) durante a fabricação do queijo, ocorre a clivagem da proteína κ -caseína na ligação Phe105-Met106 em dois péptidos, liberando um péptido solúvel de aproximadamente 7000 g mol^{-1} , que

é o GMP. É rica em aminoácidos isoleucina e valina e carece de aminoácidos aromáticos como fenilalanina, triptofano e tirosina (DZIUBA e MINKIEWICZ, 1996; EL-SALAM et al., 1996).

Atualmente várias atividades fisiológicas e biológicas estão sendo atribuídas ao GMP, assim, tem-se aumentado o interesse em isolar e purificar essa proteína. Estudos nos últimos dez anos tem tentado estabelecer o potencial do GMP e a sua forma não-glicosilada (CMP) na regulação da função intestinal (KORHONEN e PIHLANTO, 2006). Lieske, Konrad e Kleinschmidt (2004), estudando a influência do pH e da temperatura no isolamento do CMP por ultrafiltração do soro, verificou que em pH ácido, a sensibilidade do CMP ao aquecimento é maior, enquanto que em pH neutro, o aquecimento produz mudanças negligenciáveis na ligação peptídeo-ácido siálico, assim um elevado grau de atividade biológica é obtido.

Em uma revisão sobre as atividades biológicas do GMP, Brody (2000), destacou a proteção contra toxinas, bactérias, vírus e da regulação do sistema imunológico como áreas mais promissoras no estudo deste peptídeo. Oliva et al. (2002) relataram muitas atividades biológicas atribuídas ao GMP, dentre os quais se incluem: efeito sobre a mobilidade gastrointestinal, a inibição da ligação da toxina da cólera aos seus receptores, efeito sobre o crescimento das bactérias lácticas, efeito sobre a digestão, promoção do crescimento da atividade antitrombótica e da bifidobactéria. Por não conter aminoácidos aromáticos, o GMP pode ser incorporado em alimentos destinados a pacientes com fenilcetanúria (NAKANO et al., 2002). Estudos adicionais têm mostrado que o GMP reduz o apetite, fazendo dele um componente apropriado em produtos utilizados no controle de peso (YVON et al., 1994). Takahashi et al. (1992), relatam a obtenção de um alimento hipoalergênico a base de GMP, com elevado valor nutritivo, facilmente absorvido e digerido e com ação anti-inflamatória.

3.1.1.4. Albumina de Soro Bovino

A Albumina de soro bovino (BSA) tem conformação nativa globular, solúvel em água, formada por uma cadeia polipeptídica com cerca de 580 resíduos de aminoácidos e apresenta peso molecular 66,2 kDa e pI a pH 4,9, sendo sua principal função a de atuar como proteína carreadora para transporte de moléculas apolares em

fluidos biológicos. Em pH abaixo do pI apresenta alterações em suas propriedades físicas e químicas, como aumento da viscosidade intrínseca, volume molecular e redução acentuada de solubilidade em 3 M de KCl (SGARBIERI, 2005).

3.1.1.5. Imunoglobulinas

As imunoglobulinas (Ig), pertencem a família heterogênea das glicoproteínas com massa molecular acima de 146 kDa e ponto isoelétrico na faixa de 5,5 a 8,3. São classificadas em cinco tipos, IgG, IgA, IgM, IgE e IgD, as quais têm sido identificadas no leite e no soro sanguíneo. As Ig estão presentes no leite em concentrações entre 0,6 a 1,0 g L⁻¹, sendo que 80% das Ig são do tipo IgG. Estas proteínas são extremamente termoestáveis devido principalmente às interações com BSA por meio da formação de ligações de dissulfetos, porém exibem alta desnaturação com a temperatura quando em presença da α -La e β -Lg, (SGARBIERI, 2005).

3.1.1.6. Peptídeos Secundários

As sub-frações ou peptídeos secundários das proteínas do soro são assim denominadas por se apresentarem em pequenas concentrações no leite. Compreendem as sub-frações: lactoferrina, beta-microglobulinas, gama-globulinas, lactoperoxidase, lisozima, lactolina, relaxina, lactofano, fatores de crescimento IGF-1 e IGF-2, proteoses-peptonas e aminoácidos livres (SGARBIERI, 2005).

Dentre estas frações menores merece destaque a lactoferrina, que se liga fortemente a dois átomos de ferro, sendo classificada também de metaloproteína, como a α -la. Com o conteúdo normal de ferro essa proteína é bastante resistente a desnaturação térmica e química e à ação enzimática. Possui massa molecular e ponto isoelétrico de aproximadamente 78 kDa e 9,0, respectivamente (VEREDAS, 2000). Por causa do seu alto ponto isoelétrico, a lactoferrina mostra notável tendência para se complexar com outras macromoléculas, tais como DNA, BSA e β -Lg. Devido a esta característica da lactoferrina de fixar o ferro na forma de quelato, ela exerce ação bacteriostática contra microrganismos patogênicos presentes no leite que dependem de ferro livre (SGARBIERI, 1996).

3.2. Métodos de Fracionamento das Proteínas do Soro de Leite

Diferentes métodos para purificar as proteínas do soro têm sido descritos. Os métodos freqüentemente propostos para a separação são: centrifugação, complexação, precipitação, extração em duas fases aquosas, ultrafiltração, cromatografia que envolve técnicas de troca iônica, interação hidrofóbica, afinidade e filtração em gel. O principal objetivo da purificação é a obtenção do máximo rendimento com alta pureza, evitando a perda de atividade e o aumento dos custos efetivos. Os métodos e tecnologias mais empregados para fracionamento e purificação de macromoléculas em particular, proteínas, compreendem: centrifugação (ARMAREGO e CHAI, 2003), complexação (DeWIT e BRONTS, 1995), cromatografia de afinidade, cromatografia utilizando matriz de troca iônica, cristalização, diálise, extração líquido-líquido por sistemas aquosos bifásicos, filtração em gel de agarose e em gel de poliacrilamida, precipitação, ultrafiltração (DEUTSCHER, 1990).

3.3. Separação por Extração Líquido-Líquido

A extração líquido-líquido é uma operação unitária empregada para separar componentes em solução por meio da transferência de massa de tais componentes de uma fase líquida em contato direto com outra fase líquida imiscível a primeira (PERRY, 1997). Essa operação unitária é empregada há cerca de 60 anos na purificação de antibióticos e ácidos orgânicos (PESSOA e KILIKIAN, 2005). É aplicada também nas indústrias química, farmacêutica, metalúrgica, alimentícia e no tratamento de resíduos (CUSACK et al., 1991; COULSON et al., 1996; DA SILVA et al., 2006).

Entretanto, uma desvantagem presente na extração líquido-líquido tradicional (ELT) é o uso de solventes orgânicos que, normalmente, são tóxicos, cancerígenos e/ou inflamáveis. Uma alternativa promissora para substituir a ELT, baseada nos princípios da química verde, são os SAB, constituídos majoritariamente por água, sendo os seus demais componentes formadores (polímeros e sais) não tóxicos nem

inflamáveis, o que os torna um sistema de extração ambientalmente seguro. Além disso, seus constituintes são comercialmente acessíveis e de baixo custo (DA SILVA et al., 2006).

Para a purificação de proteínas os sistemas de duas fases líquidas imiscíveis, constituídas de uma fase aquosa e um solvente orgânico não são adequados devido à sensibilidade dessas biomoléculas à desnaturação promovida pelos solventes orgânicos. Alternativamente à extração em solventes orgânicos, as proteínas podem ser purificadas em sistemas constituídos por duas fases aquosas. A purificação é resultado de uma partição diferenciada da molécula-alvo e impurezas entre as duas fases líquidas (PESSOA e KILIKIAN, 2005).

3.4. Sistemas Aquosos Bifásicos

Os SAB têm adquirido importância e crescente sucesso para a concentração, isolamento e separação de proteínas. Estes sistemas são constituídos por duas fases imiscíveis, que promovem a separação de biomoléculas, em condições amenas e em um ambiente adequado, de forma que sejam preservadas as suas principais características. A alta concentração de água, de 65 % a 90 % em massa, em tais sistemas favorece a estabilidade das proteínas durante a separação, quando comparados com sistemas de extração líquido-líquido tradicionais, compostos com solventes orgânicos.

Os SAB são formados por duas fases líquidas que se encontram em equilíbrio termodinâmico. Resultam, por exemplo, da incompatibilidade de dois polímeros em soluções, como polietilenoglicol (PEG) e dextrana ou entre um polímero e um sal (PEG e Fosfato de Potássio) (COIMBRA, 1995; ALBERTSSON, 1986). Essas espécies químicas quando misturadas em determinadas composições e temperaturas, dividem-se em duas fases de composições diferentes, porém em equilíbrio termodinâmico. As fases possuem propriedades termodinâmicas intensivas distintas, como índice de refração, composição e densidade. Essas fases são separadas por uma interface que é a região onde as propriedades termodinâmicas intensivas de cada fase transitam para valores diferentes, sempre tendendo ao valor daquela propriedade no seio da outra fase em equilíbrio (CARVALHO, 2004). A purificação é resultado de uma partição diferenciada da molécula-alvo e impurezas entre as duas fases líquidas.

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

O primeiro pesquisador a detectar e relatar a possibilidade de formação de sistemas de duas fases em que o principal constituinte de ambas as fases é a água foi Beijerinck, que em 1896, ao misturar soluções aquosas de gelatina e ágar ou gelatina e amido solúvel, em uma dada faixa de temperatura e concentração, observou a formação de misturas turvas que, em repouso, separavam espontaneamente em duas fases líquidas límpidas. A fase mais densa era enriquecida em ágar (ou amido) e a fase superior em gelatina, sendo que a água era o componente majoritário em ambas as fases (ALBERTSSON, 1986).

Contudo, o pioneiro na utilização dos sistemas aquosos bifásicos em processos de separação foi Albertsson, que em 1958, utilizou soluções aquosas de polietilenoglicol e dextrana para a separação de diferentes biomoléculas. Assim, ficou evidente para a comunidade científica a grande potencialidade de aplicação destes sistemas à partição/purificação de materiais biológicos, desde proteínas até células. Desde então, as pesquisas nesta área têm-se aprofundado, tornando a utilização dos SAB importante ferramenta na partição e, ou concentração de compostos como células animais ou vegetais, microorganismos, fungos e seus esporos, cloroplastos, mitocôndrias, membrana vesicular, enzimas, proteínas, ácidos nucleicos, vírus, metais, entre outros (HATTI-KAUL, 2001).

A técnica de separação em SAB é aconselhável para purificação de proteínas em larga escala, pois permite a separação seletiva, uma baixa tensão superficial, boa biocompatibilidade, a possibilidade de aplicação em grande escala e boa relação custo-benefício. Os SAB apresentam ainda, outras vantagens em comparação aos métodos de separação e purificação de biocompostos, como: operação rápida e contínua, altos rendimentos, reciclagem dos polímeros, minimização da desnaturação de proteínas, facilidade de separar materiais particulados e permite concentrar a proteína de interesse em uma das fases controlando o volume das mesmas (CASCONI et al., 1991).

Nas últimas décadas a extração líquido-líquido usando sistemas aquosos bifásicos (SAB) tem sido utilizada na separação/purificação de diversas biomoléculas, como na separação das proteínas do soro (β -lg) em SAB PEG e fosfato (COIMBRA, 1995). Rito-Palomares e Hernandez (1998) estudaram o impacto do uso de soro de queijo na montagem de SAB e sobre a curva binodal, em sistemas contendo PEG1000 e K_2HPO_4 - KH_2PO_4 . Da Silva (2007) realizou uma investigação sobre parâmetros termodinâmicos e o efeito do tipo de sal (fosfato de sódio, sulfato de lítio, citrato de sódio e sulfato de sódio) na partição do glicomacropéptido. Da

Silva e Meirelles (2000) determinaram os coeficientes de partição de BSA, α -La, β -Lg em sistemas polipropileno glicol-maltodextrina.

Diversos fatores como: constituição, tamanho e estrutura molecular do polímero; temperatura; natureza e tamanho da partícula alvo; pH e natureza do eletrólito do sistema bifásico influencia na separação de fases em SAB e, conseqüentemente, o processo extrativo de um determinado biocomposto (ALBERTSSON, 1986). A partição em SAB baseia-se na distribuição seletiva de compostos entre as duas fases. Portanto, a predição e a interpretação da partição de biocomponentes em sistemas aquosos bifásicos é uma tarefa complexa, embora a manipulação das propriedades do sistema tornando predominante um determinado tipo de interação venha a ser uma forma de controlar a partição (HATTI-KAUL, 2001). Por isto, torna-se necessário estudar diferentes SAB para ampliar e facilitar o uso dos mesmos na extração líquido-líquido.

3.4.1. Tipos de Sistemas Aquosos Bifásicos

Os sistemas de duas fases aquosas 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. Existe grande variedade de polímeros hidrófilos, naturais ou sintéticos, capazes de formar fases quando misturados com um segundo polímero ou com um sal. No primeiro grupo podem ser agrupados os sistemas formados por dois polímeros não-iônicos, como polietilenoglicol (PEG)/dextrana, PEG/polivinil álcool, polipropilenoglicol (PPG)/dextrana e Ficoll/dextrana. No grupo seguinte tem-se um polieletrólito e um polímero não-iônico como, carboximetilcelulose de sódio/metil celulose. No terceiro grupo, tem-se os sistemas aquosos formados por dois eletrólitos: sulfato dextrana de sódio/carboximetildextrana de sódio. Por último, em um quarto grupo, tem-se um polímero não-iônico e um composto de baixa massa molar: Copolímeros tribloco/ fosfato de potássio (MONTEIRO et al., 2008), Copolímeros tribloco/ sulfato de sódio (DA SILVA et al., 2006), PPG/fosfato de potássio, PEG/Poliacrilato de sódio (NaPA) (JOHANSSON et al., 2008), PEG/ Ácido Poliacrílico (PAA) (SARAVANAN et al., 2008), PEG/fosfato de potássio, PPG/glicose, PEG/glicose e

PEG/citrato de sódio (PESSOA e KILIKIAN, 2005). A Tabela 3 apresenta exemplos de tipos de sistemas aquosos bifásicos.

Tabela 3. Tipos de sistemas aquosos bifásicos e seus componentes (Adaptado de MOOR e HA, 1993).

Polímero	Polímero
Polietileno glicol	Polipropileno glicol
	Dextrana
	Polivinil álcool
	Maltodextrina
	Dextrana
	Ficoll
Polímero	Componente de baixa massa molar (Sais)
Polietileno glicol	Sais inorgânicos: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{NH}_2\text{CO}_2\text{NH}_4$, Na_2HPO_4 , K_2CO_3 , K_3PO_4 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , Na_2SO_4 , Li_2SO_4 , FeSO_4
Polietileno glicol	Glicose, maltose
Polietileno glicol	Ácido poliacrílico
Polietileno glicol	Poliacrilato de Sódio
Copolímeros tribloco	K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , Na_2SO_4 , Li_2SO_4 , MgSO_4
Polipropileno glicol	Sais inorgânicos: K_2HPO_4 , KH_2PO_4

Teoricamente, todos os tipos de SAB podem ser empregados na separação de biomoléculas, porém, para uso em escala industrial, a dextrana apresenta custo elevado. Os sistemas PEG/sais apresentam vantagens em relação aos sistemas compostos por polímero-polímero-água como custo reduzido, menor tempo de separação de fases e propriedades físicas favoráveis à operação em larga escala, como por exemplo, elevada seletividade e diferenças de densidade e viscosidade entre as fases adequadas para o trabalho com equipamentos de extração disponíveis no mercado. Assim, os sistemas PEG-sal têm sido usados para a extração em larga escala, uma vez que podem ser formados a temperatura ambiente, sendo a fase superior rica em PEG e a fase inferior rica em sal. A separação de fases é atingida mais rapidamente devido a menor densidade da fase salina em relação à fase polimérica, o que facilita o uso de sistemas polímero-sal em aplicações industriais (SALABAT, 2001; GIRALDO-ZUÑIGA et al., 2000; HUSTED et al., 1985).

3.4.2. Constituintes das Fases

3.4.2.1. Polietilenoglicol (PEG)

O polietileno glicol, $\text{HO}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{H}$, é um polímero sintético, hidrofílico, não iônico, de cadeia linear ou ramificada, com massa molar variável e em conjunto com outros polímeros sintéticos, constitui a base para as indústrias de plásticos, embalagens, fibras, adesivos, tintas e esmaltes. É solúvel em água e em vários solventes orgânicos. É produzido mundialmente em grandes quantidades e com massas molares variando de poucas centenas a milhares de daltons. (CARVALHO, 2004).

A nomenclatura PEG é utilizada para compostos de baixa massa molar (abaixo 20000 g mol^{-1}). O PEG é produzido pela polimerização do óxido de etileno com um catalisador solúvel em meio ácido ou básico (mais comum). Os PEG's com massas molares menores que 1000 g mol^{-1} são fornecidos na forma de soluções incolores estáveis ou pastas. Os de massas molares elevadas, acima de 1000 g mol^{-1} , são encontrados na forma de pó ou flocos brancos. PEG's são higroscópicos e absorvem quantidades significativas de água quando expostos a alta umidade. Antioxidantes são frequentemente adicionados ao PEG para evitar decomposição oxidativa (ALVES, 2003).

Em aplicações biotecnológicas, a utilização do PEG é de grande interesse, principalmente por excluir, em ambiente aquoso, outros polímeros de sua vizinhança, não se solubilizando com eles. Por serem compostos biodegradáveis e atóxicos, a descarga de PEG não é problemática para o meio ambiente. Uma propriedade do PEG muito importante para sua aplicação comercial é sua atoxicidade. O PEG foi aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration), sendo considerado não antigênico nem imunogênico. Estas características têm permitido a larga utilização de PEG e seus derivados em cosméticos, sabões e medicamentos. É importante destacar que na indústria de alimentos, é regulamentada a sua utilização como veículo em adoçantes de mesa e em suplementos vitamínicos e ou minerais (BRASIL, 2005). Possivelmente, essa característica do PEG ser inerte está relacionada à manutenção da viabilidade das células sujeitas à partição em sistemas aquosos bifásicos.

O polietileno glicol, (Figura 1), é formado por unidades de óxido de etileno, em que cada unidade contém sítios ativos (oxigênios portadores de pares de elétrons

livres), onde são formadas as interações com as moléculas de água e com os íons dissociados do sal (cátions e ânions).

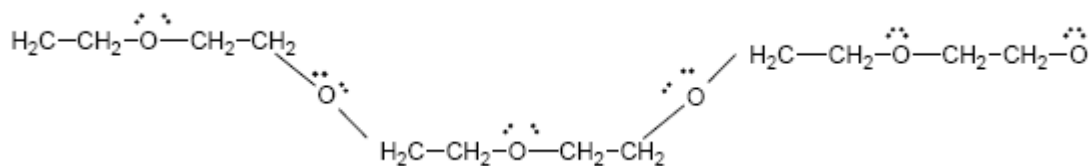


Figura 1. Representação planar parcial da molécula de PEG com os sítios disponíveis para as interações com os demais componentes do sistema.

3.4.3 Sais

3.4.3.1. Citrato de Sódio

O citrato de sódio ou citrato trissódico ($C_6H_5Na_3O_7$), apresenta-se na forma de cristais brancos, inodoros e estáveis em ar. É normalmente comercializado na forma de citrato trissódico dihidratado, com massa molar de $294,10 \text{ g mol}^{-1}$. Apresenta solubilidade de $42,5 \text{ g}/100\text{mL}$ em água a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Possui pH entre 7,5 e 9,5 a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ quando em solução de 50 g L^{-1} de citrato trissódico dihidratado em água. É usado em fotografia como agente seqüestrante para remover traços de metais, como anticoagulante e na indústria de alimentos como emulsificante, acidulante e seqüestrante (MERCK, 2009). Citrato de sódio é biodegradável, atóxico e pode ser descarregado em plantas de tratamento biológico de água residuária (ALVES, 2003).

3.4.3.2. Fosfato de Potássio Monobásico e Dibásico

O Fosfato de Potássio dibásico (K_2HPO_4) é branco, higroscópico, solúvel em água e ligeiramente solúvel em álcool. Pode ser convertido em pirofosfato por ignição. A solução aquosa formada com este sal é ligeiramente alcalina (pH entre 8,7 e 9,3 quando em solução de 50 g/L de água). Possui solubilidade em água igual a $160 \text{ g}/100 \text{ mL}$ a 20°C (SIGMA-ALDRICH, 2009). O fosfato de potássio monobásico ($KHPO_4$) também possui a cor branca e é granulado. Apresenta solubilidade em água igual a $22,2 \text{ g}/100 \text{ mL}$ a 20°C . É insolúvel em álcool. Apresenta pH entre 4,4 e 4,7 quando em solução de 50g/L de água.

3.4.3.3. Sulfato de Lítio

O sulfato de lítio (Li_2SO_4) possui solubilidade de 34,8 g/100mL em água a 20°C (MERCK, 2009). É um componente de interesse tecnológico com aplicações na detecção de radiação a laser, como um elemento ótico de transmissão de imagens, na fabricação de cristais de alta resistência na indústria farmacêutica. Este sal pode ser também utilizado na recuperação de soluções com a adição de agentes precipitantes, como anti-solventes, em função da sua solubilidade invertida e da pequena variação da solubilidade com a temperatura. Esta técnica é uma alternativa para a recuperação deste sal visando substituir a precipitação por congelamento e evaporação (TABOADA, 2002).

3.4.4. Diagrama de Equilíbrio do Sistema Aquoso Bifásico

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. Para a utilização de SAB é necessário o conhecimento do comportamento das fases nos sistemas. Para isto são efetuados os diagramas de fases para os componentes, nos quais as composições dos constituintes para a separação das fases são determinadas. A representação gráfica dos dados de composição de fases do 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 & CABEZAS JR., 1996). A Figura 2 representa um exemplo de diagrama de fases, mostrando a composição das fases em equilíbrio em coordenadas retangulares.

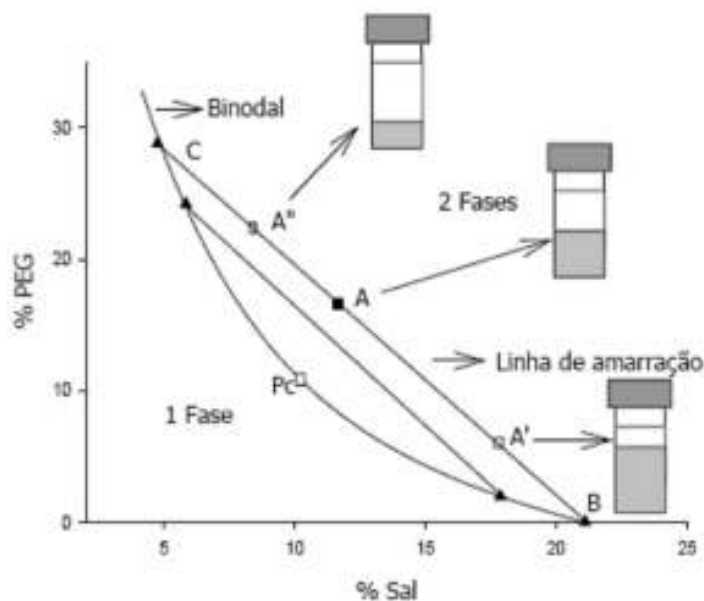


Figura 2. Diagrama de fase para sistemas aquosos bifásicos, expresso em coordenadas retangulares.

Por convenção, os componentes presentes em maior quantidade nas fases inferior e superior são representados no eixo das abscissas e das ordenadas, respectivamente. A quantidade de água é calculada por diferença. A curva que divide a região em duas fases é chamada de curva binodal ou curva de equilíbrio. A região acima da curva binodal é chamada de bifásica e a abaixo, monofásica (ALBERTSSON, 1986).

As linhas de amarração (“tie lines”) são representadas como as retas que ligam pontos no diagrama que representam a composição das duas fases em equilíbrio. Qualquer conjunto de pontos que pertençam à região bifásica e que estejam sobre a mesma linha de amarração fornecerá fases superiores que possuirão propriedades termodinâmicas intensivas iguais (densidade, volume molar, entalpia molar, etc.), entretanto, sendo distintas as suas variáveis termodinâmicas extensivas (massa, volume, etc.). Aplica-se o mesmo raciocínio para as fases inferiores formadas a partir de composições globais localizadas sobre uma mesma linha de amarração (ZASLAVSKY, 1995, DA SILVA e LOH, 2006).

Para o estudo da separação de fases em SAB, faz-se uso de uma medida numérica de referência para a composição das fases. O comprimento da linha de amarração, usualmente referido como TLL, é um valor empírico adequado para a utilização como tal medida. O valor TLL pode ser calculado, a partir das concentrações dos componentes nas fases, pela equação (1):

$$TLL = \sqrt{[\Delta PEG]^2 + [\Delta Sal]^2} \quad (1)$$

em que $[\Delta PEG]$ e $[\Delta Sal]$ correspondem a diferença de concentração de PEG e sal nas fases superior e inferior expressa em % em massa, respectivamente (CARVALHO, 2004).

O ponto crítico (P_c) é um outra particularidade de um diagrama de fases. Este ponto é aquele no qual as propriedades físico-químicas (composição e volume, dentre outras) das duas fases são teoricamente iguais (ALBERTSSON, 1986). Quanto mais a composição do sistema se aproxima do ponto crítico, menor é a diferença entre as fases, ou seja, no ponto crítico as composições e os volumes entre as fases teoricamente são iguais. No entanto, nas proximidades do ponto crítico, pequenas alterações na composição dos sistemas provocam drásticas mudanças, levando o sistema de uma para duas fases e vice-versa (ALBERTSSON, 1986).

3.4.5. Variáveis que Influenciam a Partição em Sistema Aquoso Bifásico

São diversas as variáveis que influenciam a partição de biomoléculas entre as duas fases do SAB. Essas variáveis podem ser classificadas como inerentes ao próprio sistema (por exemplo: componentes do sistema, massa molar do polímero, concentração do polímero ou do sal, pH e temperatura) ou à proteína alvo (por exemplo: hidrofobicidade, distribuição de cargas, ponto isoelétrico e massa molar) (COSTA et al., 1998; COSTA et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2003; TUBIO et al., 2004). Os mecanismos que governam a partição de materiais biológicos não são ainda entendidos por completo, sabe-se que o coeficiente de partição é resultante de forças de van der Waals, hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e interações iônicas das biomoléculas com as fases do sistema (GÜNDÜZ e KORKMAZ, 2000).

3.4.5.1. Massa Molar e Concentração do Polímero

Geralmente, o aumento da massa molar do polímero do sistema de duas fases aquosas, para uma determinada composição de fases, diminui a partição de material biológico para a fase rica em polímero. Quanto maior for a massa molar do polímero, menor é o volume de solvente disponível, o que implica em uma diminuição de

solubilidade das proteínas na fase rica em polímero e conseqüentemente uma diminuição do coeficiente de partição (ALBERTSSON, 1986).

O efeito da massa molar dos polímeros por sua vez depende da massa molar da biomolécula a ser separada. No caso de proteínas, aquelas com massas molares maiores são mais influenciadas pelas mudanças na massa molar dos polímeros que as proteínas com pequena massa molar (ASENJO, 1990). O PEG é capaz de excluir (teoria do volume excluído) as proteínas sem desnaturação de acordo com o aumento de sua massa molar. O mesmo efeito não pode ser observado quando as moléculas menores de proteínas são utilizadas (SCHMIDT et al., 1996). A massa molar do polímero influencia na separação do biomaterial por alteração do diagrama de fase (isto é, por influenciar a composição das fases) e por mudança no número de interações polímero-proteína. Em geral, o aumento na massa molar de um dos polímeros (em sistemas polímero e polímero) levará a uma separação mais acentuada do material em outra fase. Entretanto, a magnitude desse efeito decresce com o aumento da cadeia do polímero (ALBERTSON, 1986; FORCINITI e HALL, 1991).

Com relação à concentração do polímero, tem sido demonstrado que o sistema de fases desloca-se em direção à região bifásica com o aumento da concentração do polímero. A viscosidade das fases também aumenta com o aumento na concentração do polímero e isto pode influenciar a partição da proteína alvo (ASENJO, 1990; ALBERTSSON, 1986).

3.4.5.2. pH

O pH, indiretamente, pode afetar a partição de uma proteína e modificar a composição das fases dos SAB, seja a posição da linha binodal, seja o comprimento da linha de amarração. Em relação à partição de proteínas, o pH altera as cargas da superfície das proteínas e, conseqüentemente, o seu coeficiente de partição (DA SILVA & LOH, 2006). Um exemplo clássico é a desnaturação de proteínas devido à redução de pH. A distribuição de proteínas desnaturadas em soluções líquidas é diferente daquela obtida em seu estado natural, por apresentarem área superficial significativamente maior que na forma nativa. Contudo, a influência da carga da biomolécula depende muito do tipo de sal presente no sistema, uma vez que

diferentes sais dão origem a diferentes potenciais elétricos entre as fases (ALBERTSSON, 1986).

Variações no valor de pH podem também induzir mudanças conformacionais na estrutura das proteínas, causando mudança em seus comportamentos de separação. Em condições extremas de pH é possível que ocorra a desnaturação das proteínas. Geralmente, a partição de proteínas desnaturadas é diferente da partição das mesmas proteínas na forma nativa, o que pode ser atribuído não só a maior área superficial da forma desnaturada, mas também ao fato da superfície exposta desta ser muito mais hidrofóbica. Como regra geral as proteínas carregadas mais negativamente (nos casos em que o pH é superior ao pI) tem maior afinidade pela fase superior que é rica em PEG (ALBERTSSON, 1986, FORCINITI e HALL, 1991).

3.4.5.3. Tipo e Concentração de Sal

A adição e composição do sal é outra variável de grande importância na partição de biocomponentes (COSTA et al., 1998). Sais que possuem distribuição diferenciada entre as duas fases são importantes para o sistema, pois eles terão grande influência na diferença de potencial elétrico entre as fases. A adição de sais, mesmo que em concentrações milimolares, influencia fortemente a partição de materiais eletricamente carregados. Embora os sais se distribuam quase que igualmente entre as fases, existem pequenas diferenças nos coeficientes de partição de diferentes sais, o que significa que diferentes íons possuem diferentes afinidades pelas fases, criando uma diferença de potencial elétrico entre as fases, que por sua vez direciona a partição de materiais biológicos carregados (SARUBBO, 2000).

3.4.5.4. Temperatura

A influência da temperatura é bastante complexa devido ao seu efeito na composição das fases em equilíbrio, assim como a alteração da estrutura da biomolécula e desnaturação (SARUBBO, 2000). A temperatura pode levar a mudanças na viscosidade das fases ou na estrutura dos polímeros alterando a forma da curva binodal no diagrama de fases (CARVALHO, 2004). Os sistemas com

constituição próxima da composição do ponto crítico são mais afetados por mudanças de temperatura, devido à instabilidade inerente a essa região. Um deslocamento da curva binodal pode levar, facilmente, o sistema para a região monofásica (BAMBERGER et al., 1985).

O efeito da temperatura varia de acordo com o tipo de sistema, polímero e polímero ou polímero e sal. Para o sistema PEG e dextrana, foi constatada que com o aumento da temperatura era necessária uma concentração maior dos polímeros para a separação das fases. Neste caso, para que a separação das fases seja favorecida, deve-se trabalhar em temperaturas inferiores à ambiente. Já para PEG e sal, ocorre justamente o contrário, pois em temperaturas maiores ou próximas à ambiente a separação das fases do sistema é facilitada. Foi observado também para o sistema PEG e sal, que o aumento da temperatura favorece o aumento da concentração de PEG na fase superior do sistema e conseqüentemente ocorre uma redução da concentração do polímero na fase inferior (FORCINITI e HALL, 1991; ZASLAVSKY, 1995). Alguns trabalhos relatam um aumento do coeficiente de partição com a temperatura (JOHANSSON et al., 1984); em outros entretanto, não foram encontrados relação entre o coeficiente de partição e a temperatura (TJERNELD et al., 1985), demonstrando a necessidade de estudos mais aprofundados para se esclarecer o efeito deste parâmetro sobre a partição.

3.4.6. Coeficiente de Partição

Quando materiais biológicos são adicionados em SAB, estes distribuem-se entre as duas fases, sem perda da atividade biológica. A relação entre as concentrações de certa biomolécula nas fases superior e inferior do SAB define o coeficiente de partição (K) em sistemas aquosos (ALBERTSSON, 1986):

$$K = \frac{[C]_{\text{sup}}}{[C]_{\text{inf}}} \quad (2)$$

onde $[C]_{\text{sup}}$ e $[C]_{\text{inf}}$ são as concentrações de equilíbrio do soluto na fase superior e inferiores, respectivamente.

Segundo Diamond e Hsu (1989), o coeficiente de partição pode ser expressado da seguinte forma:

$$K = K_{\text{amb}} + K_{\text{est}} \quad (3)$$

em que K_{amb} e K_{est} representam as contribuições dos fatores ambiental e de ordem estrutural respectivamente. Dentre os fatores ambientais estão consideradas propriedades do SAB, como tipo e concentração de sais, tipo, concentração e massa molar do polímero, pH, temperatura e ligantes específicos. Albertsson (1986), propôs o seguinte modelo para o cálculo de K , desmembrando-o em:

$$\ln K = \ln K_{el.} + \ln K_{hidrof.} + \ln K_{hifil.} + \ln K_{conf.} + \ln K_{lig.} \quad (4)$$

em que os índices *el.*, *hidrof.*, *hifil.*, *conf.* e *lig.* referem-se às contribuições eletrostáticas, hidrofóbicas, hidrofílicas, de conformação e de interação com os ligantes, respectivamente.

Diversos estudos sobre a partição das proteínas do soro em SAB foram realizados, como por exemplo, Alves et al. (2000), avaliaram a partição das proteínas do soro em sistemas PEG 1500/fosfato de potássio. Monteiro, et al. (2008) estudaram a partição de α -La, β -Lg por extração no ponto de névoa, em SAB compolímeros triblocos L31 e PE61/ fosfato de potássio. Zuñiga et al. (2001), avaliaram a influência de massa molar do polímero sobre a partição de α -La e β -Lg em SAB compostos por PEG1500, PEG4000, PEG6000, PEG8000 e fosfato de potássio. Boaglio et al. (2006), investigaram o comportamento da partição de BSA, α -La, β -Lg em função das diferentes massas molares do PEG (1000, 1450 e 3350) e pH (5,2, 6,2 e 8,2). Capezio et al. (2005), realizaram uma investigação sobre o comportamento da partição do BSA, α -La, β -Lg em sistemas PEG1000, PEG1500, PEG3350 e fosfato de potássio.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Engenharia de Processos do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG.

4.1. *Materiais*

O soro de queijo tipo Minas frescal empregado nos experimentos foi obtido nas dependências do Laticínio FURNARBE/UFV. O soro foi preparado inicialmente, submetendo-o a uma centrifugação para remoção de partículas e glóbulos de gordura.

A α -lactoalbumina e β -lactoglobulina com elevado grau de pureza foram adquiridas da Sigma Aldrich (EUA). O glicomacropéptido foi adquirido da Davisco Foods International (EUA).

Os sais escolhidos para a montagem dos SAB foram: citrato de sódio, fosfato de potássio e sulfato de lítio. O citrato foi usado devido a suas baixas propriedades poluentes. Sistemas PEG/fosfato são os mais utilizados em biotecnologia de purificação de proteínas devido ao seu baixo custo e a possibilidade de reciclagem dos componentes. O sulfato foi usado pela sua habilidade em promover interações hidrofóbicas entre proteínas (SU e CHIANG, 2006).

Reagentes

Os reagentes utilizados na realização do experimento foram: polietilenoglicol (PEG) massa molar média 2000 g mol^{-1} (Sigma Aldrich, EUA); fosfato de potássio P.A (monobásico e dibásico, VETEC, Brasil); sulfato de lítio monohidratado (VETEC, Brasil); ácido Cítrico (VETEC, Brasil); citrato de sódio dihidratado (VETEC, Brasil); ácido Clorídrico (ISOFAR, Brasil); cloreto de Sódio (Sigma Aldrich, EUA). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Nos experimentos foram empregados água ultrapura (sistema Milli-Q, Millipore Inc., EUA) e reagentes químicos de grau analítico ou cromatográfico.

Equipamentos

Os equipamentos utilizados durante a condução dos experimentos foram: agitador de tubos tipo Vortex; banho de ultra-som (Branson); equipamento de purificação de água MilliQ[®] (MilliPore[®]), balança analítica (AUX220, Shimadzu[®], USA); pHmetro de bancada (HI 221, HANNA instruments, Brasil); centrífuga (5804, EPPENDORF, Alemanha); estufa B.O.D (Eletrolab, modelo 101M/3, Brasil); espectrofotômetro (Biomate 3, Thermo Scientific, USA); cromatógrafo HPLC (Shimadzu[®]); tubos Eppendorf[®] de 15 mL e 50 mL; pipetas automáticas; vidrarias diversas.

4.2 Métodos

4.2.1 Planejamento Experimental

Para o desenvolvimento do experimento, o mesmo foi dividido em três etapas, a fim de possibilitar a melhor avaliação dos resultados a serem obtidos.

Na primeira etapa avaliou-se a influência dos fatores principais (pH, temperatura, concentração de PEG, concentração de sal e concentração molar de NaCl) sobre a partição das proteínas do soro (variável dependente). Para tanto, aplicou-se um delineamento fatorial fracionado (2^{5-1}) com duas repetições e 4 pontos centrais (a fim de se estimar o erro experimental). Este tipo de delineamento constitui-se de um número pequeno e pré - determinado de experimentos, que combinam adequadamente os fatores nos diferentes tratamentos para avaliar efeitos principais dos fatores em estudo (BIASOLI, 2005). Os experimentos foram conduzidos no delineamento inteiramente casualizado.

Os fatores e níveis estudados no delineamento fatorial fracionado (2^{5-1}) são apresentados na Tabela 4.

A determinação das condições experimentais dos SAB estudados bem como os dados de equilíbrio destes sistemas foram baseados em diagramas de fases obtidos

na literatura (SILVA, 1997; CARVALHO, 2004; OLIVEIRA, 2006) e na realização de experimento prévio. Os valores de pH e temperatura escolhidos foram distantes do ponto isoelétrico e da temperatura de desnaturação das proteínas estudadas (MORR & HA, 1993; MILLER et al., 2000).

Tabela 4 – Fatores e níveis do delineamento fatorial fracionado (2^{5-1})

Fator	Nível		
	-1	0	+1
pH	6,0	7,0	8,0
Temperatura (°C)	25	35	45
Concentração de PEG 2000 g.mol ⁻¹ (% m/m)	13	14,5	16
Concentração de citrato de sódio (% m/m)	13	14,5	16
Concentração molar de NaCl	0,0	0,1	0,2

As condições experimentais testadas no delineamento fatorial fracionado 2^{5-1} são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 – Condições experimentais testadas no fatorial fracionado 2^{5-1}

pH	NaCl (M)	Temperatura (°C)	% PEG 2000	% Sal
6,0	0,0	25	13	16
8,0	0,0	25	13	13
6,0	0,2	25	13	13
8,0	0,2	25	13	16
6,0	0,0	25	16	13
8,0	0,0	25	16	16
6,0	0,2	25	16	16
8,0	0,2	45	16	13
6,0	0,0	45	13	13
8,0	0,0	45	13	16
6,0	0,2	45	13	16
8,0	0,2	45	13	13
6,0	0,0	45	16	16
8,0	0,0	45	16	13
6,0	0,2	45	16	13
8,0	0,2	45	16	16

7,0	0,1	35	14,5	14,5
7,0	0,1	35	14,5	14,5
7,0	0,1	35	14,5	14,5
7,0	0,1	35	14,5	14,5

Os dados obtidos no experimento fatorial fracionado foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), ao nível de significância de 5%.

Na segunda etapa, empregou-se um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) combinado à metodologia de superfície de resposta, no qual foram avaliados os fatores significativos ($p < 0,05$) para o coeficiente de partição da β -lg, a fim de se determinar as condições de otimização da partição das proteínas do soro (α -la, β -lg e GMP) em SAB, em especial, obter as condições de mínimo de coeficiente de partição para a β -lg. A Tabela 6 apresenta as condições experimentais testadas no DCCR 2². As condições para a partição das demais proteínas (α -la e GMP) foram fixadas de acordo com o Delineamento Composto Central Rotacional estabelecido para a partição da β -lg.

Tabela 6 – Condições experimentais testadas no Delineamento Composto Central Rotacional

pH	NaCl (M)	PEG (%)	SAL (%)	TEMP (°C)
5,29	0,3	13	13	25
5,5	0,2	13	13	25
5,5	0,4	13	13	25
6,0	0,159	13	13	25
6,0	0,3	13	13	25
6,0	0,3	13	13	25
6,0	0,3	13	13	25
6,0	0,3	13	13	25
6,0	0,441	13	13	25
6,5	0,2	13	13	25
6,5	0,4	13	13	25
6,71	0,3	13	13	25

Os resultados foram submetidos a análise de regressão e então foram obtidos modelos matemáticos, que predizem os valores do coeficiente de partição das proteínas em função dos níveis dos fatores testados. Por meio da avaliação das superfícies de resposta obtidas, determinaram-se as condições em que o coeficiente de partição da β -lg é minimizado.

Por fim, avaliou-se o fracionamento das proteínas do soro *in natura* (α -lactoalbumina, β -lactoglobulina e glicomacropéptido) em SAB, na melhor condição pré-determinada por meio da análise da superfície de resposta, utilizando o processo de extração em batelada, em tanques agitados. O processo de fracionamento das proteínas do soro foi conduzido em sistema de extração multiestágios, em fluxo cruzado, sendo avaliadas diferentes diluições do soro adicionado aos sistemas. Os experimentos foram realizados em três repetições. Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente por meio da Análise de Variância (ANOVA).

O módulo utilizado para a construção da matriz com as condições experimentais testadas em cada delineamento (fatorial fracionado 2^{5-1} e DCCR 2^2) foi o SAS 9,0 / ADX® (Interface for Design of Experiments).

Todas as análises estatísticas foram realizadas no pacote estatístico *Statistical Analysis System*® versão 9,0, procedimento RSREG (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), licenciado pela Universidade Federal de Viçosa. A confiabilidade da equação do modelo quadrático obtido foi avaliada verificando-se a falta de ajustamento do modelo (FAJ), o coeficiente de determinação R^2 , o resultado das análises de variância (ANOVA) e o nível de significância estatístico ($p < 0,05$) pelo teste de Fisher (F). Os coeficientes do modelo foram analisados empregando o procedimento GLM e REG (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) e o nível de significância dos coeficientes da regressão foi obtido pelo teste de Student (t).

4.2.2 Metodologia Experimental

4.2.2.1 Preparo do Sistema Aquoso Bifásico

Para a montagem dos SAB, foram preparadas soluções estoque PEG em água e sal em água (citrato de sódio, fosfato de potássio ou sulfato de lítio). A concentração da solução estoque de PEG foi de 60% em massa. A concentração da solução estoque de citrato foi de 25% em massa. Já para as soluções de fosfato e

sulfato a concentração foi de 20% em massa. Os valores de pH das soluções estoques de citrato e sulfato foram ajustados com ácido cítrico (60% em massa) e ácido clorídrico (1 M), respectivamente. Para o fosfato, utilizou-se a proporções adequadas de fosfato de potássio monobásico e dibásico. Os valores de pH das soluções estoques foram ajustados e conferidos em pHmetro (HI 221, HANNA instruments, Brasil) até se obterem os valores desejados.

Cada sistema foi obtido adicionando, em tubos de centrifuga de 50 mL, uma quantidade adequada das soluções estoques de PEG e sal de forma que se obteve uma massa total fixa para o sistema de 25 g. Por exemplo, um sistema a 25° C, contendo PEG 2000 a 13% em massa e fosfato de potássio a 13% em massa, em pH 6,0 foi preparado da seguinte forma: pesou-se em um tubo aproximadamente 5,417 g de solução estoque de PEG 2000 (60% em massa), adicionou-se 16,25 g de solução estoque de fosfato de potássio (20% em massa), completando com água destilada e deionizada até que se atingiu uma massa final de 25 g. A mistura resultante foi agitada em agitador vortex por aproximadamente 2 minutos e centrifugada a 2000×g por 20 minutos (Eppendorf Mod. 5804, Alemanha). Na seqüência, o sistema foi mantido em repouso por cerca de 24 h em uma estufa B.O.D (Eletrolab, modelo 101M/3, Brasil), na temperatura de trabalho estabelecida, para se alcançar o equilíbrio das fases. Após isto, as fases resultantes foram coletadas por meio de uma pipeta automática de 5 mL e acondicionadas separadamente, para posterior montagem dos SAB nos quais foram realizados os experimentos de partição.

4.2.2.2. Experimentos de Partição

Os experimentos de partição foram conduzidos em tubos de centrifuga de 15 mL, usando 2,5 mL das fases superior e inferior dos SAB pré-equilibrados, de acordo com cada condição experimental definida.

Adicionou-se aos tubos um volume de 50 µL de uma solução de proteína pura (50 mg/mL), os quais foram agitados em agitador vortex. Subsequentemente, os sistemas foram centrifugados a 4000×g por 15 minutos e os tubos foram mantidos em repouso em estufa BOD (Eletrolab, modelo 101M/3, Brasil) por 18 h em temperatura controlada. Em seguida, as fases superiores e inferiores foram coletadas com uma pipeta automática de 1 mL e com seringa de 5 mL, respectivamente, e

aconditionadas separadamente. Posteriormente, realizaram-se as análises de quantificação das proteínas presentes em cada fase.

A concentração de proteína em cada fase foi quantificada pelo método de Bradford (1976) através da leitura de absorbância em um comprimento de onda de 595 nm. A distribuição das proteínas nas fases do sistema foi determinada a partir do coeficiente de partição (equação 2).

4.2.2.3. Fracionamento das Proteínas α -Lactoalbumina, Glicomacropéptido e β -Lactoglobulina a partir de Soro de Leite *in natura*

Nos experimentos de fracionamento das proteínas (α -la, GMP e β -lg) usando o soro *in natura*, os sistemas foram obtidos adicionando-se em tubos de centrífuga de 50 mL, quantidades adequadas das soluções estoque de PEG e solução salina de forma a obter-se uma massa total fixa de 30 g. Quanto às condições do sistema, utilizou-se a condição ótima obtida por meio da análise de superfície de resposta para o sistema PEG2000/fosfato.

O soro *in natura* foi adicionado diretamente na fase salina, durante a montagem dos sistemas, num volume de 3,0 mL (em massa, tal volume correspondeu a um valor próximo de 3 g), na forma integral e nas proporções de diluição de 1:1 (1,5 mL:1,5 água) e 1:3 (0,750 mL:2,25 água), representando aproximadamente 10% da massa total do SAB. Os sistemas foram submetidos à agitação durante um período de 30 minutos, numa velocidade adequada para mistura completa do sistema e então centrifugados a $2000\times g$ por 20 minutos (Eppendorf Mod. 5804, Alemanha), para acelerar a separação das fases. Subsequentemente, os tubos foram mantidos em repouso, em estufa B.O.D (Eletrolab, modelo 101M/3, Brasil), durante 4 h, na temperatura de operação estabelecida.

Posteriormente, foram coletadas alíquotas de 0,5 mL de cada fase e acondicionada em frasco apropriado para análise das proteínas por CLAE. Os experimentos foram realizados em 3 repetições.

O fracionamento das proteínas foi conduzido em um processo de extração de três estágios, em fluxo cruzado, de tal forma que em cada estágio tinha-se a adição da fase polimérica, isenta de proteína e de fase salina. Em cada estágio houve a formação de duas fases, denominadas de extrato e refinado. Alíquotas de cada uma

das fases foram retiradas para posterior análise das proteínas por CLAE. A Figura 3 mostra uma representação esquemática do processo.

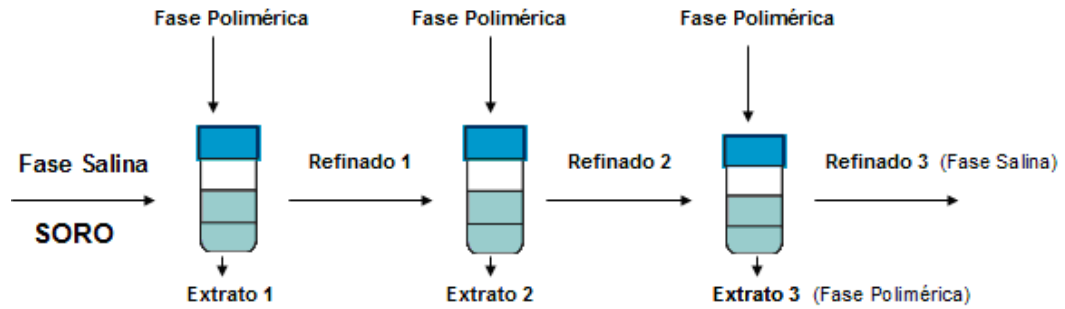


Figura 3 – Representação esquemática dos 3 estágios de extração líquido-líquido em SAB, em batelada.

O conteúdo de α -lactoalbumina, β -lactoglobulina e glicomacropéptido presentes no soro *in natura* e em cada uma das diluições do soro empregadas e em ambas as fases (superior e inferior) coletadas, foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Após isto, calculou-se a taxa de redução (TR) pela equação 5 para a α -la, na fase salina, após os três estágios de extração:

$$TR = \frac{C_{\alpha 0}}{C_{\alpha 3}} \quad (5)$$

$C_{\alpha 0}$ é a concentração de α -la na fase salina inicial e $C_{\alpha 3}$ é a concentração de α -la na fase salina após os três estágios de extração.

O fator de purificação (FP) da β -lg na fase salina foi determinado pela equação 6 (VEREDAS, 2000):

$$FP = \frac{C_{\beta 3}}{C_{\beta 0}} \times 100 \quad (6)$$

$C_{\beta 0}$ é a concentração de β -lg na fase salina inicial e $C_{\beta 3}$ é a concentração de β -lg na fase salina após os três estágios de extração.

O rendimento de extração (Y) da α -la e β -lg, foi determinado pela equação 7:

$$Y(\%) = \frac{C_P}{C_T} \times 100 \quad (7)$$

C_P é a concentração da proteína-alvo, presente preferencialmente na fase superior ou inferior após o terceiro estágio de extração, C_T é a concentração total da proteína-alvo adicionada ao sistema.

4.2.3 Metodologia Analítica

4.2.3.1 Análise da Proteína por Espectrofotometria

As concentrações de proteínas puras particionadas em cada fase foram determinadas segundo o método de Bradford (1976), por meio da leitura da absorbância no comprimento de onda de 595 nm, em espectrofotômetro UV-Vis (Biomate 3, Thermo Scientific, USA). A curva analítica foi construída usando como padrão as proteínas puras α -lactoalbumina, β -lactoglobulina e glicomacropéptido, variando a concentração de proteína de 0 mg mL⁻¹ a 1 mg mL⁻¹. Para todas as curvas analíticas os coeficientes de determinação R² apresentaram valores superiores a 0,99.

4.2.3.2 Análise da Proteína por Cromatografia Líquida de Alta eficiência

A quantificação da concentração das proteínas do soro *in natura* (α -la, β -lg e GMP) nas fases salina e polimérica foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), conduzida em cromatógrafo líquido (Shimadzu[®], Japão) provido de um detector de feixe de diodos, duas bombas de alta pressão, forno, auto-injetor de amostras e software de aquisição e análise de dados (Class-VP 6,0). As proteínas foram detectadas em um detector de feixe de diodos, com comprimento de onda fixo em 210 nm. O método utilizado foi: coluna de fase reversa (C18, Shimadzu) Shim-pack VP-ODS (250 x 4,6) mm, fase móvel composta por solução aquosa de NaCl (0,15 molL⁻¹, pH 2,5) e acetonitrila 100%, a uma vazão de 1 mLmin⁻¹. As soluções aquosas de NaCl e acetonitrila foram filtradas em membrana MilliPore[®] de 0,45 μ m, e membrana de acetato de celulose de 0,2 μ m, respectivamente. Em seguida, essas soluções foram desgaseificadas. A Tabela 7 apresenta o gradiente utilizado.

Tabela 7 – Programação do gradiente da fase móvel

Concentrações iniciais	Concentrações finais	Tempo de Duração (min.)
100% A, 0% de B	64% A, 36% B	3
64% A, 36% B	45% A, 55% B	18
45% A, 55% B	45% A, 55% B	2
45% A, 55% B	100% A, 0% B	10

Todas as amostras foram previamente filtradas em membrana MilliPore® de 0,45 µm, sendo injetado um volume de 20 µL com fluxo de 1 mLmin⁻¹ com tempo de corrida de 33 minutos.

Para todos os sistemas foram realizados cálculos de balanço de massa (equação 8) a fim de verificar o erro experimental (%).

$$erro(\%) = \frac{(m_s + m_i) - m_T}{m_T} \times 100 \quad (8)$$

em que m_s é a massa de proteína na fase superior, m_i é a massa de proteína na fase inferior e m_T é a massa total de proteína adicionada no sistema.

4.2.3.3. Caracterização da Composição Química do Soro

As análises relativas à caracterização da composição química do soro *in natura* foram realizadas em triplicata. As amostras foram homogeneizadas, deixadas à temperatura ambiente e então analisadas. A análise de acidez total titulável expressa em % de ácido láctico foi determinada segundo as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 1985).

As medidas de pH foram feitas utilizando-se um pHmetro de bancada, devidamente calibrado. As proteínas foram quantificadas por CLAE. A determinação do teor de lactose presente no soro foi feita utilizando o método de DNS (3-5 ácido di-nitro salicílico), de acordo com Miller (1959).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Avaliação da Partição das Proteínas do Soro

Sistemas aquosos bifásicos compostos por PEG 2000/sal foram aplicados para investigar o comportamento de partição das proteínas do soro (α -la, β -lg e GMP), utilizando um delineamento fatorial fracionado 2^{5-1} a fim de investigar o efeito da concentração do PEG e do citrato, do pH, da temperatura e da concentração molar de NaCl na partição das proteínas puras α -la, β -lg e GMP. Os valores médios obtidos para o coeficiente de partição da α -la, β -lg e GMP, erros provenientes do balanço de massa e desvio padrão dos resultados são apresentados nas Tabelas 8, 9 e 10, respectivamente.

Como pode ser observado na Tabela 8, os valores máximos e mínimos do coeficiente de partição para a α -la foram de 0,085 a 1,015. Verificou-se que os erros experimentais não excederam ao valor de 9,82% e o máximo valor de desvio padrão entre os resultados médios das duas repetições foi de aproximadamente 0,146%.

Os resultados obtidos experimentalmente foram comparáveis àqueles obtidos por Boaglio et al. (2006). Tais autores avaliando as características da partição das proteínas do soro de queijo (α -la e β -lg) em SAB's compostos por PEG1450 (15,75% m/m) / citrato de sódio (11,70% m/m) e PEG3350 (10,78% m/m) / citrato de sódio (11,22% m/m), pH 6,2 e temperatura de 20°C encontraram valores para o coeficiente de partição da α -la próximos a 0,625 e 0,551, respectivamente, sendo esses valores próximos ao encontrado experimentalmente para a α -la (0,469, em sistemas contendo 13 % (m/m) de PEG e 16 % (m/m) de citrato, em pH 6,0 a 25 °C.

Observou-se também, que, para cada proteína (α -la, β -lg e GMP), os valores do coeficiente de partição obtidos nas repetições do ponto central foram muito próximos, o que indica confiabilidade dos resultados e erros experimentais muito baixos.

Tabela 8 – Resultados experimentais obtidos para o coeficiente de partição da α -la empregando um delineamento fatorial fracionado 2^{5-1} .

pH	Temperatura (°C)	NaCl (M)	PEG (%m/m)	Citrato (%m/m)	$K_{\alpha\text{-la}}$	Erro Experimental (%)
6	25	0	13	16	$0,469 \pm 0,004$	2,719
8	25	0	13	13	$0,810 \pm 0,029$	2,063
6	25	0,2	13	13	$0,248 \pm 0,001$	-4,563
8	25	0,2	13	16	$0,553 \pm 0,010$	-8,813
6	25	0	16	13	$0,244 \pm 0,046$	-4,408
8	25	0	16	16	$1,015 \pm 0,059$	-0,862
6	25	0,2	16	16	$0,249 \pm 0,018$	-5,063
8	25	0,2	16	13	$0,329 \pm 0,024$	-5,438
7	35	0,1	14,5	14,5	$0,412 \pm 0,045$	0,800
7	35	0,1	14,5	14,5	$0,405 \pm 0,011$	0,613
7	35	0,1	14,5	14,5	$0,431 \pm 0,008$	2,050
7	35	0,1	14,5	14,5	$0,335 \pm 0,027$	-0,325
6	45	0	13	13	$0,343 \pm 0,009$	0,063
8	45	0	13	16	$0,830 \pm 0,050$	-7,506
6	45	0,2	13	16	$0,085 \pm 0,008$	-4,156
8	45	0,2	13	13	$0,488 \pm 0,0374$	-6,750
6	45	0	16	16	$0,197 \pm 0,0148$	-9,225
8	45	0	16	13	$0,797 \pm 0,0370$	1,144
6	45	0,2	16	13	$0,171 \pm 0,0067$	1,438
8	45	0,2	16	16	$0,558 \pm 0,1458$	-9,821

Tabela 9 – Resultados experimentais obtidos para o coeficiente de partição da β -lg empregando um delineamento fatorial fracionado 2^{5-1} .

pH	Temperatura (°C)	NaCl (M)	PEG (%m/m)	Citrato (%m/m)	$K_{\beta\text{-lg}}$	Erro Experimental (%)
6	25	0	13	16	$0,023 \pm 0,006$	-4,267
8	25	0	13	13	$0,198 \pm 0,031$	2,767
6	25	0,2	13	13	$0,019 \pm 0,001$	-4,747
8	25	0,2	13	16	$0,041 \pm 0,001$	-4,267
6	25	0	16	13	$0,114 \pm 0,008$	-7,267
8	25	0	16	16	$0,196 \pm 0,019$	2,733
6	25	0,2	16	16	$0,014 \pm 0,002$	-7,100
8	25	0,2	16	13	$0,109 \pm 0,009$	-5,500
7	35	0,1	14,5	14,5	$0,075 \pm 0,001$	1,733
7	35	0,1	14,5	14,5	$0,079 \pm 0,006$	-0,100
7	35	0,1	14,5	14,5	$0,086 \pm 0,053$	-3,833
7	35	0,1	14,5	14,5	$0,082 \pm 0,057$	-2,833
6	45	0	13	13	$0,033 \pm 0,002$	-8,300
8	45	0	13	16	$0,288 \pm 0,002$	-7,550
6	45	0,2	13	16	$0,106 \pm 0,041$	-6,050
8	45	0,2	13	13	$0,071 \pm 0,008$	0,950
6	45	0	16	16	$0,039 \pm 0,016$	-2,550
8	45	0	16	13	$0,190 \pm 0,008$	-9,800
6	45	0,2	16	13	$0,016 \pm 0,003$	-8,800
8	45	0,2	16	16	$0,060 \pm 0,000$	-5,225

De acordo com a Tabela 9, os valores do coeficiente de partição para a β -lg variaram de 0,014 a 0,288.

Para o SAB contendo 16 % (m/m) de PEG e 13 % (m/m) de citrato, em pH 6,0 a 25 °C, o coeficiente de partição da β -lg obtido experimentalmente foi de 0,114, sendo comparável aos resultados encontrados por Boaglio et al. (2006), 0,134 e 0,159, para sistemas compostos por PEG1450 (15,75% m/m) e PEG3350 (10,78% m/m) / citrato de sódio (11,70% m/m e 11,22% m/m), pH 6,2 e temperatura de 20°C, respectivamente.

Tabela 10 – Resultados experimentais obtidos para o coeficiente de partição do GMP empregando um delineamento fatorial fracionado 2^{5-1} .

pH	Temperatura (°C)	NaCl (M)	PEG (%m/m)	Citrato (%m/m)	K_{GMP}	Erro Experimental (%)
6	25	0	13	16	$0,669 \pm 0,086$	-3,40
8	25	0	13	13	$0,736 \pm 0,123$	-1,40
6	25	0,2	13	13	$0,979 \pm 0,021$	-9,40
8	25	0,2	13	16	$0,635 \pm 0,025$	2,60
6	25	0	16	13	$0,334 \pm 0,027$	-0,40
8	25	0	16	16	$0,663 \pm 0,247$	2,60
6	25	0,2	16	16	$1,858 \pm 0,004$	-3,40
8	25	0,2	16	13	$0,569 \pm 0,007$	-1,40
7	35	0,1	14,5	14,5	$0,826 \pm 0,039$	-8,40
7	35	0,1	14,5	14,5	$0,928 \pm 0,063$	1,60
7	35	0,1	14,5	14,5	$0,890 \pm 0,048$	-8,40
7	35	0,1	14,5	14,5	$0,874 \pm 0,064$	-9,40
6	45	0	13	13	$0,747 \pm 0,061$	0,30
8	45	0	13	16	$0,912 \pm 0,027$	-2,70
6	45	0,2	13	16	$0,914 \pm 0,108$	-10,20
8	45	0,2	13	13	$0,837 \pm 0,039$	-10,20
6	45	0	16	16	$1,208 \pm 0,240$	-5,40
8	45	0	16	13	$0,721 \pm 0,013$	-1,20
6	45	0,2	16	13	$0,534 \pm 0,141$	-0,70
8	45	0,2	16	16	$0,419 \pm 0,124$	2,60

Para o GMP, os valores do coeficiente de partição (Tabela 10) variaram de 0,334 a 1,858.

Os resultados obtidos experimentalmente para a partição da α -la, β -lg e do GMP foram submetidos a Análise de Variância a fim de se verificar a influência dos fatores estudados sobre a partição das proteínas do soro. Os resultados da ANOVA referentes ao coeficiente de partição da α -la, β -lg e do GMP estão apresentados nas Tabelas 11, 12 e 13 respectivamente.

Tabela 11- Resultado da ANOVA para o coeficiente de partição da α -la empregando um fatorial fracionado 2^{5-1} (CV=15,37 % e $R^2= 92,35$ %).

F.V	GL	QM	<i>Pr</i> > F
pH	1	0,711	0,0002
Temperatura	1	0,013	0,1796
NaCl	1	0,268	0,0018
PEG	1	0,004	0,3887
Citrato	1	0,017	0,1281
Modelo	15	0,077	0,0077
Erro	4	0,004	
Falta de Ajuste	1	0,014	0,0681
Erro Puro	3	0,002	
Total	19		

Os valores de probabilidade apresentados na Tabela 11, indicam que a variação do pH e da concentração molar de NaCl interferiram significativamente ($p < 0,05$) na partição da α -la. Os demais parâmetros avaliados não interferiram ($p > 0,05$ na partição da α -la).

Tabela 12- Resultado da ANOVA para o coeficiente de partição da β -lg empregando um fatorial fracionado 2^{5-1} (CV=13,31 % e $R^2= 97,23$ %).

F.V	GL	QM	<i>Pr</i> > F
pH	1	0,039	0,0001
Temperatura	1	0,0005	0,1506
NaCl	1	0,026	0,0002
PEG	1	0,0001	0,4566
Citrato	1	0,00002	0,7344
Modelo	15	0,0069	0,0011
Erro	4	0,0015	
Falta de Ajuste	1	0,00046	0,0515
Erro Puro	3	0,00005	
Total	19		

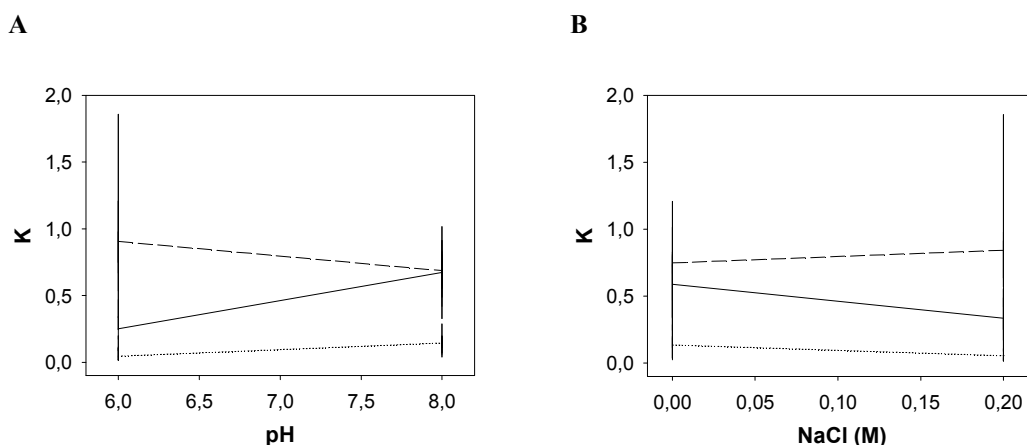
Conforme a Tabela 12, os valores de probabilidade indicam que os efeitos principais pH e concentração molar de NaCl também afetaram significativamente ($p < 0,05$) a partição da β -lg. Objetivando uma melhor separação das proteínas α -la e β -lg em SAB, os parâmetros pH e concentração de NaCl dos sistemas, devem ser manipulados de maneira que seja alcançado um coeficiente de partição mínimo para a β -lg. Assim, seriam obtidos sistemas com uma fase superior praticamente isenta de β -lg e uma fase inferior onde quase toda a β -lg seja extraída.

Tabela 13- Resultado da ANOVA para o coeficiente de partição do GMP empregando um fatorial fracionado 2^{5-1} (CV=10,25 % e $R^2= 93,19$ %).

FV	GL	QM	<i>Pr</i> > F
pH	1	0,191	0,0062
Temperatura	1	0,0014	0,6741
NaCl	1	0,0354	0,0868
PEG	1	0,0010	0,7297
Citrato	1	0,2074	0,0054
Modelo	15	0,127	0,0062
Erro	4	0,0069	
Falta de Ajuste	1	0,0224	0,0380
Erro Puro	3	0,0018	
Total	19		

Para a partição do GMP, os valores de probabilidade apresentados na Tabela 13 indicam que os fatores principais pH e concentração de citrato de sódio afetaram significativamente ($p < 0,05$) o coeficiente de partição. Ao nível de 10% de probabilidade, a concentração molar de NaCl influenciou significativamente o coeficiente de partição do GMP.

A partir dos resultados da ANOVA, foi possível avaliar graficamente o modo como cada um dos fatores significativos influenciam a variável resposta, nesse caso, o coeficiente de partição, em um intervalo de confiança de 95% (Figuras 4 e 5).



Figuras 4 A e 4 B – Comportamento da partição da α -la (—), β -lg (····) e GMP (-----) em função dos diferentes níveis de pH (4 A) e concentração molar de NaCl (4B).

A Figura 4A mostra que o pH influenciou negativamente o coeficiente de partição do GMP e positivamente o coeficiente de partição da α -la e da β -lg. A concentração molar de NaCl apresentou um efeito negativo sobre o coeficiente de partição da α -la e da β -lg (Figura 4B). O coeficiente de partição do GMP foi influenciado positivamente pela concentração molar de NaCl ao nível de 10% de probabilidade (Figura 4B).

Deste modo, espera-se que nos sistemas com alto valor de pH e sem adição de NaCl sejam obtidos os maiores valores de coeficiente de partição para a α -la. Para o GMP, os maiores valores de coeficiente de partição são obtidos nos níveis mais baixos de pH. Para a β -lg, é esperado que os valores mínimos de coeficiente de partição sejam obtidos nas condições de menores valores de pH e maiores concentrações de NaCl no sistema.

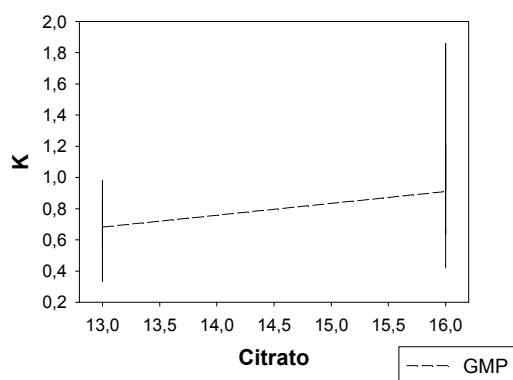


Figura 5 – Comportamento da partição do GMP (-----) em função dos diferentes níveis de concentração de citrato.

De acordo com a Figura 5, a concentração de citrato nos SAB afetou positivamente o coeficiente de partição do GMP, esperando-se que nos sistemas com maior concentração de citrato sejam obtidos os maiores valores de coeficiente de partição.

Os demais fatores temperatura e concentração de PEG, exercem influência não significativa ($p>0,05$) no coeficiente de partição da α -la, β -lg e do GMP. Para a α -la e β -lg, a influência da concentração de citrato sobre seus coeficientes de partição foi baixa ($p>0,05$).

5.2 Otimização da Partição das Proteínas do Soro

Nesta etapa de otimização, o critério empregado para a escolha das condições dos SAB, foram aquelas que melhor se adequaram à minimização do coeficiente de partição da β -lg.

A etapa de fracionamento das proteínas do soro em SAB visa obter uma separação das frações de α -la e β -lg de tal forma que se obtenha uma fase superior isenta de β -lg com a presença α -la e uma fase inferior na qual esteja presente praticamente toda a β -lg. Posteriormente, essas fases resultantes podem ser submetidas a processos de purificação, de forma que se obtenham frações de α -la e β -lg.

Com base nos resultados do coeficiente de partição da β -lg, aplicou-se um delineamento composto central rotacional tomando-se os valores de pH 5,29 a 6,71 e concentração molar de NaCl de 0,159M a 0,44M, visto que, nas condições de menor pH e maior concentração molar de NaCl do sistema, houve um decréscimo no valor do coeficiente de partição da β -lg, o que proporcionaria uma maior eficiência no processo de fracionamento das proteínas do soro, visto que praticamente toda a β -lg estaria presente na fase salina, e a fase superior seria isenta de β -lg.

Os fatores (pH e concentração molar de NaCl) e seus respectivos níveis avaliados no DCCR empregado para o coeficiente de partição da β -lg foram padronizados para as demais proteínas (α -la e GMP) e para todos sais estudados (citrato de sódio, fosfato de potássio e sulfato de lítio), ou seja, as condições dos SAB avaliados no DCCR foram padronizadas em função da partição da β -lg.

Por apresentarem efeitos não significativos ($p>0,05$) na partição das proteínas (α -la e β -lg), as concentrações de PEG e sal foram fixadas em níveis mínimos, 13%

em massa, e a temperatura foi fixa em 25 °C para cada sistema. Em aplicações em grande escala, a escolha de níveis mínimos para os fatores não significativos, resultaria numa redução dos custos com reagentes formadores das fases.

5.2.1. Otimização da Partição da α -La, β -Lg e GMP em Sistemas PEG/citrato

Nas Tabelas 14, 15 e 16 são apresentados os resultados experimentais, erros do balanço de massa e desvio padrão para o valores do coeficiente de partição da α -la, β -lg e GMP obtidos experimentalmente em SAB PEG/citrato de sódio, empregando um Delineamento Composto Central Rotacional.

Tabela 14 – Resultados experimentais obtidos para o coeficiente de partição da α -la em SAB PEG/citrato empregando um DCCR.

pH	NaCl (M)	$K_{\alpha\text{-la}}$	Erro experimental (%)
5,29	0,3	0,114 ± 0,020	-2,46
5,5	0,2	0,150 ± 0,015	-8,52
5,5	0,4	0,151 ± 0,012	-7,21
6,0	0,159	0,189 ± 0,029	0,35
6,0	0,3	0,159 ± 0,049	-7,17
6,0	0,3	0,174 ± 0,040	-3,53
6,0	0,3	0,173 ± 0,061	-4,40
6,0	0,3	0,183 ± 0,015	-9,15
6,0	0,441	0,216 ± 0,026	-5,84
6,5	0,2	0,239 ± 0,014	1,41
6,5	0,4	0,277 ± 0,024	-0,84
6,71	0,3	0,306 ± 0,009	0,91

Os valores do coeficiente de partição para a α -la variaram de 0,114 a 0,306, sendo observado que os maiores valores do coeficiente de partição foram obtidos nos SAB de maior valor de pH (Tabela 14).

Para o coeficiente de partição da β -lg, os resultados obtidos variaram de 0,010 a 0,042 (Tabela 15).

Os valores do coeficiente de partição do GMP (Tabela 16) se encontraram na faixa de 0,363 (pH 5,29 e 0,3 M de NaCl) a 0,761 (pH 6,71 e 0,3 M de NaCl).

Tabela 15 – Resultados experimentais obtidos para o coeficiente de partição da β -lg em SAB PEG/citrato empregando um DCCR.

pH	NaCl (M)	$K_{\beta\text{-lg}}$	Erro experimental (%)
5,29	0,3	$0,013 \pm 0,001$	-7,30
5,5	0,2	$0,016 \pm 0,015$	-2,10
5,5	0,4	$0,016 \pm 0,003$	-10,40
6,0	0,159	$0,019 \pm 0,008$	-0,92
6,0	0,3	$0,020 \pm 0,001$	-2,74
6,0	0,3	$0,017 \pm 0,005$	-5,90
6,0	0,3	$0,017 \pm 0,001$	-1,30
6,0	0,3	$0,017 \pm 0,001$	-4,80
6,0	0,441	$0,028 \pm 0,002$	-8,60
6,5	0,2	$0,010 \pm 0,000$	-0,30
6,5	0,4	$0,042 \pm 0,021$	-1,82
6,71	0,3	$0,033 \pm 0,003$	-1,60

Tabela 16 – Resultados experimentais obtidos para o coeficiente de partição do GMP em SAB PEG/citrato empregando um DCCR.

pH	NaCl (M)	K_{GMP}	Erro experimental (%)
5,29	0,3	$0,363 \pm 0,005$	0,60
5,5	0,2	$0,427 \pm 0,026$	2,60
5,5	0,4	$0,615 \pm 0,138$	0,60
6,0	0,159	$0,696 \pm 0,066$	-10,23
6,0	0,3	$0,791 \pm 0,131$	-2,40
6,0	0,3	$0,849 \pm 0,038$	-2,40
6,0	0,3	$0,853 \pm 0,065$	-2,40
6,0	0,3	$0,781 \pm 0,176$	2,60
6,0	0,441	$0,841 \pm 0,086$	-4,40
6,5	0,2	$0,683 \pm 0,011$	0,60
6,5	0,4	$0,814 \pm 0,005$	-9,57
6,71	0,3	$0,761 \pm 0,126$	-5,40

Os resultados experimentais foram submetidos à análise de regressão (Tabela 17). A análise da regressão indicou não significância do modelo quadrático para o coeficiente de partição da β -lg ao nível de 5% de probabilidade, porém, para o

coeficiente de partição da α -la e do GMP, o modelo quadrático foi significativo ($p < 0,05$) para ambas as proteínas. Em todos os casos a falta de ajuste não foi significativa, ou seja, os modelos não apresentaram falta de ajustamento aos dados experimentais a um nível de significância de 5%.

Tabela 17 - Resultado da ANOVA da regressão para o coeficiente de partição da α -la, β -lg e GMP em SAB PEG/Citrato, empregando em DCCR (α -la: CV=5,47 % ; β -lg: CV=12,37 % ; GMP: CV=7,99 %).

	Regressão	GL	QM	$Pr > F$
$K_{\alpha-La}$	Linear	2	0,0152	<0,0001
	Quadrático	2	0,0015	0,0064
	Interação	1	0,00034	0,1356
	Total da Regressão	5	0,00673	<0,0001
	FAJ	3	0,00013	0,4087
	Erro Puro	3	0,0001	
	Erro Total	6	6,3E-5	
	Total	11		
$K_{\beta-Lg}$	Linear	2	0,0003	0,0002
	Quadrático	2	0,000017	0,1449
	Interação	1	0,00025	0,0008
	Total da Regressão	5	0,00018	0,0004
	FAJ	3	0,00001	0,1290
	Erro Puro	3	2,33E-6	
	Erro Total	6	6,00E-6	
	Total	11		
K_{GMP}	Linear	2	0,0818	0,0002
	Quadrático	2	0,0591	0,0004
	Interação	1	0,00079	0,5013
	Total da Regressão	5	0,05652	0,0002
	FAJ	3	0,00164	0,4581
	Erro Puro	3	0,00144	
	Erro Total	6	0,00154	
	Total	11		

Os modelos obtidos por meio da análise de regressão descrevem a relação entre as variáveis independentes (pH e concentração molar de NaCl) e a variável dependente (coeficiente de partição), levando em conta apenas os termos estatisticamente significativos ($p < 0,05$), ou seja, aqueles termos que exercem um efeito sobre o coeficiente de partição das proteínas ao nível de 5% de probabilidade. As equações 9, 10 e 11 representam os modelos do coeficiente de partição da α -la, β -lg e GMP, respectivamente.

$$K_{\alpha-LA} = 2,189 - 0,760 * pH - 0,772 * NaCl + 0,074 * pH^2 + 1,448 * NaCl^2 \quad (9)$$

$$R^2 = 0,97$$

$$K_{\beta-LG} = 0,217 - 0,0354 * pH - 0,885 * NaCl + 0,158 * pH * NaCl \quad R^2 = 0,92 \quad (10)$$

$$K_{GMP} = -19,539 + 6,458 * pH + 0,656 * NaCl - 0,517 * pH^2 \quad R^2 = 0,94 \quad (11)$$

em que $K_{\alpha-LA}$, $K_{\beta-LG}$ e K_{GMP} são os coeficientes de partição para α -la, β -lg e do GMP, pH = pH do sistema, NaCl = concentração molar de NaCl no sistema.

Observa-se que os modelos obtiveram excelentes valores de coeficiente de determinação (R^2 , acima de 92%), o que significa que grande parte da variação da variável dependente é predita pelo modelo.

A utilização da metodologia de superfície de resposta possibilitou avaliar as regiões de máximo e mínimo para o coeficiente de partição das proteínas do soro.

Nas Figuras 6 a 8 estão apresentados o comportamento do coeficiente de partição das proteínas α -la, β -lg e GMP, em função do pH e concentração molar de NaCl.

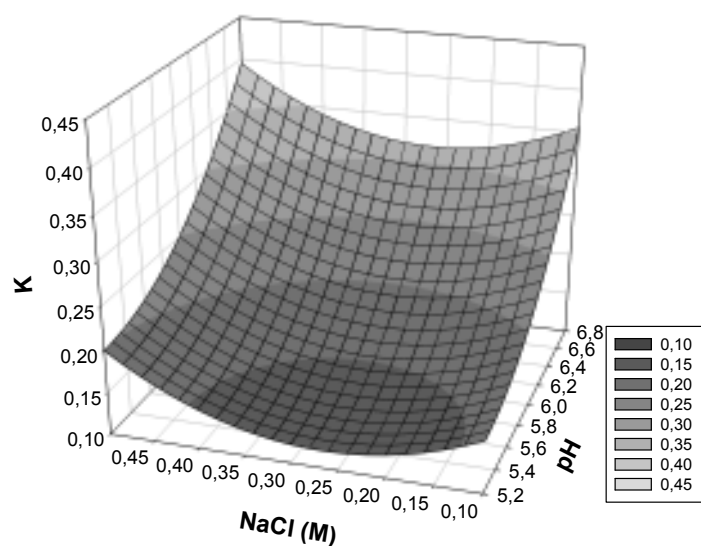


Figura 6 - Superfície de resposta para o coeficiente de partição da α -la em sistema PEG/citrato, como função do pH e da concentração molar de NaCl.

Na Figura 6, a superfície de resposta indica que o incremento do pH exerce um efeito positivo sobre o coeficiente de partição da α -la. Tubío et al. (2007), ao avaliarem o comportamento da partição de tripsina bovina e α -quimiotripsina em sistemas PEG1450/citrato de sódio, observaram o mesmo efeito do aumento do pH (5,2 a 5,8) sobre o coeficiente de partição dessas proteínas. Johansson et al. (2008), ao trabalharem com os sistemas PEG/NaPA adicionados de NaCl e Na₂SO₄, também observaram o aumento do coeficiente de partição da hemoglobina com o incremento do pH.

De acordo com Johansson et al. (1998), inúmeras investigações sobre sistemas aquosos bifásicos, mostram que a partição de uma molécula pode ser expressada em termos de contribuições por repulsões entrópicas ($\log K_S$), interações eletrostáticas ($\log K_{el}$) e hidrofóbicas ($\log K_{hy}$) e forças eletroquímicas ($\log K_{salt}$), resultando em:

$$\log K_{TOTAL} = \log K_S + \log K_{el} + \log K_{hy} + \log K_{SALT} \quad (12)$$

De acordo com essa equação, sugere-se que as interações eletrostáticas contribuíram positivamente para o coeficiente de partição da α -la neste tipo de sistema.

Segundo Da Silva e Loh (2006), em sistemas aquosos bifásicos com composição global fixa, às vezes, com adição de eletrólitos, a concentração hidrogeniônica afeta a transferência das proteínas, porque estas biomoléculas contêm uma grande variedade de grupos ácidos e básicos com diferentes valores de pKa, resultando em cargas elétricas que são funções dos valores de pH. Esta densidade de carga elétrica na superfície da proteína pode modificar sua conformação, bem como processos de associação ou dissociação entre as macromoléculas presentes no sistema. Todos estes processos que ocorrem com a proteína modificam sua interação com os componentes do sistema bifásico, alterando seu comportamento de partição. O pH, indiretamente, pode afetar a partição de uma proteína e modificar a composição das fases dos SAB, seja a posição da linha binodal, seja o comprimento da linha de amarração.

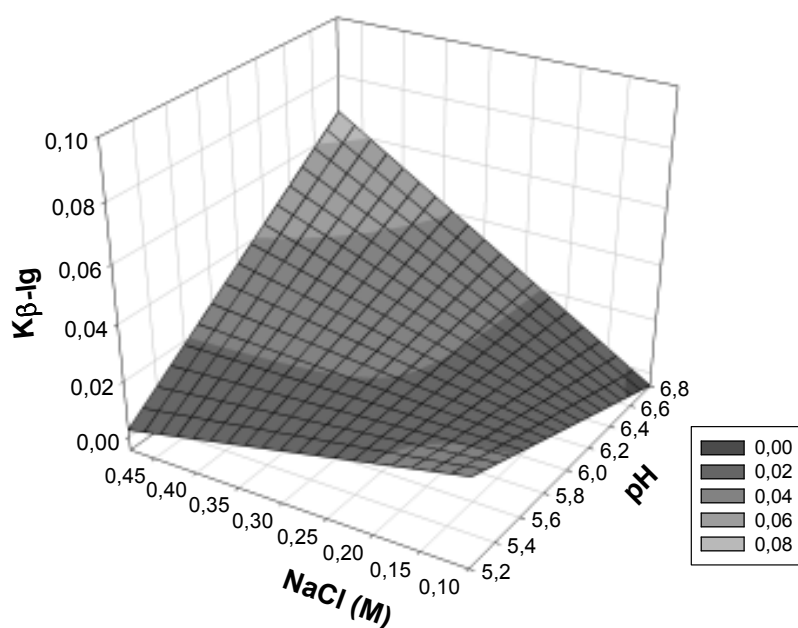


Figura 7 - Superfície de resposta para o coeficiente de partição da β -Ig em sistema PEG/citrato, como função do pH e da concentração molar de NaCl.

Diferentemente da α -Ia, para a partição da β -Ig a superfície de resposta (fig.7) indica que o incremento do NaCl afetou negativamente o coeficiente de partição em menor valor de pH. Entretanto, em maior valor de pH observa-se um efeito positivo do NaCl sobre o coeficiente de partição.

Embora sejam observadas regiões nas quais ocorrem um aumento do coeficiente de partição em função da elevação do pH e da concentração de NaCl, nota-se que em todos os sistemas foram obtidos valores muito baixos para o coeficiente de partição. Isto indica que praticamente toda a β -lg migra para a fase salina ao ser particionada em SAB PEG/sal.

Uma possível explicação para esse comportamento é baseada na contribuição entrópica para o coeficiente de partição da proteína. O modelo teórico desenvolvido por Johansson et al. (1998), que é baseado na teoria de Flory e Huggins, descreve as forças motrizes que regem a partição de um soluto em SAB por meio de duas equações analíticas, uma relacionada à contribuição entálpica e outra à entrópica. Segundo esses autores, em regime de diluição infinita e na ausência de efeitos entálpicos, a contribuição entrópica para a partição de uma biomolécula pode ser dada pelo seguinte modelo:

$$\ln K = \frac{M_s}{\rho} \left(\frac{n^s}{V^s} - \frac{n^i}{V^i} \right) \quad (13)$$

onde K é o coeficiente de partição da proteína, M_s a sua massa molar, ρ é a densidade numérica molecular global do sistema aquoso bifásico, n^s é o número total de moléculas na fase superior enquanto que n^i é o número total de moléculas presentes na fase inferior e V^s e V^i , os volumes das fases superior e inferior, respectivamente.

A equação 13 mostra que a contribuição entrópica para a partição da proteína só aparecerá caso exista uma diferença em termos de densidade numérica entre as duas fases. Como força motriz, a entropia levará a proteína a particionar para a fase com maior número de moléculas por unidade de volume (n/V) a qual é determinada, principalmente, pelo número de moléculas de água em cada fase. De modo geral, a fase com a maior densidade numérica poderá acomodar o soluto de várias formas diferentes (diferentes configurações), aumentando a partição para aquela fase.

Durante a partição de proteínas em sistemas aquosos bifásicos formados pela mistura de eletrólito/polímero, forças motrizes de natureza entrópica atuarão no processo forçando a biomolécula a se concentrar na fase rica em sal, visto ser esta a que contém maior densidade numérica (JOHANSSON et al., 1998). Os SAB nos quais foram realizados os experimentos de partição, os volumes das fases (superior e inferior) pré equilibradas empregadas na montagem dos sistemas eram iguais (2,5 mL), assim a fase salina apresentou uma maior densidade numérica em relação à fase

polimérica. A medida que se adicionou maiores concentrações de NaCl no sistema, a diferença entre os termos de densidade numérica entre as duas fases tornou-se cada vez maior, e mais negativa, o que resultou em valores de $\ln K$ cada vez mais negativos, indicando um decréscimo do coeficiente de partição e maior migração da biomolécula para a fase salina.

A concentração da proteína na fase rica em polímero só ocorrerá nos SAB polímero/sal caso existam interações entálpicas contribuindo para este comportamento, por exemplo, quando há interações específicas entre proteína e polímero (DA SILVA e LOH, 2006).

Como a proteína se concentrou na fase salina ($K < 1$), pode-se supor que o fator entálpico pouco contribui para o comportamento da partição da proteína e é a entropia que determinará esse comportamento.

As regiões onde foram obtidos valores mínimos de coeficiente de partição para a β -lg, corresponderam as condições de: pH 5,2 e 0,5 M de NaCl e condições de extremo de pH (6,6 a 6,8) e baixa concentração de NaCl (0,1M).

Contudo, para os processos de fracionamento das proteínas do soro *in natura*, deve-se trabalhar em regiões distantes ao ponto isoelétrico da β -lg (pH 5,2) e demais proteínas do soro (ver Tabela 2), uma vez que, no ponto isoelétrico, a proteína apresenta carga líquida nula, e esta condição é favorável para que as moléculas de proteínas se aproximem, agreguem e precipitem (VOJDANI, 1996).

A análise canônica da superfície de resposta tem como objetivo caracterizar essa superfície e determinar os pontos de máximo, mínimo ou estacionário (ponto de sela). Para as condições testadas no DCCR, a região onde se tem um valor crítico para o coeficiente de partição da β -lg, corresponde a condição de pH 6,71 e 0,159 M de NaCl no sistema, onde o coeficiente de partição predito pelo modelo foi de 0,004.

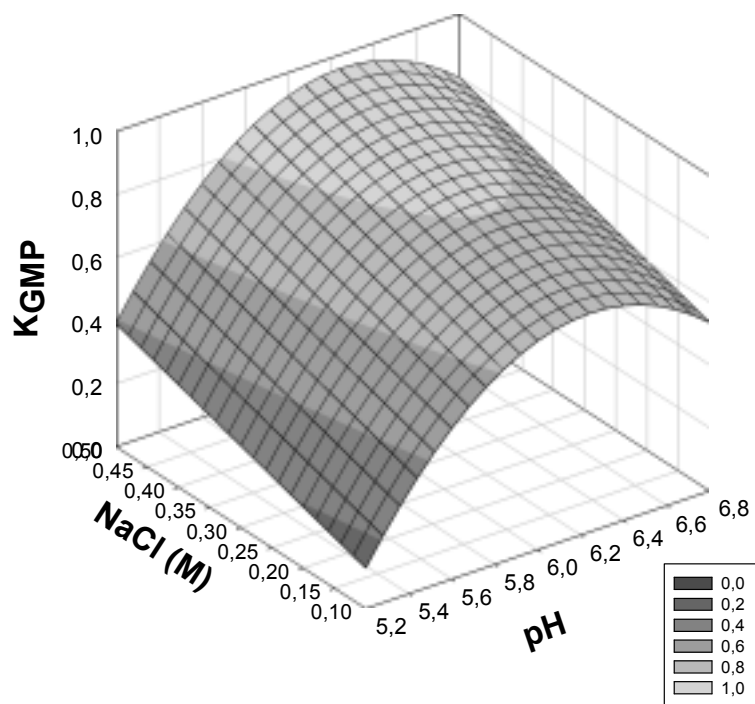


Figura 8 - Superfície de resposta para o coeficiente de partição do GMP em sistema PEG/citrato, como função do pH e da concentração molar de NaCl.

A partir da análise da superfície de resposta representada na Figura 8, observou-se que para a partição do GMP foi obtida uma região de ótimo onde o coeficiente de partição do GMP é máximo. Por meio da análise canônica da superfície de resposta, determinou-se que a condição de máximo para o coeficiente de partição é obtida em pH 6,35 e 0,441 M de NaCl. Onde o coeficiente de partição predito é 0,912.

5.2.2 Otimização da Partição da α -La, β -Lg e GMP em Sistemas PEG/Fosfato

Os resultados médios obtidos para o coeficiente de partição da α -la, β -lg e GMP em SAB PEG/fosfato de potássio utilizando um DCCR, bem como os erros provenientes do balanço de massa e o desvio padrão para as repetições dos tratamentos, são apresentados nas Tabelas 18, 19 e 20, respectivamente.

Tabela 18 – Resultados experimentais obtidos para o coeficiente de partição da α -la em SAB PEG/fosfato empregando um DCCR.

pH	NaCl (M)	$K_{\alpha\text{-la}}$	Erro experimental (%)
5,29	0,3	$0,399 \pm 0,007$	-3,31
5,5	0,2	$0,407 \pm 0,022$	-3,31
5,5	0,4	$0,373 \pm 0,007$	-4,31
6,0	0,159	$0,427 \pm 0,016$	-4,92
6,0	0,3	$0,355 \pm 0,022$	-2,53
6,0	0,3	$0,358 \pm 0,003$	-4,31
6,0	0,3	$0,342 \pm 0,003$	-1,81
6,0	0,3	$0,348 \pm 0,017$	-3,76
6,0	0,441	$0,334 \pm 0,001$	-3,14
6,5	0,2	$0,429 \pm 0,033$	-6,76
6,5	0,4	$0,416 \pm 0,030$	-2,42
6,71	0,3	$0,482 \pm 0,013$	1,69

Os valores do coeficiente de partição para a α -la variaram de 0,334 a 0,482, esses valores correspondem respectivamente as condições dos sistemas em pH 6,0, com 0,441M de NaCl e sistema em pH 6,71, adicionado de 0,3M de NaCl (Tabela 18).

Os resultados experimentais foram comparáveis àqueles obtidos por Alves et al. (2000). Tais autores avaliando a partição das proteínas do soro em sistemas formados por PEG1500 (12,7% em massa) e fosfato de potássio (18% em massa) em pH 7,0, encontraram valores de coeficiente de partição de 0,680 para a α -la. Experimentalmente, foi obtido um coeficiente de partição da a α -la de 0,482 em sistemas contendo 13 % (m/m) de PEG e fosfato, em pH 6,71, com 0,3M de NaCl).

Tabela 19 – Resultados experimentais obtidos para o coeficiente de partição da β -lg em SAB PEG/fosfato empregando um DCCR.

pH	NaCl (M)	$K_{\beta\text{-lg}}$	Erro experimental (%)
5,29	0,3	0,021 \pm 0,004	0,37
5,5	0,2	0,024 \pm 0,002	-3,40
5,5	0,4	0,024 \pm 0,005	-4,50
6,0	0,159	0,025 \pm 0,003	-0,60
6,0	0,3	0,021 \pm 0,008	-2,40
6,0	0,3	0,019 \pm 0,003	-1,80
6,0	0,3	0,022 \pm 0,001	-3,15
6,0	0,3	0,018 \pm 0,003	-8,05
6,0	0,441	0,019 \pm 0,001	-1,58
6,5	0,2	0,020 \pm 0,006	-0,08
6,5	0,4	0,011 \pm 0,000	-0,08
6,71	0,3	0,011 \pm 0,001	-0,60

Para o coeficiente de partição da β -lg, os resultados experimentais obtidos variaram de 0,011 (pH 6,5 e 6,71 com 0,2 e 0,3M de NaCl, respectivamente) a 0,025 (pH 6,0 e 0,159 M de NaCl).

Capezio et al. (2005) avaliando a partição das proteínas do soro em SAB compostos por PEG1500/fosfato de potássio, em pH 6,3 com 2 % (m/m) de NaCl adicionado, obteve-se um coeficiente de partição para a β -lg de 0,018. Os resultados médios (0,020 e 0,019) obtidos experimentalmente para os sistemas em pH 6,0 e 0,3 M de NaCl e em pH 6,0 com 0,441M de NaCl, respectivamente, foram muito próximos aos encontrados pelos referidos autores.

Os resultados experimentais obtidos para o coeficiente de partição da GMP em SAB PEG/fosfato são apresentados na Tabela 20.

Tabela 20 – Resultados experimentais obtidos para o coeficiente de partição da GMP em SAB PEG/fosfato empregando um DCCR.

pH	NaCl (M)	K_{GMP}	Erro experimental (%)
5,29	0,3	$0,488 \pm 0,053$	-2,40
5,5	0,2	$0,565 \pm 0,018$	-9,20
5,5	0,4	$0,498 \pm 0,152$	1,49
6,0	0,159	$0,578 \pm 0,035$	-10,40
6,0	0,3	$0,734 \pm 0,021$	-10,40
6,0	0,3	$0,786 \pm 0,032$	-7,40
6,0	0,3	$0,782 \pm 0,100$	0,60
6,0	0,3	$0,770 \pm 0,025$	-8,40
6,0	0,441	$0,479 \pm 0,042$	-8,40
6,5	0,2	$0,854 \pm 0,000$	1,60
6,5	0,4	$0,789 \pm 0,007$	1,60
6,71	0,3	$0,915 \pm 0,272$	-9,80

Para o coeficiente de partição da GMP, os resultados experimentais obtidos variaram de 0,011 (pH 6,0 0,441M de NaCl) a 0,789 (pH 6,71 e 0,3 M de NaCl).

Os resultados da análise de regressão para a partição da α -la, β -lg e GMP em sistemas PEG/fosfato são apresentadas na Tabela 21. Para o coeficiente de partição da α -la do GMP, a ANOVA indicou que o modelo quadrático foi significativo ($p < 0,05$) para a partição de ambas as proteínas. Para a β -lg o modelo quadrático e com a interação pH*NaCl foram significativos ao nível de 5% de probabilidade. Em todos os casos a falta de ajuste (FAJ) não foi significativa ($p > 0,05$).

Tabela 21 - Resultado da ANOVA da regressão para o coeficiente de partição da α -la, β -lg e GMP em SAB PEG/Fosfato, empregando em DCCR (α -la: CV=4,08 % ; β -lg: CV= 6,74 % ; GMP: CV=6,92 %).

	Regressão	GL	QM	$Pr>F$
$K_{\alpha-La}$	Linear	2	0,0041	0,0037
	Quadrático	2	0,0065	0,0011
	Interação	1	0,00011	0,5358
	Total da Regressão	5	0,00426	0,0017
	FAJ	3	0,00043	0,0878
	Erro Puro	3	7,33E-5	
	Erro Total	6	0,00025	
	Total	11		
$K_{\beta-Lg}$	Linear	2	8,2E-5	0,0002
	Quadrático	2	1,63E-5	0,0144
	Interação	1	1,89E-5	0,0165
	Total da Regressão	5	4,4E-5	0,0006
	FAJ	3	8,67E-7	0,8061
	Erro Puro	3	2,62E-6	
	Erro Total	6	1,74E-5	
	Total	11		
K_{GMP}	Linear	2	0,0921	0,0001
	Quadrático	2	0,0350	0,0016
	Interação	1	2,5E-7	0,9903
	Total da Regressão	5	0,0700	0,0003
	FAJ	3	0,00372	0,0758
	Erro Puro	3	0,00053	
	Erro Total	6	0,00214	
	Total	11		

As equações 14, 15 e 16 representam os modelos do coeficiente de partição da α -la, β -lg e GMP, respectivamente. Nota-se que todos os modelos apresentaram alto valor de coeficiente de determinação (R^2).

$$K_{\alpha-LA} = 6,077 - 1,928 * pH - 0,224 * NaCl + 0,164 * pH^2 \quad (14)$$

$$R^2 = 0,93$$

$$K_{\beta-LG} = -0,28 + 0,01 * pH + 0,24 * NaCl - 0,0075 * pH^2 - 0,044 * pH * NaCl \quad (15)$$

$$R^2 = 0,91$$

$$K_{GMP} = -1,826 + 0,296 * pH + 5,715 * NaCl - 10,093 * NaCl^2 \quad (16)$$

$$R^2 = 0,96$$

em que $K_{\alpha-LA}$, $K_{\beta-LG}$ e K_{GMP} são os coeficientes de partição para α -la, β -lg e do GMP, $pH = pH$ do sistema, $NaCl =$ concentração molar de $NaCl$ no sistema.

Nas Figuras 9 a 11 são apresentados os efeitos combinados dos fatores pH e concentração molar $NaCl$ sobre o coeficiente de partição da α -la, β -lg e GMP, como superfície de resposta.

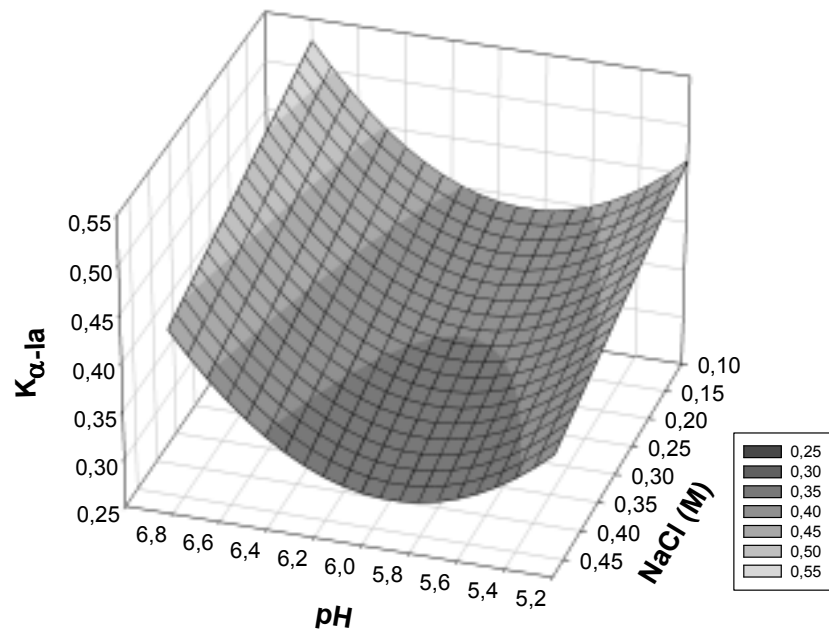


Figura 9 - Superfície de resposta para o coeficiente de partição da α -la em sistema PEG/fosfato, como função do pH e da concentração molar de $NaCl$.

A superfície de resposta para a partição da α -la (Figura 9) indica que foi obtida uma condição de mínimo de coeficiente de partição da α -la. Por meio da análise canônica da superfície de resposta, determinou-se que essa condição corresponde ao sistema com pH 6,0 e 0,441 M de $NaCl$. Nessa condição, o

coeficiente de partição predito pelo modelo matemático para partição da α -la (eq. 14) é de 0,330.

Visando um processo de fracionamento das proteínas do soro *in natura* (α -la, β -lg e GMP) em SAB PEG2000/fosfato, deve-se evitar a condição de pH 6,00 e 0,441 M, pois nesse sistema, a α -la apresenta um coeficiente de partição mínimo e grande parte dessa proteína irá particionar para a fase salina juntamente com a β -lg. Consequentemente, a eficiência do processo de separação será comprometida.

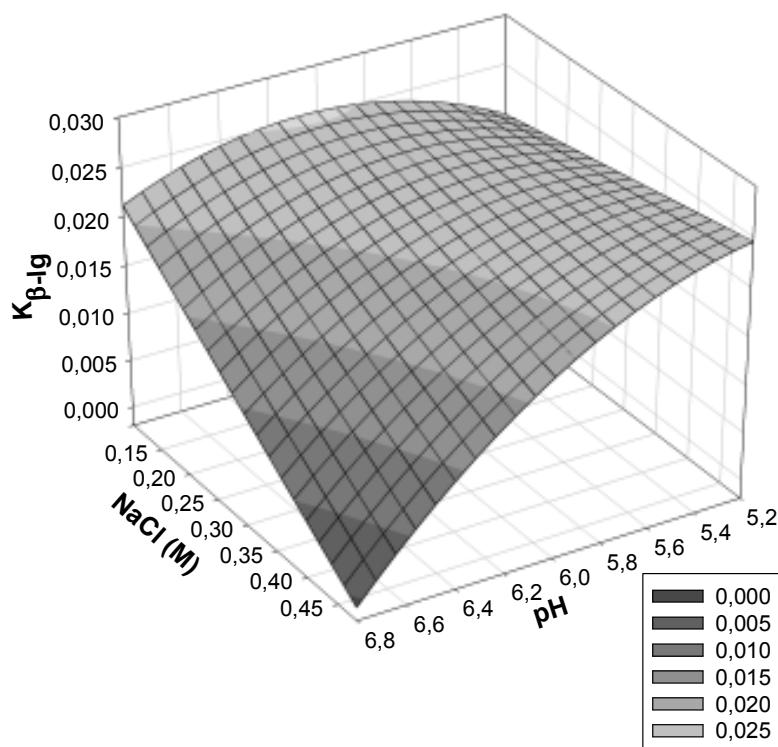


Figura 10 - Superfície de resposta para o coeficiente de partição da β -lg em sistema PEG/fosfato, como função do pH e da concentração molar de NaCl.

Na Figura 10, observa-se que a superfície de resposta para a partição da β -lg não apresentou uma região de mínimo ou máximo para o coeficiente de partição. Contudo, em altas concentrações de NaCl, nota-se que o pH tem um efeito negativo sobre o coeficiente de partição. O efeito da concentração de NaCl sobre o K depende do valor de pH. Em altos valores de pH, o aumento da concentração de NaCl afetou negativamente o coeficiente de partição.

Capezio et al. (2005), avaliando a partição das proteínas do soro (α -la e β -lg) em SAB compostos por PEG1000, PEG1500, PEG3350 e fosfato de potássio, observaram que o aumento na concentração de NaCl nos sistemas, proporcionaram

decréscimos nos valores do coeficiente de partição para ambas as proteínas. Para β -lg, em sistema formado por PEG1000/fosfato em pH 6,3, o valor do coeficiente de partição foi reduzido de 0,068 a 0,048 ao se adicionar de 1% (em massa) de NaCl ao sistema.

Como discutido anteriormente, o incremento da concentração de NaCl nos sistemas favorece as contribuições entrópicas na partição da proteína, uma vez que a diferença de densidade numérica entre as duas fases aumenta (ver eq. 13), de tal forma que essa diferença torna-se cada vez mais negativa, resultando em valores negativos para $\log K$, ou seja, o decréscimo do coeficiente de partição e maior migração da proteína para a fase salina.

Além disso, a adição de diferentes sais ao SAB produz uma diferença de potencial elétrico na interface, que influencia marcadamente a partição de proteínas carregadas eletricamente. Este potencial eletrostático ocorre devido à distribuição desigual dos cátions e dos ânions entre as fases enriquecidas pelos diferentes polímeros (DA SILVA e LOH, 2006).

Através da análise canônica da superfície de resposta, a condição de pH 5,43 e 0,290 M de NaCl no sistema corresponde ao ponto estacionário desta superfície. Neste ponto, o coeficiente de partição predito pelo modelo (eq. 15) é de 0,022.

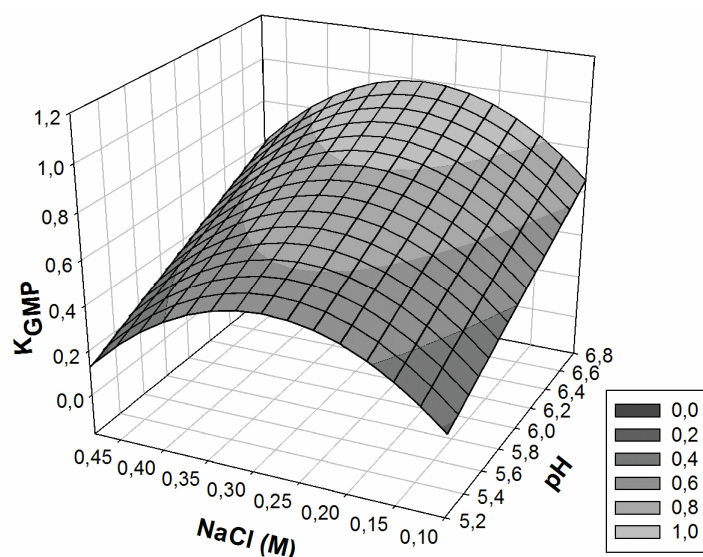


Figura 11 - Superfície de resposta para o coeficiente de partição do GMP em sistema PEG/fosfato, como função do pH e da concentração molar de NaCl.

A superfície de resposta (Figura 11), indica que o aumento do pH do sistema, promove uma elevação do coeficiente de partição do GMP. O mesmo comportamento foi observado por Da Silva (2007) ao se estudar a partição do GMP.

Segundo Mikkelsen et al. (2005), a conformação molecular do GMP apresenta forte dependência ao pH do meio, sendo que em condições de pH acima de 4,5, começa a ocorrer a agregação das moléculas do GMP. Em pH próximo a 7,0 a massa molar do GMP sofre um aumento, por meio da agregação desses monômeros, sendo que na forma tetramérica, as frações do GMP estão mais hidrofóbicas. A maior exposição dessas superfícies hidrofóbicas favorece uma maior interação com a fase polimérica (mais hidrofóbica que a fase salina), resultando no aumento do coeficiente de partição (ZASLAVSKY, 1995).

De acordo com a análise canônica da superfície de resposta, na condição de pH 6,71 e 0,284 M de NaCl no sistema, o coeficiente de partição predito pelo modelo (eq. 16) é de 0,966.

5.2.3. Otimização da Partição da α -La, β -Lg e GMP em Sistemas PEG/sulfato

Os valores médios dos coeficientes de partição da α -la, β -lg e GMP obtidos experimentalmente em SAB PEG/sulfato de lítio, empregando um Delineamento Composto Central Rotacional são apresentados nas Tabelas 22, 23 e 24.

Tabela 22 – Resultados experimentais obtidos para o coeficiente de partição da α -la em SAB PEG/sulfato empregando um DCCR.

pH	NaCl (M)	$K_{\alpha\text{-la}}$	Erro experimental (%)
5,29	0,3	0,378 \pm 0,006	-8,13
5,5	0,2	0,319 \pm 0,002	-7,20
5,5	0,4	0,651 \pm 0,020	-9,36
6,0	0,159	0,408 \pm 0,014	-9,64
6,0	0,3	0,531 \pm 0,007	-9,84
6,0	0,3	0,519 \pm 0,014	-10,20
6,0	0,3	0,495 \pm 0,014	-9,99
6,0	0,3	0,549 \pm 0,001	-9,47
6,0	0,441	0,728 \pm 0,028	-5,35
6,5	0,2	0,491 \pm 0,007	-8,70
6,5	0,4	0,574 \pm 0,038	-4,18
6,71	0,3	0,507 \pm 0,009	-9,84

Os resultados do coeficiente de partição da α -la variaram de 0,319 a 0,728 (Tabela 22). Para a β -lg (Tabela 23), os valores do K variaram de 0,035 a 0,081.

Tabela 23 – Resultados experimentais obtidos para o coeficiente de partição da β -lg em SAB PEG/sulfato empregando um DCCR.

pH	NaCl (M)	$K_{\beta\text{-lg}}$	Erro experimental (%)
5,29	0,3	0,044 \pm 0,006	-3,30
5,5	0,2	0,035 \pm 0,004	-4,94
5,5	0,4	0,050 \pm 0,012	-8,61
6,0	0,159	0,058 \pm 0,029	-6,24
6,0	0,3	0,040 \pm 0,002	-1,67
6,0	0,3	0,031 \pm 0,002	-8,53
6,0	0,3	0,036 \pm 0,013	-3,47
6,0	0,3	0,035 \pm 0,010	-7,16
6,0	0,441	0,079 \pm 0,005	-4,61
6,5	0,2	0,063 \pm 0,006	-3,47
6,5	0,4	0,081 \pm 0,007	-2,57
6,71	0,3	0,061 \pm 0,004	-4,12

Tabela 24 – Resultados experimentais obtidos para o coeficiente de partição da GMP em SAB PEG/sulfato empregando um DCCR.

pH	NaCl (M)	K_{GMP}	Erro experimental (%)
5,29	0,3	0,593 \pm 0,210	-2,85
5,5	0,2	0,727 \pm 0,105	-4,02
5,5	0,4	0,816 \pm 0,014	-8,05
6,0	0,159	0,847 \pm 0,044	-2,40
6,0	0,3	0,842 \pm 0,069	-10,40
6,0	0,3	0,780 \pm 0,086	-8,40
6,0	0,3	0,748 \pm 0,040	-2,40
6,0	0,3	0,812 \pm 0,031	-4,40
6,0	0,441	0,823 \pm 0,095	-2,40
6,5	0,2	0,836 \pm 0,094	-2,85
6,5	0,4	0,622 \pm 0,047	-5,87
6,71	0,3	0,503 \pm 0,059	-10,40

Para o GMP, o coeficiente de partição variou de 0,503 a 0,847 (Tabela 24).

Por meio da ANOVA da regressão (Tabela 25), verificou-se que o modelo quadrático foi significativo ($p < 0,05$) para a partição da α -la, β -lg e GMP em SAB PEG/sulfato. Em todos os casos a falta de ajuste não foi significativa ($p > 0,05$).

Tabela 25 - Resultado da ANOVA da regressão para o coeficiente de partição da α -la, β -lg e GMP em SAB PEG/Sulfato de Lítio, empregando em DCCR (α -la: CV=4,10 %; β -lg: CV= 11,37 %; GMP: CV=6,92 %).

	Regressão	GL	QM	$Pr > F$
$K_{\alpha-La}$	Linear	2	0,0517	0,0001
	Quadrático	2	0,0082	0,0027
	Interação	1	0,0155	0,0010
	Total da Regressão	5	0,0271	<0,0001
	FAJ	3	0,0004	0,5835
	Erro Puro	3	7,3E-5	
	Erro Total	6	0,0004	
	Total	11		
$K_{\beta-Lg}$	Linear	2	0,0007	0,0020
	Quadrático	2	0,0009	0,0011
	Interação	1	3,8E-6	0,7483
	Total da Regressão	5	0,0006	0,0013
	FAJ	3	5,51E-5	0,1230
	Erro Puro	3	1,21E-6	
	Erro Total	6	3,43E-5	
	Total	11		
K_{GMP}	Linear	2	0,0044	0,2119
	Quadrático	2	0,0486	0,0016
	Interação	1	0,0230	0,0172
	Total da Regressão	5	0,0258	0,0045
	FAJ	3	0,0027	0,3417
	Erro Puro	3	0,0016	
	Erro Total	6	0,0022	
	Total	11		

A partir da análise de regressão obteve-se as equações (17, 18 e 19) que representam os modelos do coeficiente de partição da α -la, β -lg e GMP, respectivamente.

$$K_{\alpha-LA} = -7,9 + 2,3 * pH + 7,2 * NaCl - 0,16 * pH^2 - 1,26 * pH * NaCl + 2,3 * NaCl^2 \quad (17)$$

$$R^2 = 0,98$$

$$K_{\beta-LG} = 1,142 - 0,351 * pH - 0,868 * NaCl + 0,031 * pH^2 + 1,581 * NaCl^2 \quad (18)$$

$$R^2 = 0,94$$

$$K_{GMP} = -18,217 + 5,965 * pH + 8,892 * NaCl - 0,467 * pH^2 - 1,521 * pH * NaCl \quad (19)$$

$$R^2 = 0,91$$

em que $K_{\alpha-LA}$, $K_{\beta-LG}$ e K_{GMP} são os coeficientes de partição para α -la, β -lg e do GMP, $pH = pH$ do sistema, $NaCl =$ concentração molar de $NaCl$ no sistema.

Nas Figuras 12 a 14 são visualizados os combinados dos fatores pH e concentração molar $NaCl$ sobre o coeficiente de partição da α -la, β -lg e GMP.

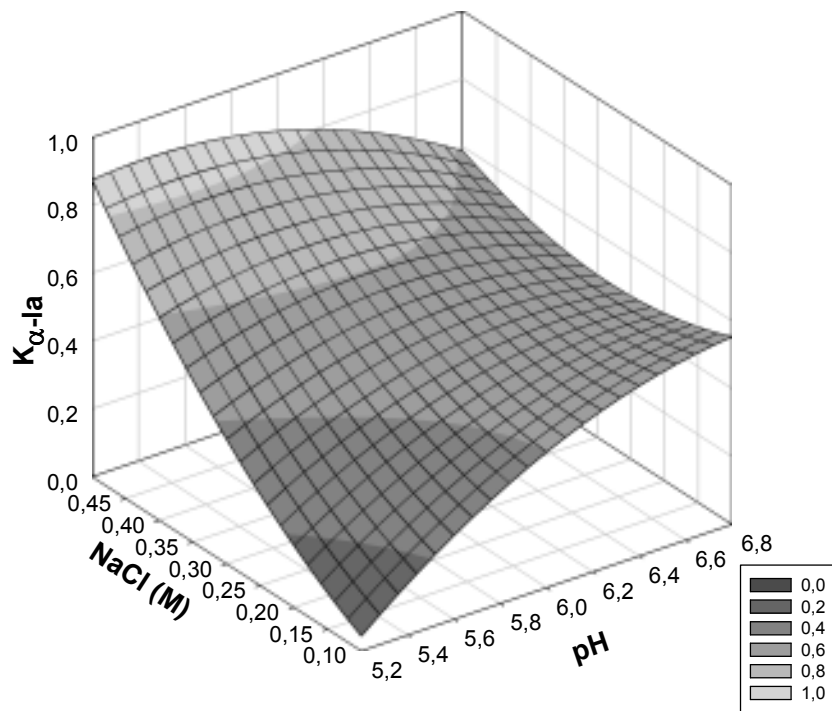


Figura 12 - Superfície de resposta para o coeficiente de partição da α -la em sistema PEG/sulfato, como função do pH e da concentração molar de $NaCl$.

Para o comportamento da partição da α -la (Figura 12), observa-se que a superfície de resposta apresentou um comportamento de sela, assim não foi obtida uma região de máximo ou mínimo para o coeficiente de partição. Contudo, nota-se que nos baixos valores de pH, a concentração de NaCl influenciou positivamente o coeficiente de partição da α -la. Nas menores concentrações de NaCl o aumento do pH exerceu um efeito positivo sobre o coeficiente de partição. Tal comportamento pode ser explicado baseado nos efeitos do pH sobre as cargas elétricas das proteínas, o que modifica a sua conformação e processos de associação e dissociação de macromoléculas. Essas mudanças que ocorrem na proteína modificam sua interação com os componentes do sistema e consequentemente, alteram seu comportamento de partição (DA SILVA e LOH, 2006).

Na região de pH próxima a 5,2 e 0,45 M de NaCl, obtêm-se os maiores valores preditos do coeficiente de partição (acima de 0,8). Entretanto, essa condição de pH (5,2) é próxima do ponto isoelétrico da proteínas do soro, o que poderia ocasionar a precipitação das proteínas no sistema.

Por meio da análise canônica da superfície de resposta, a região onde o coeficiente de partição da α -la apresenta maior valor corresponde a condição de pH 5,65 e 0,441 M de NaCl no sistema. Neste ponto, o coeficiente de partição predito pelo modelo é de 0,741.

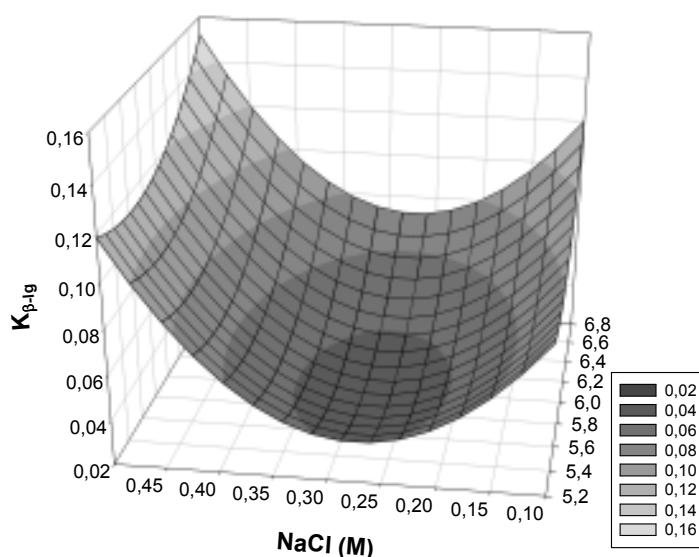


Figura 13 - Superfície de resposta para o coeficiente de partição da β -Ig em sistema PEG/sulfato, como função do pH e da concentração molar de NaCl.

Por meio da superfície de resposta representada na Figura 13, pode ser visto que foi alcançada a condição de otimização para a partição da β -lg, ou seja, foi obtida uma região de mínimo de coeficiente de partição da β -lg, que correspondeu às regiões centrais estudadas. Por meio da análise canônica da superfície de resposta, determinou-se que a condição de mínimo para o coeficiente de partição é obtida em SAB com pH 5,67 e 0,276 M de NaCl. Nessa condição, o coeficiente de partição predito pelo modelo (eq.18) foi de 0,031.

Portanto, para a obtenção de mínimo coeficiente de partição para β -lg e máxima extração dessa proteína na fase salina, deve-se trabalhar com sistemas em pH 5,67 e 0,276 M de NaCl.

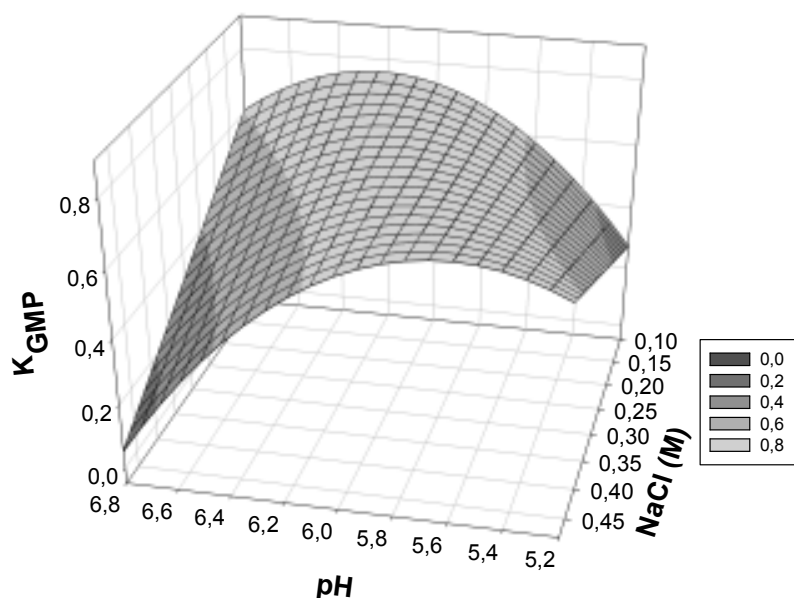


Figura 14 - Superfície de resposta para o coeficiente de partição do GMP em sistema PEG/sulfato, como função do pH e da concentração molar de NaCl.

A superfície de resposta para a partição do GMP em SAB PEG/sulfato observa-se na Figura 14, indica que nos valores de pH próximos a 6,0 são obtidos os máximos valores de coeficiente de partição. De acordo com a análise canônica da superfície de resposta, na condição de pH 6,0 e 0,159 M de NaCl o coeficiente de partição do GMP é máximo. Neste ponto, o coeficiente de partição predito pelo modelo é de 0,851.

Observa-se que nos extremos de pH (5,2 e 6,8) o aumento e a redução da concentração molar de NaCl no sistema, proporcionaram a elevação do coeficiente de partição, respectivamente.

5.3 Avaliação do SAB para Fracionamento de α -Lactoalbumina, Glicomacropéptido e β -Lactoglobulina de Soro de Leite *in natura*

5.3.1 Curvas- Padrão da α -La, β -Lg e GMP

A concentração das proteínas do soro *in natura* α -la e β -lg e GMP foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência, como descrito na seção 4.2.3.2

As curvas-padrão obtidas com soluções puras das proteínas estão representadas nas Figuras 15, 16 e 17. Pode-se observar que os coeficientes de determinação foram elevados para α -la, β -lg e GMP ($R^2 = 0,993$, $R^2 = 0,992$ e $R^2 = 0,993$, respectivamente).

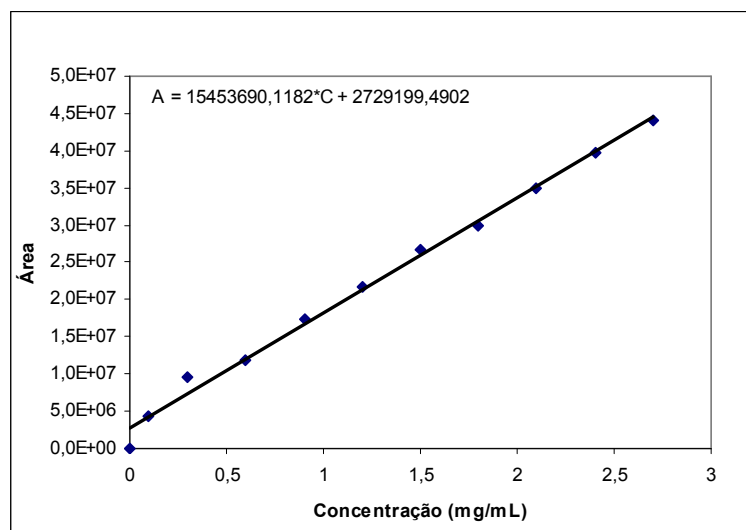


Figura 15 - Curva-padrão para α -lactoalbumina.

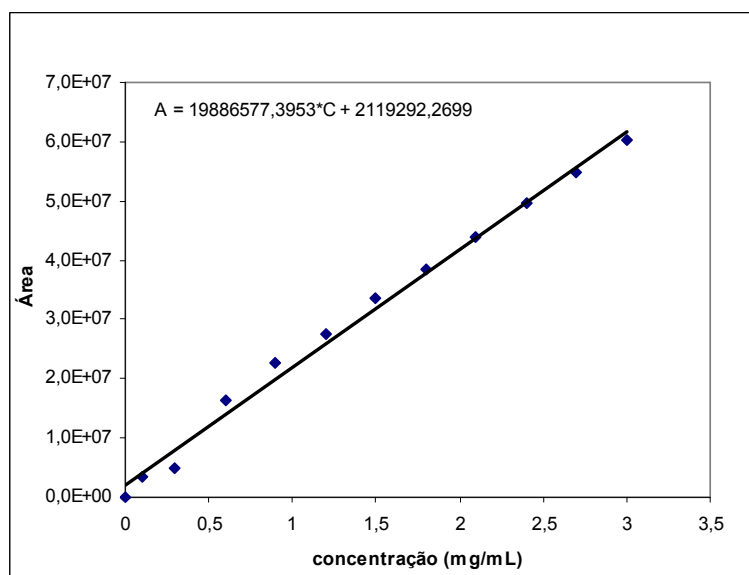


Figura 16 - Curva-padrão para β -lactoglobulina.

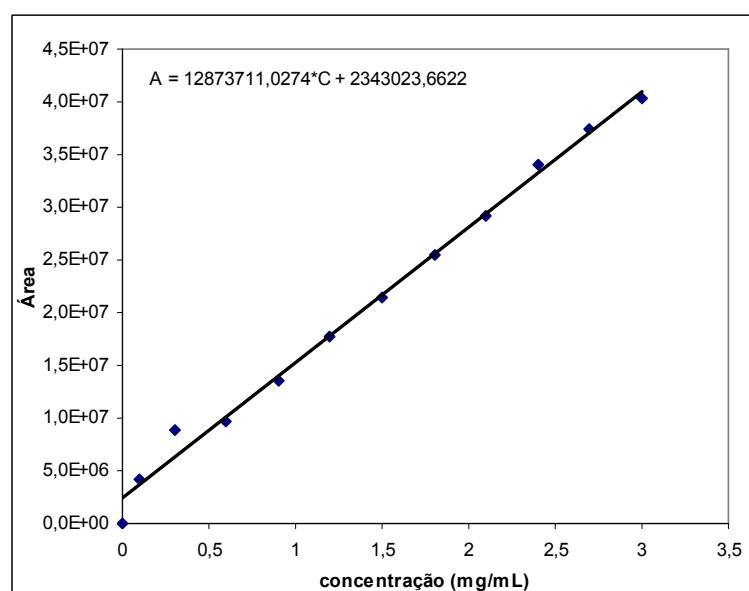


Figura 17 - Curva-padrão para o glicomacropéptido.

5.3.2. Quantificação das Proteínas do Soro *in natura*

Na Figura 18 observa-se um cromatograma da amostra do soro *in natura*, proveniente da fabricação de queijo Minas Frescal, empregado nos experimentos de fracionamento da α -lactoalbumina, glicomacropéptido e β -lactoglobulina. A β -lg apresenta dois picos característicos, representando as suas variantes genéticas A e B, respectivamente (FERREIRA, 2001). As concentrações das proteínas (α -la, β -lg e GMP) presentes no soro *in natura* são apresentadas na Tabela 26.

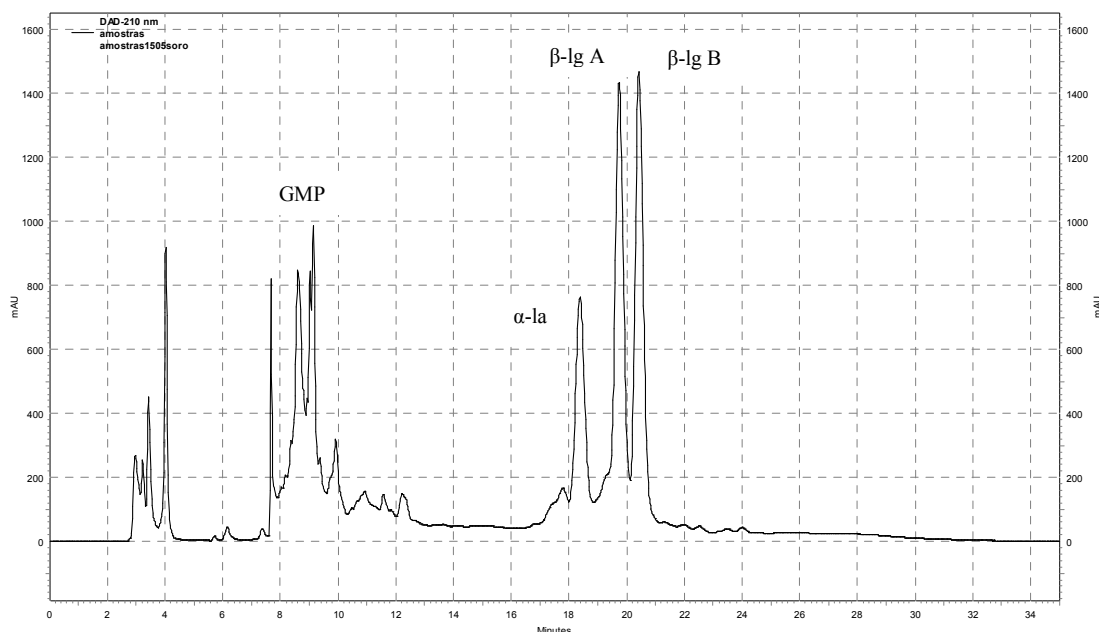


Figura 18 – Perfil cromatográfico do soro *in natura* em coluna C18-HPLC.

5.3.3 Caracterização da Composição Química do Soro

Na Tabela 26 são apresentados os resultados médios obtidos para a composição química do soro de queijo tipo Minas frescal.

Tabela 26 – Composição química do soro doce, obtido a partir da fabricação de queijo tipo Minas frescal.

Constituinte	Soro Doce
Lactose (g/L)	41,2
α -lactoalbumina (g/L)	1,625
β -lactoglobulina (g/L)	3,013
Glicomacropéptido (g/L)	2,259
Ácido Lático (% m/v)	0,107
pH	6,53

5.4 Fracionamento de α -Lactoalbumina, Glicomacropéptido e β -Lactoglobulina de Soro de Leite *in natura*

Para a etapa de fracionamento das proteínas do soro *in natura* (α -la, GMP e β -lg), escolheu-se trabalhar com os SAB PEG/fosfato, pois esses sistemas

apresentaram valores de coeficiente de partição maiores para a α -la e GMP em comparação àqueles obtidos em SAB PEG/citrato, sendo que para a β -lg, os resultados dos coeficientes de partição entre esses dois sistemas foram praticamente os mesmos.

Em relação ao SAB PEG/sulfato, apesar de ter-se obtido uma condição de mínimo para a partição da β -lg nesse sistema, o mesmo quando comparado ao SAB PEG/fosfato, apresenta desvantagens como: custo mais elevado em relação aos demais sais e a não aplicabilidade desse sal em processos nas indústrias alimentícias.

O sal fosfato possui grande aplicação no processamento de alimentos, como estabilizantes em compostos lácteos (BRASIL, 2007) e como aditivos alimentares em produtos cárneos (SAMPAIO, 2001), dentre outros. Este sal não é tóxico, ambientalmente seguro e apresenta baixo custo.

A condição de pH e concentração molar de NaCl do sistema foi determinada por meio da análise canônica da superfície de resposta da partição da β -lg em SAB PEG/fosfato. Esta condição correspondeu a pH 5,43 e 0,290 M de NaCl.

Avaliou-se as diferentes diluições do soro (integral, 1:1 e 1:3) empregadas nos sistemas, e após a quantificação do conteúdo de α -lactoalbumina, β -lactoglobulina e glicomacropéptido presentes nas fases (superior e inferior), calculou-se a taxa de redução para a α -la, fator de purificação e rendimento de extração da β -lg, ambas na fase salina, após os três estágios de extração.

Determinou-se também o rendimento de extração da α -la e do GMP na fase polimérica, após o primeiro estágio de extração. Na Tabela 27 estão apresentados os resultados médios obtidos.

Na Figura 19 está apresentado um exemplo de um perfil cromatográfico dos três estágios de extração, empregando a concentração de 3 mL de soro *in natura* nos sistemas.

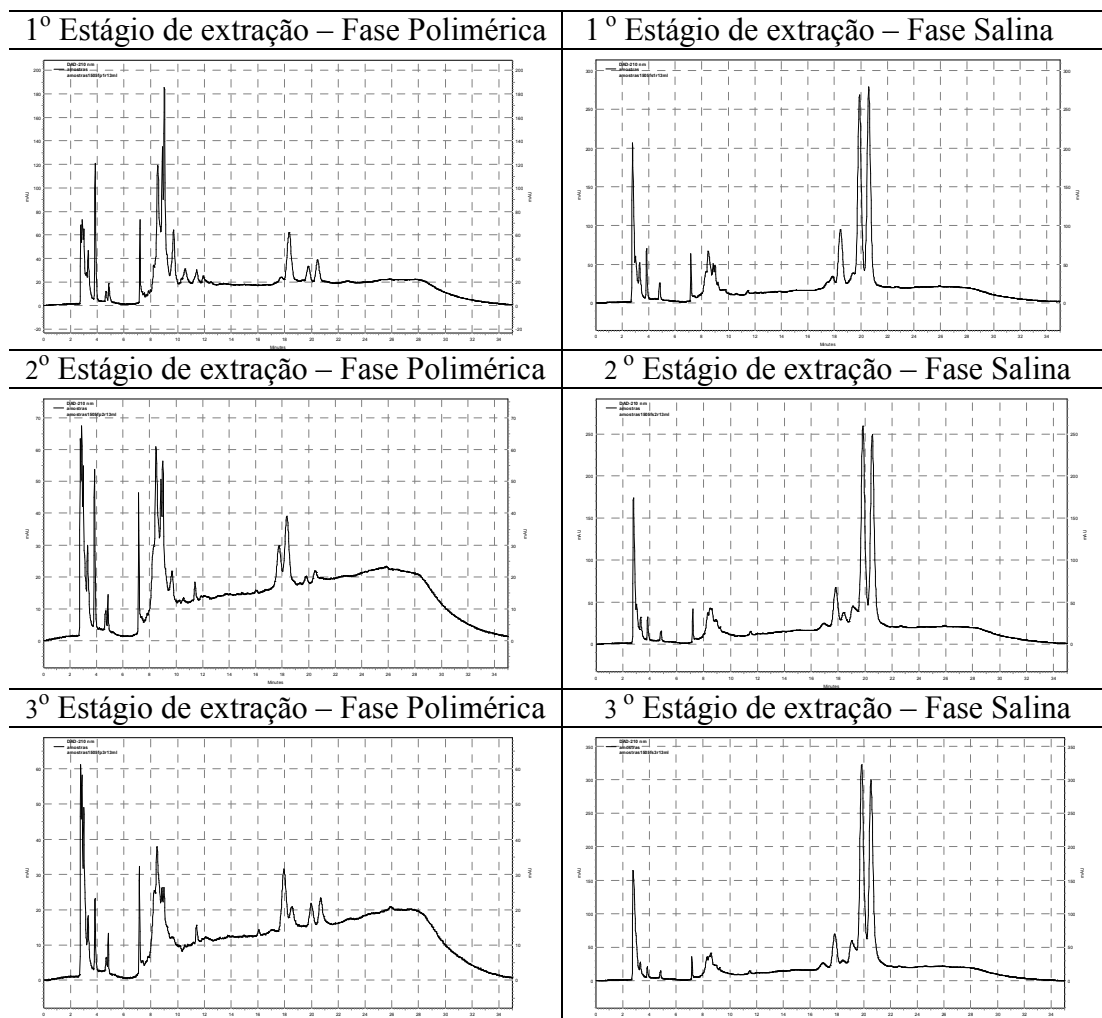


Figura 19 – Perfil cromatográfico dos três estágios de extração, empregando a concentração de 3 mL de soro integral e *in natura* em coluna C18-HPLC.

Tabela 27 – Resultados médios obtidos para a taxa de redução para a α -la ($TR_{\alpha-la}$), fator de purificação da β -lg ($FP_{\beta-lg}$) e rendimento de extração da α -la ($Y_{\alpha-la}$), da β -lg ($Y_{\beta-lg}$) e do GMP (Y_{GMP}) em função das diferentes diluições de soro *in natura*.

Diluição	$TR_{\alpha-la}$	$FP_{\beta-lg}$	$Y_{\alpha-la}$	$Y_{\beta-lg}$	Y_{GMP}
integral	$5,56 \pm 0,155$	$96,25 \pm 0,036$	$50,60 \pm 1,293$	$97,31 \pm 0,023$	$85,27 \pm 0,159$
1:1	$4,90 \pm 0,483$	$94,87 \pm 0,036$	$49,50 \pm 1,617$	$89,72 \pm 1,746$	$78,54 \pm 0,635$
1:3	$3,97 \pm 0,235$	$87,26 \pm 0,081$	$48,98 \pm 1,625$	$87,94 \pm 4,726$	$73,90 \pm 3,117$

De acordo com os resultados obtidos na Tabela 27, observa-se uma redução nos valores obtidos para todos os parâmetros a medida que as diluições do soro aumentaram, ou seja, a medida em que as proteínas estavam mais diluídas no sistema.

A explicação para esse comportamento baseia-se no fato de que as diluições do soro empregadas nos SAB proporcionam diferentes concentrações das proteínas nos sistemas, assim, a distância entre as moléculas de proteínas presentes no meio é diferente para cada condição de concentração. Isso resulta na diferença entre as interações das moléculas das proteínas e, conseqüentemente, em uma diferença da distribuição destas biomoléculas entre as fases do sistema (DA SILVA e LOH, 2006).

Os resultados obtidos foram submetidos a análise de regressão, para se verificar qual a melhor proporção de diluição para o fracionamento das proteínas do soro, dentro das concentrações testadas. Na Tabela 28 estão apresentados os resultados da análise de variância da regressão.

Como pode ser visto, na Tabela 28, os resultados da análise de regressão para os parâmetros fator de purificação da β -lg ($FP_{\beta\text{-lg}}$) e rendimento de extração da α -la ($Y_{\alpha\text{-la}}$) na fase polimérica, apresentaram valores de probabilidade (do modelo) acima de 5%, o que indica que as diferentes diluições de soro empregadas nos sistemas, não afetaram significativamente os resultados desses índices, podendo então, trabalhar-se com qualquer proporção de diluição para o fracionamento das proteínas do soro.

Já para a taxa de redução para a α -la ($TR_{\alpha\text{-la}}$) e rendimento de extração da β -lg ($Y_{\beta\text{-lg}}$) e do GMP (Y_{GMP}), observaram-se que as diferentes proporções de diluições de soro *in natura* empregadas nos sistemas, exerceram influência significativa ($p < 0,05$) nos resultados desses parâmetros.

Entretanto, para a $TR_{\alpha\text{-la}}$ o modelo linear testado não foi adequado para prever os valores das taxas de redução uma vez que apresentou uma falta de ajustamento do modelo (FAJ) significativa. Para os demais parâmetros a falta de ajuste do modelo foi não significativa ($p > 0,05$).

Tabela 28 - Resultado da ANOVA da regressão para a α -la ($TR_{\alpha-la}$), fator de purificação da β -lg ($FP_{\beta-lg}$) e rendimento de extração da α -la ($Y_{\alpha-la}$), da β -lg ($Y_{\beta-lg}$) e do GMP (Y_{GMP}) em função das diferentes diluições de soro *in natura*. ($FP_{\beta-lg}$: CV= 4,56 %, $Y_{\alpha-la}$: CV= 3,74 % e $TR_{\alpha-la}$: 2,71).

	FV	GL	QM	$Pr > F$
$TR_{\alpha-la}$	Modelo	2	1,9236	<0,0001
	Erro	6	0,0171	
	FAJ	1	0,3173	0,0050
	Total	8		
$FP_{\beta-lg}$	Modelo	2	54,6506	0,1419
	Erro	6	19,8625	
	FAJ	1	49,7260	0,1647
	Total	8		
$Y_{\alpha-la}$	Modelo	2	2,0505	0,5822
	Erro	6	3,4587	
	FAJ	1	0,0005	0,9905
	Total	8		
$Y_{\beta-lg}$	Modelo	2	88,3135	0,0302
	Erro	6	13,3106	
	FAJ	1	5,0336	0,5612
	Total	8		
Y_{GMP}	Modelo	2	69,4847	0,0175
	Erro	6	8,1167	
	FAJ	1	3,9744	0,5103
	Total	8		

Os modelos lineares dos parâmetros em função das diferentes diluições do soro são apresentados da Tabela 29.

Tabela 29 – Modelos lineares obtidos para o rendimento de extração da β -lg ($Y_{\beta-lg}$) e do GMP (Y_{GMP}) em função das diferentes diluições de soro *in natura*.

Parâmetro	Modelo	C.V	R^2
$Y_{\beta-lg}$	$\hat{y} = 83,1767 + 4,8876 * x$	3,97 %	0,972
Y_{GMP}	$\hat{y} = 71,41 + 4,1403 * x$	3,62%	0,971

em que x é a quantidade de soro adicionadas ao sistema, sendo que os valores variam de 0,750 mL a 3 mL.

De acordo com os modelos obtidos na Tabela 29 nota-se que todos os coeficientes do modelo foram positivos, sendo assim, para a faixa de diluições do soro testadas, o aumento a concentração de soro empregado nos sistemas, proporciona um aumento linear dos valores de rendimento de extração da β -lg e do GMP. Para a α -la são obtidos as maiores taxas de redução desta na fase salina empregando o soro na forma integral.

Diante disso, verifica-se que a adição soro na forma integral (sem diluição), correspondeu a melhor proporção de soro a ser empregadas no processo de fracionamento das proteínas do soro. Além de resultar em maiores taxas de redução da α -la e maiores rendimentos de extração da β -lg, na fase salina, e do GMP, na fase polimérica, ao trabalhar-se com o soro na forma integral, torna-se possível extrair uma maior quantidade de proteína em cada estágio do processo, o que resulta no aumento do rendimento do processo como um todo.

6. CONCLUSÃO

A α -la, β -lg e GMP são proteínas do soro de leite com grandes potenciais tecnológicos. Os SAB podem ser utilizados para o fracionamento destas proteínas, uma vez que os resultados obtidos neste trabalho mostraram que a α -la e o GMP podem ser recuperados na fase superior e a β -lg extraída na fase inferior em todos os SAB avaliados.

Dentre os sistemas testados, para o SAB PEG/sulfato, foi obtido uma região onde o coeficiente de partição da β -lg é mínimo ($K=0,031$). Para os sistemas PEG/citrato, verificou-se que o pH exerceu um efeito positivo sobre o $K_{\alpha-la}$. Já para a β -lg o incremento da concentração de NaCl em determinadas condições de pH influenciou positivamente o coeficiente de partição, porém, nesses sistemas, todos os valores obtidos para o K foram muito baixos. Para o GMP foi alcançada a uma condição de ótimo, onde se tem um coeficiente de partição máximo ($K=0,912$).

Nos sistemas PEG/fosfato, o acréscimo de NaCl aos sistemas promoveu uma redução no valor do coeficiente de partição da β -lg e para a α -la, foi obtida região onde seu coeficiente de partição é mínimo ($K=0,330$), o que não é desejado tendo em vista um processo de fracionamento dessas proteínas.

Na etapa de fracionamento das proteínas do soro *in natura*, trabalhou-se com os SAB PEG/fosfato, por este apresentar valores de coeficiente de partição superiores aos obtidos em SAB PEG/citrato, e por possuir aplicação na indústria de alimentos e menor custo em relação ao sulfato de lítio.

Assim, avaliou-se o fracionamento das proteínas do soro *in natura* em sistema PEG/fosfato, testando diferentes diluições de soro adicionadas aos sistemas. Verificou-se que as diferentes proporções de soro *in natura* empregadas nos sistemas, afetaram significativamente ($p>0,05$) a taxa de redução da α -la, rendimento de extração da β -lg, na fase salina e rendimento de extração do GMP, na fase polimérica. Dentre as condições testadas, a adição de soro na forma integral nos sistemas, correspondeu aos maiores valores de taxa de redução da α -la na fase salina ($TR_{\alpha-la} = 5,56$), rendimento de extração do GMP na fase polimérica ($Y_{GMP} = 85,27\%$), fator de purificação e rendimento de extração da β -lg na fase salina, após três estágios de extração ($FP_{\beta-lg} = 96,25\%$ e $Y_{\beta-lg} = 97,31\%$, respectivamente). Portanto, conclui-se que sistema aquoso bifásico é uma técnica eficiente para o fracionamento

das proteínas α -lactoalbumina, β -lactoglobulina e glicomacropéptido do soro de leite *in natura*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTSSON, P. A. *Partition of Cell and Macromolecules*. New York: John Wiley, 1986. 346 p.

ALVES, J.G.L.F.; CHUMPITAZA, L.D.A.; DA SILVA, L.H.M.; FRANCO, T.T.; MEIRELLES, A.J.A. Partitioning of whey proteins, bovine serum albumin and porcine insulin in aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B*, v. 743, p. 235–239, 2000.

ALVES, J. G. L. F. *Estudo do equilíbrio líquido-líquido, da partição de insulina e da pré-purificação da proteína de fusão precursora da insulina humana em Sistemas Aquosos Bifásicos do tipo PEG/Sal*. 2003. 192 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 2003.

ARMAREGO, W.L.F.; CHAI, C.L.L. *Purification of Laboratory Chemicals*. 5th ed., Oxford: Butterworth Heinemann, 2003, 609 p.

ASENJO, J. A. *Separation Processes in Biotechnology*. New York: Marcell Dekker Inc., 1990, 801 p.

BAMBERGER, S.; BROOKS, D. E.; SHARP, K. A.; VAN ALSTINE, J. M.; WEBBER, T. J. Preparation of phase system and measurement of their physicochemical properties. In: BROOKS, D. E.; WALTER, H.; FISCHER, D. *Partitioning in aqueous two-phase system*. Orlando: Academic Press, 1985.

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

BIASOLI, P.K. *Modelagem conjunta de média e variância em experimentos fracionados sem repetição utilizando GLM*. 2005. 123 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

BOAGLIO, A. et al. Features of the milk whey protein partitioning in polyethyleneglycol-sodium citrate aqueous two-phases systems with the goal of isolating human alpha-1 antitrypsin expressed in bovine milk. *Journal of Chromatography B*, v. 837, p. 18-23, 2006.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAMAUD, C., AIMAR, P., DAVEEE, G. Whey protein fractionation: Isoelectric precipitation of α -lactoalbumin under gentle heat treatment. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 56, p. 391-397, 1997.

BRASIL. Aprova o Regulamento Técnico que aprova o uso dos aditivos alimentares, coadjuvantes de tecnologia, estabelecendo suas funções e limites, e veículos para

suplementos vitamínicos e ou minerais. Resolução RDC nº 24, de 15 de fevereiro de 2005. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Diário Oficial da União*. Brasília, 16 de fevereiro de 2005.

BRASIL. Aprova o Regulamento Técnico para fixação de identidade e qualidade de composto lácteo. Instrução normativa n 028, de 12 de junho de 2007. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Diário Oficial da União*. Brasília, 14 de junho de 2007.

BRODY, E.P. Biological activities of bovine glycomacropeptide. *British Journal of Nutrition*, v.84, p.39-46, 2000.

BYLUND, G. *Dairy processing handbook*. Tetra Pak Processing Systems, 1995, 427 p.

CABEZAS Jr., H. *J. Chromatography B*, In: Anal. Technol. Biomed. Life Sci , v. 3, 1996, 680 p.

CAPEZIO, L., ROMANINI, D., Picó, G.A., NERLI, B. Partition of whey milk proteins in aqueous two-phase systems of polyethylene glycol phosphate as a starting point to isolate proteins expressed in transgenic milk. *Journal of Chromatography B*, v. 819, p. 25–31, 2005.

CARVALHO, C.P. *Estudo do Equilíbrio de Fases para Sistemas Aquosos Bifásicos Compostos por Poli (Etileno) Glicol, Sais e Água*. 2004. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, 2004.

CASCONE, O.; ANDREWS, B. A. and ASENJO, J. A. Partitioning and Purification of thaumatin in aqueous two-phase system. *Enzyme Microbiology Technology*, v. 13, p. 629, 1991.

CHAO WU, AMES, IA(US). *Whey Treatment Process for Achieving High Concentration of α -Lactalbumin*. US Patent 6,312,755 B1.; 2001.

CHATTERTON, D.E.W., SMITHERS, G., ROUPAS. P., BRODKORB, A. Bioactivity of β -Lactoglobulin and α -Lactalbumin - Technological Implications for Processing. *International Dairy Journal*. v. 16, p. 1229-1240, 2006.

COIMBRA, J.S.R., THOEMMES, J., KULA, M.R., SILVA, L.H.M., MEIRELLES, A.J.A. Separation of β -lactoglobulin from cheese whey using an aqueous two-phase system. *Arq. Biol. Tecnol.* v. 40, p. 189-196, 1995.

COSTA, S. A.; PESSOA JR., A.; ROBERTO, I. C. Partitioning of xylanolytic complex from *Penicillium janthinellum* by an aqueous two-phase system. *Journal of chromatography B*, v. 743, p. 339-348, 2000.

COSTA, S. A.; PESSOA JR., A.; ROBERTO, I. C. Xilanase Recovery. Effect of extraction conditions on the aqueous two-phase system using experimental desing. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 629, p. 70-72, 1998.

COULSON, J.M., RICHARDSON, J.F., BACKHURST, J.R., HARKER, J.H. *Chemical engineering - particle technology and separation processes*. 4thed., Oxford: Butterworth Heinemann, 1996.

CUSACK, R.W., FREMAUX, P., GLATZ, D. A fresh look at liquid-liquid extraction. *Chemical Eng.* v. 98, p.66-76, 1991.

DA SILVA, L.H.M., COIMBRA, J.S.R., MEIRELLES, A.J.A. Equilibrium phase behaviour of poly (ethylene) glycol + potassium phosphate + water two-phase systems at various pH and temperatures. *Journal of Chemical & Engineering Data*, v. 42, p. 398-401, 1997.

DA SILVA, L.H.M., MEIRELLES, A.J.A. Bovine serum albumin, α -lactoalbumin and β -lactoglobulin partitioning in polyethylene glycol/maltodextrin aqueous-two-phase systems. *Carbohydrate Polymers*, v. 42, p. 398-401, 2000.

DA SILVA, L.H.M.; LOH, W. Sistemas Aquosos Bifásicos: Fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. *Química Nova*, v. 29, p. 1345-1351, 2006.

DA SILVA, M. C. H.; SILVA, L. H. M.; ÁMIM JÚNIOR, J.; GUIMARAES, R. O.; MARTINS, J. P. Liquid-Liquid Equilibrium of Aqueous Mixture of Triblock Copolymers L35 and F68 with Na₂SO₄ or Li₂SO₄ or MgSO₄. *Journal of Chemical & Engineering Data*, v. 51, p. 2260-2264, 2006.

DA SILVA, C.A.S. *Partição do Glicomacropéptido usando sistemas aquosos bifásicos*. 2007. 57 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2007

DEUTSCHER, M.P. *Methods in Enzymology - Guide to Protein Purification*. USA: Academic Press, Inc., v.182, 1990, 894p.

DeWIT, J.N.; BRONTS, H. *Process for the Recovery of α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin from a Whey Protein Product*. US Patent 5,420,249; 1995.

DIAMOND, A. D. and HSU, J. T. Fundamental studies of biomolecules partitioning in aqueous two-phase systems. *Biotech. Bioeng.* v. 34, p. 1000-1014, 1989.

DZIUBA, J. & MINKIEWICZ, P. Influence of glycosylation on micelle-stabilizing ability and biological properties of *c*-terminal fragments of cow's κ -casein. *Int. Dairy Journal*, v. 6, p. 1017-1044, 1996.

EL-SALAM, A.M.H., EL-SHIBINY, S., BUCHHEIM, W. Characteristics & potential uses of the casein macropeptide. *International Dairy J.*, v. 6, p. 327-341, 1996.

FERREIRA, R.C. *Separação de α -lactoalbumina e β -lactoglobulina de proteínas do soro de queijo por adsorção em colunas de leito fixo*. Vicosa, MG: UFV, 2001. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2001.

FORCINITI, D. and HALL, C. K. Influence of polymer molecular weight in temperature on phase composition in APTS. *Fluid Phase Equilibria*, v. 61, p. 243-262, 1991.

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

GARCÍA, M.C.; MARINA, M.L; TORRE, M.; Ultrarapid Detection of Bovine Whey Proteins in Powdered Soybean Milk by Perfusion Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 822, p. 22-232, 1998.

GODFREY, J.C. & SLATER, M.J. *Liquid-liquid Extraction Equipment*. Bradford, U.K: John Wiley & Sons, 1994, 772 p.

GRASSELLI, M., NAVARRO, A., FERNANDEZ, H.L., MIRANDA, M.V., CAMPERI, Y. CASCONI. O. Que hacer com el suero de queso. *Ciencia Hoy*, v. 43, 1997.

GÜNDÜZ, U. and KORKMAZ, K. Bovine serum albumin partitioning in aqueous two-phase system: Effect of pH and sodium chloride concentration. *Journal of Chromatography B*, v. 743, p. 255-258, 2000.

HATTI-KAUL, R. Aqueous two-phase systems: A general overview. *Molecular biotechnology*, v. 19, p. 269-277, 2001.

HUSTED, H., CORNER K.H., KULA, M.R. Partition in aqueous two-phase systems, *Trends Biotech*, v. 3, p. 139-144, 1985.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. 3° ed. São Paulo, 1985, 533p.

JOHANSSON, H.O., MAGALDI, F.M., FEITOSA, E., PESSOA JR., A. Protein partitioning in poly(ethylene glycol)/sodium polyacrylate aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography A*, v. 1178, p. 145-153, 2008.

JOHANSSON, H.O; KARLSTRÖM, G.; TJERNELD, F. and HAYNES, C. A. Driving forces for phase separation and partitioning in aqueous two-phase systems. *J. Chromatography B*, v. 711, p. 3-17, 1998.

JOHANSSON, G.; ANDERSON, M.; AKERLUND, H-E. Counter distribution of yeast enzymes with polymer-bound triazine dye affinity ligands. *Journal of Chromatography*, v. 289, p. 483-493, 1984.

KABIRI-BADR, M. and Cabezas Jr., H. A thermodynamic model for the phase behavior of salt-polymer aqueous two-phase systems. [*Fluid Phase Equilibria*, v.115 \(1-2\)](#), p.39-58, 1996.

KORHONEN, H. and PIHLANTO, A. Bioactive peptides: production and functionality. *International Dairy Journal*, v.16, p. 945-960, 2006.

LEHNINGER, A. L. *Bioquímica*. São Paulo: Edgard Blucher. p. 126-145, 1976.

LIESKE, B.; KONRAD, G.; KLEINSCHMIDT, T.H. Isolation of caseinmacropeptide from rennet whey by a multi-stage ultrafiltration process. Influence of pH and heating on the carbohydrate moiety of glycomacropeptide. *Milchwissenschaft*, v.59, p.291-294, 2004.

LIU, S.X. *Food and Agricultural Wasterwater Utilization and Treatment*, Iowa: Blackwell Publishing Ltda, 2007, 277 p.

LUCENA, M.E.; ALVAREZ, S.; MENÉNDEZ, C.; RIEIRA, F. A.; ALVAREZ, R. α -Lactalbumin Precipitation From Commercial Whey Protein Concentrates. *Journal of Separation and Purification Technology*, v. 52, p. 446-453, 2007.

MAROULIS, Z.B.; SARAVACOS, G.D. *Food Plant Economics*, New York: CRC Press - Taylor & Francis Group, 2008, 352 p.

MERCK. Disponível em: < <http://chemdat.merck.de> >. Acessado em 14/07/2009.

MIKKELSEN, T. L.; H. FRØKIÆR, H.; TOPP, C.; BONOMI, F.; IAMETTI, S.; PICARIELLO, G.; FERRANTI, P.; BARKHOLT, V. Caseinmacropeptide Self-Association is Dependent on Whether the Peptide is Free or Restricted in κ -Casein. *Journal of Dairy Science*, v. 88, p. 4228–4238, 2005.

MILLER, G. L. Use of dinotrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, v. 31, n. 3, 1959.

MILLER, G.D.; JARVIS, J.K.; McBEAN, L.D. *Handbook of Dairy products and nutrition*, 2nd ed., Illinois: CRC Press LLC, 2000, 423 p.

MOOR, C. & HA, E. W. Whey protein concentrates and isolates processes and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Columbus, v.33, n. 6, p.431-476, 1993.

MONTEIRO, P.S.; COIMBRA, J.S.R.; Minim, L.A.; Oliveira, J.A., DA SILVA, L.H.M. Partition of α -lactalbumin and β -lactoglobulin by cloud point extraction. *Journal of Chromatography B*, 867, p. 189-193, 2008.

NAKANO, T.; SILVA-HERNANDEZ, E.R.; IKAWA, N.; OZIMEK, L. Purification of κ -casein glycomacropeptide from sweet whey with undetectable level of phenylalanine. *Biotechnology Prog.*, v. 18, n. 2, p.409-412, 2002.

NOPPE, W., HAEZEBROUCK, P., HANSSENS, I., CUYPER, M.D. A Simplified Purification Procedure of α -Lactalbumin From Milk Using Ca^{2+} -dependent Adsorption in Hydrofobic Expanded Bed Chromatography. *Bioseparation*, v. 8, p. 153-158, 1999.

OLIVA, Y.; ESCOBAR, A.; PONCE, P. Caseinmacropeptide bovino: una alternativa para la salud. *Salud Anim.*, v. 24, n. 2, p. 73-81, 2002.

OLIVEIRA, R. M. *Equilíbrio de fases de sistemas aquosos bifásicos compostos por polietilenoglicol, sulfato de zinco, sulfato de cobre e citrato de sódio sob diferentes temperaturas*. 2006. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa; 2006.

OUTINEN, M.; TOSSAVAINEN, O.; TUPASELA, T.; KOSKELA, P.; KOSKINEN, H.; RANTAMAKI, P.; SYVAOJA, E.L.; ANTILA, P.; KANKARE, V. Fractionation of proteins from whey with different pilot scale processes. *Lebensm. Wiss. Technol.* v. 29, p. 411-417, 1996.

PERRY, R. H., GREEN, D. W. *Perry's chemical engineer's handbook*. 7th ed. New York: McGraw-Hill co., 1997, 2640 p.

PESSOA, JR. e KILIKIAN, B. V. *Purificação de Produtos Biotecnológicos*. Barueri: Manole, 2005, 444 p.

RICHARDS, N.S.P.S. Soro Lácteo – Perspectivas industriais e proteção ao meio ambiente. *Food Ingredients*, v. 17, p. 20-27, 2002.

RITO-PALOMARES, M., HERNANDEZ, M. Influence of system and process parameters on partitioning of cheese whey proteins in aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B*, v. 711, p. 81-90, 1998.

SALABAT, A. The influence of salts on the phase composition in aqueous two-phase systems: experiments and predictions. *Fluid Phase Equilibria*, v. 187–188, p. 489–498, 2001.

SARUBBO, L. A. *Caracterização de um novo sistema bifásico aquoso e aplicação em extração de proteínas com coluna de discos perfurados rotativos*. 2000. 174 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

SAMPAIO, G.R., LOBÃO, V.L., ROCCO, S.C. Uso de fosfatos como aditivos alimentares na redução de exsudato e nos atributos sensoriais da carne do camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii*. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, v.27, n.1, p. 97 - 107, 2001.

SARAVANAN, S.; RAO, J.R.; NAIR, B.U.; THIRUMALACHARI, R. Aqueous two-phase poly(ethylene glycol)–poly(acrylic acid) system for protein partitioning: Influence of molecular weight, pH and temperature. *Process Biochemistry*, v. 43, p. 905–911, 2008.

SAS Institute Inc. *Getting Started with the SAS[®] 9,0 ADX Interface for Design of Experiments*. Cary, NC: SAS Institute Inc., 2004.

SCHMIDT, A. S.; VENTON, A. M.; ASENJO, J. A. Partitioning and purification of α -amylase in aqueous two-phase. *Enzyme Microbiology Technology*. v. 16, p. 131-142, 1996.

SGARBIERI, V.C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. *Revista de Nutrição*, v. 17, n. 4, p. 397-409, 2004.

SGARBIERI, V.C. Revisão: Propriedades Estruturais e Físico-Químicas das Proteínas do Leite. *Brazilian Journal of food technology*, v. 8, n. 1, p. 43-56, 2005.

SIGMA-ALDRICH. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/sigma-aldrich/home.html>> Acessado em 01/07/2009.

SU, C. K. and CHIANG, B. H. Partitioning and purification of lysozyme from chicken egg white using aqueous two-phase system. *Process Biochemistry*. v. 41, p. 257–263, 2006.

TABOADA, M. E. Liquid–liquid and solid–liquid equilibrium of the 1-propanol+ lithium sulfate + water system at 25, 35 and 45 °C. *Fluid Phase Equilibria*, v. 5111, p. 1–11. 2002.

TAKAHASHI, N. ASAKAWA, S. DOSAKO, S., TADASHI, I. *Hypoallergenic nutritive composition*. French Pat. Appl., 1992.

TJERNELD, F.; PERSSON, I.; ALBERTSSON, P-A. Enzymatic hydrolysis of cellulose in aqueous two-phase systems. Partition of cellulases from *Trichoderma reesei*. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 27, p. 1036-1043, 1985.

TUBÍO, G.; NERLI, B.; PICÓ, G. Partitioning features of bovine trypsin and α -chymotrypsin in polyethyleneglycol-sodium citrate aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B*, v. 852, p. 244-249, 2007.

TUBÍO, G.; NERLI, B.; PICÓ, G. Relationship between the protein surface hydrophobicity and its partitioning behaviour in aqueous two-phase systems of polyethyleneglycol-dextran. *Journal of Chromatography B*, v. 799, p. 293-301, 2004.

VEREDAS, V. *Purificação da α -lactoalbumina a partir do soro de leite em leite fixo e expandido de resinas*. 2000. 91 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

VIOTTO, W. H. *Ultrafiltração de soro doce de queijo minas frescal: efeito de pré tratamento de soro no desempenho na membrana de ultrafiltração e na composição e solubilidade do concentrado protéico de soro*. 1993. 212 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1993.

VOJDANI, F. Solubility. In: Hall, G.M. *Methods of testing protein functionality*. London: Blackie Academic & Professional, 1996, p.11-60.

WOOD, R.A. *Food Allergies for Dummies*. Indianapolis: Wiley Publishing, Inc., 2007, 358p.

YADA, R.Y. *Protein in Food Processing*. England: Woodhear Publishing, 2004, 728 p.

YVON, M., BEUCHER, S., GUILLOTEAU, P., LEHUEROU-LURON, I., CORRING. T. Effects of caseinomacropéptide (CMP) on digestion regulation. *Reprod. Nutr. Dev.*, v. 34, n. 6, p. 527-537, 1994.

ZASLAVSKY, B.Y. *Aqueous Two-Phase Partitioning*. New York: Marcel Decker, 1995. 696 p.

ZYDNEY, A.L.; PUJAR, N.S., Protein transport through porous membranes: effects of colloidal interactions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering*

Aspects, v. 138, p. 133-143, 1998.

ZUÑIGA, A.D.G. *Sistemas Aquosos Polietileno glicol-Sal: Separação de α -lactoglobulina e β -lactoglobulina do Soro de Queijo e Hidrodinâmica em um Extrator Graesser*. 2000. 78 f.
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2000.

ZUÑIGA, A.D.G., COIMBRA, J.S.R., MINIM, L.A. Coeficientes de partição da α -lactoalbumina e β -lactoglobulina em sistemas aquosos bifásicos: influência da massa molar do polímero. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, v. 3, n. 3, p. 149-155. 2001.