

GUILHERME MENDES DA SILVA

**PROCESSO INTEGRADO PARA FRACIONAMENTO DAS PROTEÍNAS α -
LACTOALBUMINA E β -LACTOGLOBULINA DO SORO DE LEITE**

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*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

S586p
2017
Silva, Guilherme Mendes da, 1986-
Processo integrado para fracionamento das proteínas α -
lactoalbumina e β -lactoglobulina do soro de leite / Guilherme Mendes
da Silva. - Viçosa, MG, 2017.
xv, 115f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Jane Sélia dos Reis Coimbra.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.100-113.

1. Tecnologia dos alimentos. 2. Leite - Microbiologia. 3.
Hidroxiapatita. 4. Alfa-lactoalbumina. 5. Beta-lactoglobulina. I.
Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia de
Alimentos. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos. II. Título.

CDD 22 ed. 664.07

GUILHERME MENDES DA SILVA

PROCESSO INTEGRADO PARA FRACIONAMENTO DAS PROTEÍNAS α -
LACTOALBUMINA E β -LACTOGLOBULINA DO SORO DE LEITE

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: 17 de julho de 2017.



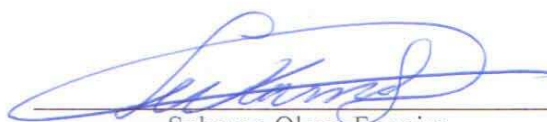
Eduardo Basílio de Oliveira
(Coorientador)



Maurício de Oliveira Leite
(Coorientador)



Rita de Cássia Superbi de Sousa



Sukarno Olavo Ferreira



Jane Sélia dos Reis Coimbra
(Orientadora)

Dedico a DEUS, minha família, meus mestres e amigos.

Força, foco e fé.

AGRADECIMENTOS

A Deus acima de tudo pela saúde, força e paciência para encarar os desafios.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

À professora Jane Sélia dos Reis Coimbra, pela orientação, confiança, amizade, pelos ensinamentos proporcionados e principalmente por todas as palavras de incentivo e carinho.

Ao Dr. Maurício de Oliveira Leite, pelos grandes ensinamentos transmitidos, pelo acompanhamento frequente e ao auxílio na realização de várias etapas do trabalho.

Aos membros da banca: professor Eduardo Basílio de Oliveira, professora Rita de Cássia Superbi de Sousa e professor Sukarno Olavo Ferreira.

Ao doutorando José Antônio de Queiroz Lafetá Júnior, pela grande amizade e as valiosas sugestões e ensinamentos compartilhados.

Aos demais professores e funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos, pelos ensinamentos e contribuições.

Às equipes dos Laboratórios: Laboratório de Biocombustíveis, Laboratório de raios X, Laboratório de espectroscopia Raman, Laboratório de embalagens e Laboratório de Infravermelho por disponibilizar a estrutura necessária à realização das análises, sem vocês não seria possível à execução deste trabalho.

Ao João Vítor Madella e José Flávio Moreira pela amizade e auxílio frequente na execução dos experimentos;

Aos amigos do Laboratório de Operações e Processos: Mara Rose, Maurício Palmeira, Monique, Bruna, Pedro, Zoila, Kelly, Gerson, Michele, Camila, Otávio, Lucas, Héctor, Cláudia, Bárbara, Raíza, Thaís e Thomás, pelo companheirismo e bons momentos.

Aos amigos da república pela amizade de sempre: Gerson e Elias.

À minha família: Minha mãe Geralda, meus irmãos Eduardo, Leandro, Carina, Cláudia e Débora, minha princesa Sophia e minha namorada Raissa. Pessoas que me amam e que eu amo, incondicionalmente.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para mais esta conquista,

Meus sinceros agradecimentos.

BIOGRAFIA

GUILHERME MENDES DA SILVA, filho de Eduardo Alves da Silva e Geralda Figueiredo Mendes, nasceu em Alvinópolis, Minas Gerais, em 12 de maio de 1986.

Em março de 2011, iniciou o curso de Graduação em Ciência e Tecnologia de Laticínios na Universidade Federal de Viçosa e graduou-se em julho de 2015. Em julho deste mesmo ano, iniciou o curso de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Ciência e Tecnologia de Alimentos, submetendo-se à defesa de dissertação em julho de 2017.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
1. Introdução	1
2. Objetivo	3
2.1. Geral	3
2.2. Objetivos específicos	3
3. Revisão bibliográfica	4
3.1. Mercado de lácteos	4
3.2. Soro de leite	5
3.2.1. Composição do soro de leite	7
3.2.2. Proteínas do soro de leite	8
3.2.3. β -Lactoglobulina (BLG)	10
3.2.4. α -Lactoalbumina (ALA)	12
3.3. Concentração, fracionamento, isolamento e purificação de proteínas	14
3.3.1. Precipitação seletiva	15
3.3.2. Adsorção	20
3.3.3. Dessorção	25
3.3.4. Métodos cromatográficos	25
3.3.5. Cromatografia de exclusão molecular (CEM)	26
3.4. Hidroxiapatita como adsorvente	27
3.5. Métodos analíticos para identificação de compostos	28
3.5.1. Sistema de energia dispersiva (EDS)	28
3.5.2. Difração de raios X (DRX)	29
3.5.3. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)	30
3.5.4. Espectroscopia Raman	31
3.6. Estudo da adsorção	32
3.6.1. Potencial Zeta (ζ)	32
3.6.2. Cinética de adsorção	32
3.6.3. Isotermas de adsorção	34
4. Material e métodos	36
4.1. Procedimento experimental	36
4.2. Síntese da hidroxiapatita	39
4.3. Caracterização da hidroxiapatita	40
4.3.2. Microscopia eletrônica de varredura	40
4.3.3. Difração de raios X (DRX)	41
4.3.4. Espectroscopia no infra-vermelho com Transformada de Fourier	41
4.3.5. Espectroscopia Raman	41

4.3.6.	Potencial Zeta (ζ).....	41
4.4.	Estudo da adsorção de ALA e BLG em HA	42
4.4.1.	Cinética de adsorção	42
4.4.2.	Isoterma de adsorção	43
4.5.	Separação das proteínas ALA e BLG do soro de leite.....	44
4.5.1.	Obtenção do soro de leite.....	44
4.5.2.	Quantificação de ALA e BLG	45
4.5.3.	Precipitação seletiva.....	46
4.5.4.	Adsorção	46
4.5.5.	Dessorção	47
4.5.6.	Cromatografia de exclusão molecular (CEM).....	47
5.	Resultados e Discussão	49
5.1.	Caracterização da hidroxiapatita.....	49
5.1.1.	Microscopia eletrônica de varredura.....	49
5.1.2.	Espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS).....	50
5.1.3.	Difração de raios X (DRX)	51
5.1.4.	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR).....	55
5.1.5.	Espectroscopia Raman.....	57
5.2.	Estudo da interação entre HA e as proteínas ALA e BLG comerciais	59
5.2.1.	Potencial Zeta (ζ).....	59
5.2.2.	Cinética de adsorção	60
5.2.3.	Isoterma de adsorção	66
5.3.	Separação de ALA e BLG a partir do soro de leite	74
5.3.1.	Pasteurização	77
5.3.2.	Obtenção do soro de leite.....	79
5.3.3.	Precipitação seletiva.....	81
5.3.4.	Adsorção de BLG da fase fluida	84
5.3.5.	Adsorção do precipitado ressuspenso	86
5.3.6.	Dessorção	87
5.3.7.	Cromatografia de exclusão molecular (CEM).....	91
5.3.8.	Resumo do processo de separação	95
6.	Conclusão	97
7.	Perspectiva de trabalhos futuros	99
8.	Referências Bibliográficas	100
	ANEXO 1	114

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Produtos obtidos a partir do soro de leite	5
Figura 2 - Estrutura terciária da BLG em três perspectivas	11
Figura 3 - Estrutura terciária da ALA em três perspectivas	13
Figura 4 - Esquema dos processos de separação utilizados na indústria de alimentos.....	14
Figura 5 - Vista lateral do conjunto de planos paralelos ABC.....	29
Figura 6 - Esquema do espalhamento Raman	31
Figura 7 - Esquema geral do processo de separação das proteínas ALA e BLG.....	38
Figura 8 - Esquema do processo para síntese de HA	40
Figura 9 - Procedimento para determinação da cinética de adsorção de HA-ALA.....	43
Figura 10 - Procedimento para determinação da isoterma de adsorção de HA-ALA/BLG....	44
Figura 11 - Esquema da cromatografia de exclusão molecular.	48
Figura 12 - MEV das hidroxiapatitas	50
Figura 13 - Difratoograma das HAs comercial e sintetizada.	53
Figura 14 - Difratoograma padrão de HA.	53
Figura 15 - Difratoogramas das HAs comercial e sintetizada e da adsorção de ALA e BLG às respectivas HAs.....	55
Figura 16 - Espectro de FT-IR das HAs comercial e sintetizada.....	56
Figura 17 - Espectros de FT-IR das proteínas ALA e BLG adsorvidas às HAs comercial e sintetizada.....	57
Figura 18 - Espectro Raman das amostras de HA comercial, sintetizada e da adsorção das proteínas ALA e BLG adsorvidas às respectivas HAs.....	58

Figura 19 - Potencial Zeta das proteínas ALA e BLG, das HA comercial e sintetizada e do sistema adsorptivo proteína/HA	60
Figura 20 - Cinética de adsorção em pH 3,4; 6,0; 7,0 e 8,0	62
Figura 21 - Modelo linearizado pseudo-segunda ordem.....	64
Figura 22 - Isotermas de adsorção ajustada ao modelo de Langmuir em pH 3,4 e 6,0.....	68
Figura 23 - Isotermas de adsorção ajustada ao modelo de Freundlich em pH 3,4 e 6,0.....	69
Figura 24 - Cromatograma da solução padrão contendo ALA e BLG	75
Figura 25 - Esquema geral do processo de separação das proteínas ALA e BLG.....	76
Figura 26 - Cromatograma do leite cru.	77
Figura 27 - Quantificação das proteínas ALA e BLG da pasteurização do leite	78
Figura 28 - Cromatograma do soro de leite.	80
Figura 29 - Quantificação das proteínas ALA e BLG da obtenção do soro de leite.....	81
Figura 30 - Cromatograma da fase fluida e precipitado ressuspendido	82
Figura 31 - Quantificação das proteínas ALA e BLG na precipitação seletiva	83
Figura 32 - Quantificação de ALA e BLG para o processo de adsorção em HAcom e HASint	85
Figura 33 – Quantificação de ALA e BLG da adsorção em HA comercial e sintetizada (precipitado ressuspendido).....	87
Figura 34 - Cromatogramas do precipitado ressuspendido (B) e da solução contendo as proteínas ALA e BLG após a dessorção (A).....	88
Figura 35 - Cromatogramas da fase fluida (B) e da solução contendo as proteínas ALA e BLG após a dessorção (A).	89
Figura 36 – Quantificação de ALA e BLG após a dessorção (fase fluida).....	90

Figura 37 – Quantificação de ALA e BLG após a dessorção (solução ressuspendida).....	91
Figura 38 - Cromatograma após a CEM (solução ressuspendida).....	92
Figura 39 - Cromatograma após a CEM (fase fluida).....	93
Figura 40 - Quantificação das proteínas ALA e BLG após a CEM (fase fluida)	94
Figura 41 - Quantificação das proteínas ALA e BLG após CEM (solução ressuspendida) ...	95
Figura 42 - Resumo do processo de separação das proteínas ALA e BLG a partir do soro de leite	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Produtos à base de soro de leite nos Estados Unidos em 2013.....	7
Tabela 2 - Composição média do leite, soro doce e ácido.	8
Tabela 3 – Conteúdo proteico do soro de leite	9
Tabela 4 – Pesquisas envolvendo a precipitação seletiva para separação de proteínas do soro do leite.	17
Tabela 5 - Estudos envolvendo a adsorção de proteínas do soro de leite em hidroxiapatita. .	22
Tabela 6 – Distância interplanar [$d(\text{Å})$] das HAs padrão, comercial e sintetizada	51
Tabela 7 - Picos dos espectros Raman e IR obtidos para as HAs comercial e sintetizada comparados com dados de referência.....	58
Tabela 8 - Parâmetros de ajuste do modelo de pseudo-segunda ordem aos dados dos experimentos cinéticos.	65
Tabela 9 - Parâmetros do modelo de Langmuir para adsorção de ALA e BLG em HA comercial e sintetizada.	72
Tabela 10 - Parâmetros do modelo de Freundlich para adsorção de ALA e BLG em HA comercial e sintetizada.	73
Tabela 11 - Especificações dos equipamentos a serem utilizados neste projeto.....	114
Tabela 12 - Especificações dos materiais reagentes a serem utilizados neste projeto.	115

RESUMO

SILVA, Guilherme Mendes da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2017. **Processo integrado para fracionamento das proteínas α -lactoalbumina e β -lactoglobulina do soro de leite.** Orientadora: Jane Sélia dos Reis Coimbra. Coorientadores: Eduardo Basílio de Oliveira e Maurício de Oliveira Leite.

Hidroxiapatita (HA) foi sintetizada em meio aquoso com recipiente imerso em banho ultrassônico e testada para atuar como adsorvente das proteínas do soro de leite α -lactoalbumina (ALA) e β -lactoglobulina (BLG). Inicialmente foram realizadas análises para caracterizar o adsorvente. A relação cálcio/fosfato da HA sintetizada foi de 1,57. A partir da difração de raios X, verificou-se que o material apresentava elevada pureza, baixa cristalinidade (9 %) e cristais com tamanho médio de 27 nm. A espectroscopia de infravermelho revelou: (1) picos característicos de HA para o íon PO_4^{3-} nas regiões de 561, 1028 e 603 cm^{-1} e para o íon OH^- nas regiões de 1630 e 3068 cm^{-1} , bem como (2) picos de baixa intensidade em 880 e 1049 cm^{-1} referente ao íon CO_3^{2-} , associado a impurezas. Análises de espectroscopia Raman revelaram picos característicos para grupos PO_4 nas regiões de 430, 590, 962 e 1047 cm^{-1} . Por meio do Potencial Zeta, verificou-se a interação entre as HAs comercial e sintetizada e as proteínas ALA e BLG comerciais. Objetivando compreender melhor o comportamento adsorptivo da HA, utilizou-se ALA e BLG comerciais para a realização de experimentos cinéticos, nos valores de pH 3,4; 6,0; 7,0 e 8,0, e isotérmicos, em pH 3,4 e 6,0, nas temperaturas de (5, 15, 25, 35 e 45 °C). Os modelos matemáticos de pseudo-primeira ordem, pseudo-segunda ordem e de difusão de partículas foram ajustados aos dados cinéticos. O modelo de pseudo-segunda ordem foi o que levou ao melhor ajuste para todos os tratamentos. Os modelos isotérmicos de Langmuir e Freundlich ajustaram-se aos dados de equilíbrio obtidos em pH 6,0, no entanto, para o pH 3,4 os modelos não levaram a bons ajustes. A precipitação seletiva utilizando citrato de sódio (20 $g \cdot L^{-1}$) foi empregada para separar as proteínas ALA e BLG do soro de leite doce. O resultado foi um aumento da relação ALA/BLG de 0,34 no soro para 9,27 no precipitado ressuspenso. Em relação à BLG, ocorreu um aumento de 2,93 no soro para 22,60 da relação BLG/ALA na fase fluida. Em seguida, empregou-se a adsorção em HA para isolar as proteínas ALA e BLG. A recuperação de BLG na fase fluida foi semelhante para a HA comercial e a sintetizada. No entanto, para a dispersão em que o precipitado foi ressuspenso, a adsorção de ALA foi superior para a HA sintetizada comparado à HA comercial. Para a dessorção das proteínas, as melhores condições foram obtidas em tampão fosfato de sódio 0,4 $mol \cdot L^{-1}$ em pH 6,8 a 50 °C sob agitação (50 rpm/1 h), em que, obteve-se rendimento superior a 80 % (m/v) para todos os tratamentos. Ao

final do processo de separação, recuperou-se 26 e 53 % (m/v) da ALA presente, inicialmente, no soro de leite utilizando as HAs comercial e sintetizada, respectivamente. Em relação à BLG, a recuperação foi 65 e 70 % (m/v) utilizando as HAs comercial e sintetizada, respectivamente. As informações contidas neste trabalho poderão auxiliar no desenvolvimento de processos em que se pretende utilizar a HA como adsorvente para as proteínas ALA e BLG.

ABSTRACT

SILVA, Guilherme Mendes da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2017. **Integrated process for fractionation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin proteins from whey.** Adviser: Jane Sélia dos Reis Coimbra. Co-advisers: Eduardo Basílio de Oliveira and Maurício de Oliveira Leite.

Hydroxyapatite (HA) was synthesized in aqueous medium in the presence of ultrasound and tested to act as an adsorbent of whey proteins α -lactalbumin (ALA) and β -lactoglobulin (BLG). Initially, analyzes were performed to characterize the adsorbent. The calcium/phosphate ratio of synthesized HA was 1.57, below the stoichiometric HA value that is 1.67. From the X-ray diffraction analyzes, it was found that the material had high purity, low crystallinity (9%) and crystals with an average size of 27 nm. Infrared spectroscopy revealed: (1) peaks for the PO_4^{3-} ion in the regions of 561, 1028 and 603 cm^{-1} , for the OH ion 1630 and 3068 cm^{-1} and (2) presence of a low-intensity peak at 880 and 1049 cm^{-1} for the CO_3^{2-} ion. Raman spectroscopy analyzes revealed characteristic peaks for PO_4 groups in the 430, 590, 962 and 1047 cm^{-1} regions. The characterization analyzes showed that the proposed process for HA synthesis produces a material with high purity and low crystallinity. Through the Zeta Potential was verified the interaction between the commercial and synthesized HAs and the ALA and BLG proteins. To understand the adsorptive behavior of HA and the proteins ALA and BLG, experiments were performed at pH 3.4; 6.0; 7.0 and 8.0 for the kinetic experiments; and (5, 15, 25, 35 and 45 °C) at pH 3.4 and 6.0 for the isothermal curves. The kinetic models of pseudo-first order, pseudo-second order and particle diffusion were fitted to the data. The pseudo-second order model obtained the best fit for all treatments, indicating the occurrence of chemisorption. The Langmuir and Freundlich isothermal models adjusted to the equilibrium data obtained at pH 6.0, however, at pH 3.4 the models did not adjust. Selective precipitation was employed to separate the ALA and BLG proteins present in the sweet whey. The result was an increase in the ALA/BLG ratio of 0.34 in serum to 9.27 in the resuspended precipitate. For the BLG, there was an increase from 2.93 to 22.60 in the BLG/ALA ratio in the fluid phase. Then, BLG adsorption was applied to the fluid phase with similar results for commercial and synthesized HA. For the resuspended precipitate, the ALA adsorption was higher for the synthesized compared to the commercial HA. For proteins desorption, 0.4 mol.L⁻¹ of sodium phosphate buffer at pH 6.8 at 50 °C under agitation (50 rpm/1 h) was used, yield greater than 80% (m/v) was obtained for all treatments. At the end of the process, 26 and 53% (m/v) of ALA, present initially in the whey, was recovered using commercial and synthesized HAs, respectively. For BLG, the recovery was 65 and 70% (m/v) using the

commercial and synthesized HAs, respectively. The information contained in this work can help in the development of processes in which HA is to be used as an adsorbent for ALA and BLG proteins.

1. Introdução

O soro de leite é a porção aquosa do leite remanescente após a separação da caseína. Sua composição depende da maneira como é obtido, que pode ocorrer por via enzimática, ácida ou separação física, por meio da microfiltração. O desenvolvimento de técnicas de fracionamento e concentração de seus constituintes permite a obtenção de produtos de alto valor agregado que são utilizados em diversos setores das indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética. Lactose e proteínas estão entre os componentes mais valorizados.

As proteínas presentes no soro, 20 % (m/m) do total presente no leite, são compostas, principalmente, por enzimas, proteínas com função carreadora, imunoglobulinas e fatores de crescimento. Essas proteínas são largamente utilizadas como ingrediente em inúmeros produtos alimentícios devido às suas propriedades técnico-funcionais, atuando, por exemplo, como emulsificante, espessante e gelificante (SINGH, 2011). Outro ponto a salientar é a diversidade de trabalhos na literatura que relatam o potencial biofuncional dessas proteínas, com destaque para o elevado conteúdo de resíduos de aminoácidos essenciais, principalmente, o triptofano (HARAGUCHI; ABREU; DE PAULA, 2006).

Quantitativamente, a β -lactoglobulina (BLG) e a α -lactoalbumina (ALA) representam cerca de 70 % (m/m) do total das proteínas do soro, 4 e 1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. A BLG é uma proteína presente no leite de animais ruminantes, portanto, não está presente no leite humano, motivo pelo qual é, frequentemente, associada a alergias ao leite de vaca. A ALA bovina é uma metaloproteína semelhante àquela encontrada no leite humano, sendo essa uma das razões do interesse de sua utilização em formulações infantis.

Diferentes procedimentos podem ser aplicados para a separação de proteínas, dentre os quais, destacam-se a precipitação seletiva e a adsorção. A precipitação seletiva baseia-se na redução das forças de interação entre a proteína e o solvente. A formação de agregados entre as moléculas possibilita a separação por decantação, filtração ou centrifugação. Essa técnica exige profundo conhecimento de aspectos físicos e químicos relacionados à estrutura das proteínas, principalmente, de sua interface. No caso da adsorção, além da proteína e do meio em que esta se encontra, um novo componente deve estar presente, o adsorvente. Geralmente, esse é um sólido poroso com elevado valor de área específica ($\text{m}^2\cdot\text{m}^{-3}$), onde estão presentes sítios propícios à adsorção (TADINI et al., 2016). A adsorção é uma técnica de separação/purificação que tem como principal vantagem o emprego de condições brandas de processamento (pH, força iônica e temperatura), que possibilitam obter biomoléculas com mínimo impacto em sua estrutura.

Adsorventes aplicados a alimentos devem ser substâncias atóxicas, com alta estabilidade química e mecânica nas condições empregadas, além disso, é desejada alta porosidade, deve permitir sua regeneração e possuir elevada capacidade de adsorção (TADINI et al., 2016). A hidroxiapatita (HA) $[Ca_{10x}(PO_4)_6xOH_{2x}]$ é um fosfato de cálcio encontrado em grande quantidade na porção mineral de ossos e dentes. Devido à sua alta afinidade por proteínas, baixa toxicidade e elevada estabilidade bioquímica, vem despontando como um adsorvente promissor para aplicação em indústrias alimentícias e na liberação controlada de fármacos (CETINKAYA; AKKAYA, 2016).

A HA pode ser natural quando extraída de ossos de animais como peixes (PORALAN JR et al., 2015), bovinos (SHEIKH; YONG, 2008), suínos, aves, entre outros (AKRAM; AHMED, 2014), ou sintética quando é obtida em laboratórios. A síntese pode ocorrer por via seca, úmida ou hidrotermal (HENCH, 2013). Dependendo do método utilizado é possível observar diferenças na morfologia, cristalinidade e na relação cálcio/fosfato (LAFETÁ JUNIOR, 2014). Essas características podem afetar sua capacidade adsorptiva e, conseqüentemente, o dimensionamento e os parâmetros dos processos aos quais for empregada.

Dentro da perspectiva do desenvolvimento de um projeto envolvendo a adsorção para a separação de proteínas do soro de leite, a obtenção de informações relativas à estrutura do adsorvente, os principais parâmetros envolvidos na adsorção e a aplicação dos conceitos teóricos em uma situação real são essenciais para determinar a viabilidade, tanto técnica quanto econômica, do processo proposto.

2. Objetivo

2.1. Geral

Definir uma linha de processamento para obtenção de frações purificadas das proteínas α -lactoalbumina e β -lactoglobulina a partir do soro de leite bovino utilizando a precipitação seletiva, a adsorção em hidroxiapatita e a cromatografia de exclusão molecular.

2.2. Objetivos específicos

- i) Sintetizar HA em meio aquoso com recipiente imerso em banho ultrassônico;
- ii) Caracterizar a HA sintetizada quanto a pureza, morfologia, cristalização, tamanho de cristal, carga superficial e comparar com material comercialmente disponível;
- iii) Determinar as cinéticas e isotermas de adsorção de ALA e BLG comerciais (Davisco, EUA) em HA comercial e sintetizada;
- iv) Determinar a concentração de citrato de sódio necessária à precipitação de ALA do soro de leite de forma a interferir minimamente no processo de adsorção em HA;
- v) Isolar ALA da solução ressuspensa após a precipitação seletiva por meio da adsorção em HA;
- vi) Isolar BLG da solução fluida após a precipitação seletiva por meio da adsorção em HA;
- vii) Definir as condições ótimas para a dessorção de ALA e BLG do soro de leite da HA;
- viii) Purificar ALA e BLG provenientes do soro de leite por meio da cromatografia de exclusão molecular;
- ix) Realizar o balanço de massa do processo integrado de separação por meio da quantificação de ALA e BLG por cromatografia de alta eficiência em coluna de fase reversa;

3. Revisão bibliográfica

3.1. Mercado de lácteos

O crescimento da população mundial e as melhorias das condições socioeconômicas devem continuar a direcionar a demanda por produtos e ingredientes lácteos no futuro. Nos últimos anos, houve um aumento notável no consumo de proteína animal em países como o Brasil e a China (10 a 15 % em média) devido à ascensão de milhões de pessoas à chamada “classe média”. A urbanização também é um fator preponderante na demanda por derivados do leite. Outro fenômeno decorrente dos tempos modernos é a crescente demanda por fórmulas infantis (LAGRANGE; WHITSETT; BURRIS, 2015).

Entre os 15 países que mais produzem leite no mundo, verificou-se um aumento de 9 % na produção de leite entre 2012 e 2016, sendo que em 2016 a quantidade de leite produzida foi estimada em 596 milhões de toneladas (USDA, 2017). Os maiores produtores foram a União Europeia, Índia, Estados Unidos e China. Considerando uma média de 3,4 % (m/m) de conteúdo proteico, isso representa 20,3 milhões de toneladas de proteínas. Apesar de o Brasil ser o quinto, ou sexto considerando a União Europeia, maior produtor de leite com 32,57 milhões de toneladas em 2016 (USDA, 2017), o país é o sétimo maior importador de leite em pó integral do mundo (LAGRANGE; WHITSETT; BURRIS, 2015). Esta incoerência tem estimulado o governo brasileiro buscar alternativas para aumentar a quantidade e, principalmente, a qualidade do leite produzido no país.

Em relação ao soro de leite, diversos produtos são comercializados (**Figura 1**). Na medida em que o fracionamento de seus constituintes aumenta e essas frações atingem elevado grau de pureza, maior é o valor agregado de seus produtos. Por exemplo, produtos de grau analítico (pureza acima de 90 % m/m), como frações purificadas das proteínas ALA e BLG são encontradas no mercado por R\$ 5.880,00 e R\$ 1.033,00, o grama, respectivamente. As variantes A e B da BLG com pureza acima de 90 % (m/m) são encontradas nos valores de R\$ 19.908,00 e R\$ 10.588,00, o grama, respectivamente (SIGMA-ALDRICH, 2017).

Os processos necessários ao fracionamento das moléculas presentes no soro de leite, geralmente, envolvem uma combinação de operações unitárias com elevado grau de complexidade, que demandam mão de obra altamente especializada. No entanto, como mostrado acima, o alto valor agregado e crescente interesse pelos produtos, justificam o investimento em estrutura física e formação de capital intelectual.



Figura 1 - Produtos obtidos a partir do soro de leite. (Adaptado de (3A BUSINESS CONSULTING, 2009)).

3.2. Soro de leite

O estado de Minas Gerais é o maior produtor de leite do país com produção, em 2014, de 9,37 bilhões de litros de leite, o que representou 26,6 % do total de 35,17 bilhões de litros produzidos no Brasil (IBGE, 2016). Grande parte deste volume é processado em pequenas queijarias, gerando um volume considerável de soro de leite de difícil aproveitamento, dado a baixa quantidade produzida diariamente (ALVES et al., 2014).

O soro de leite é um coproduto da indústria de laticínios. Representa a porção aquosa do leite após a remoção de caseínas e gordura, apresentando-se como um líquido opaco e de cor amarelo-esverdeado (GIRALDO-ZUÑIGA et al., 2004; GUIMARÃES; TEIXEIRA; DOMINGUES, 2010). Pode ser obtido em laboratório ou em indústrias de processamento de leite por três operações principais:

i) Coagulação enzimática, resultando na coagulação das caseínas, matéria-prima para a produção de queijos e do soro doce (SGARBIERI, 2004);

ii) Precipitação ácida no pH isoeletrico das caseínas ($pI = 4,6$), resultando na caseína isoeletrica e no soro ácido (SGARBIERI, 2004);

iii) Separação física das micelas de caseína por microfiltração, em membranas de 0,1 - 0,2 μm , obtendo-se duas frações proteicas: no concentrado, as micelas de caseína e no

permeado as proteínas globulares, comumente chamadas de proteínas do soro (ALVES et al., 2014; MAUBOIS et al., 2001; ZINSLY et al., 2001).

Esse coproduto já foi considerado uma matéria-prima de tratamento oneroso para a indústria de lácteos devido às regulamentações ambientais que proíbem o descarte de produtos com alta demanda bioquímica de oxigênio (40.000 – 60.000 mg O₂/L, no caso do soro). Além disso, a literatura destaca o potencial técnico-funcional e nutricional de seus constituintes e com o desenvolvimento de técnicas de fracionamento, o soro é amplamente requisitado como ingrediente na indústria de alimentos (ALVES et al., 2014; FERRAT, 1980; GERNIGON; SCHUCK; JEANTET, 2010).

Os avanços tecnológicos proporcionaram um aumento do aproveitamento do soro de leite; porém, apenas 50 % de todo material gerado no mundo é transformado em produtos de maior valor agregado, como soro em pó (11 % de proteína), concentrados (25-89 % de proteína) e isolados proteicos (> 90 % de proteína), permeado de soro, lactose, ingredientes para ração animal, frações das proteínas purificadas (ALA, BLG, Lactoferrina, etc.), bio-etanol, biopolímeros, hidrogênio, metano e eletricidade (KANDA et al., 2013; YADAV et al., 2015).

Poucos países no mundo têm dados relacionados ao processamento e mercado de produtos à base de soro de leite. A **Tabela 1** mostra que nos Estados Unidos os maiores mercados são os de soro em pó e lactose.

No presente trabalho utilizou-se o soro de leite doce obtido por via enzimática devido à facilidade de acesso aos reagentes e equipamentos necessários ao procedimento de separação e, também, por empregar condições brandas durante o processo (pH, temperatura, cisalhamento, etc). O objetivo final foi recuperar o máximo de proteínas do soro com menor impacto à suas conformações.

Tabela 1 - Produtos à base de soro de leite nos Estados Unidos em 2013.

Ingrediente	Produção (ton.)
Soro em pó (11 % de proteína)	435.911
Soro em pó concentrado (25 – 49 % de proteína)	117.669
Soro em pó concentrado (50 – 89 % de proteína)	108.060
Soro em pó isolado (> 90 % de proteína)	39.501
Lactose proveniente de soro	471.365

Fonte: (LAGRANGE; WHITSETT; BURRIS, 2015)

3.2.1. Composição do soro de leite

O soro de leite contém mais da metade dos sólidos presentes no leite integral, cerca de 55 % (m/m), incluindo grande parte da lactose (> 90 % m/m), proteínas (20 % m/m da proteína total), lipídeos, glicomacropéptido (GMP), sais minerais e vitaminas solúveis (ALVES et al., 2014; BALDASSO; BARROS; TESSARO, 2011). Sua composição depende principalmente de dois fatores:

- i) Composição química do leite que varia de acordo com a alimentação, reprodução, raça, idade, estágio da lactação e clima (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006);
- ii) Processo de separação da caseína (enzimática, ácida ou microfiltração) (YADAV et al., 2015).

Além disso, o soro pode ser classificado como “doce” (pH entre 5,6 - 6,8) ou ácido (pH menor que 5,6) (YADAV et al., 2015). O soro doce é obtido por coagulação enzimática do leite a partir da adição da enzima presente no coalho conhecida por renina ou quimosina (EC 3.4.23.4), que tem a propriedade de desestabilizar e coagular as micelas de caseína (FOX et al., 2004). Esse soro é resultante da produção de queijos, como por exemplo, Minas Frescal, Minas Padrão, Cheddar e Emmental. O soro ácido é obtido por coagulação ácida do leite na fabricação de produtos como a caseína isoeletrica, requeijão e de queijos, como o Cottage e o Quark. A **Tabela 2** apresenta a composição média do leite bovino e dos soros doce e ácido.

Tabela 2 - Composição média do leite, soro doce e ácido.

	Leite (%)	Soro doce (%)	Soro ácido (%)
Sólidos totais	13,0	6,4	6,2
Proteína	3,6	0,8	0,75
Gordura	3,9	0,5	0,4
Lactose	4,6	4,6	4,2
RMF	0,8	0,5	0,8
Acido láctico	-	0,05	0,4

RMF – Resíduo mineral fixo. Fonte: (ANTUNES, 2003)

Segundo Antunes (2003) a redução no conteúdo de lactose no soro ácido é devido à fermentação, em que uma fração da lactose é convertida em ácido láctico. Em contrapartida, o soro ácido tem um teor maior de sais minerais, como cálcio e fósforo, que o soro doce. Isto é associado, principalmente, à solubilização parcial do fosfato de cálcio coloidal presente no interior das micelas de caseína em pH ácido. A composição proteica de ambos os soros é semelhante no que se refere à maioria das proteínas.

3.2.2. Proteínas do soro de leite

As proteínas globulares que apresentam estrutura terciária definida presentes no leite são chamadas de proteínas do soro de leite. Essas proteínas correspondem de 15 a 20 % (m/m) do total de proteínas do leite (SINDAYIKENGERA; XIA, 2006). Duas dessas proteínas, ALA e BLG, representam até 70 % (m/m) do total de proteínas do soro. O restante é constituído de enzimas, imunoglobulinas, fatores de crescimento e do glicomacropéptido (GMP), um peptídeo presente no soro de leite doce, derivado da hidrólise da k-caseína catalisada pela enzima renina. A **Tabela 3** apresenta a composição e algumas características físico-químicas das principais proteínas do soro. Com exceção do GMP, todo conteúdo proteico está naturalmente presente no leite integral.

A qualidade nutricional das proteínas é dependente dos aminoácidos que as constituem, e por este critério, as proteínas do soro são consideradas de alto valor biológico, pois são ricas em aminoácidos essenciais, sulfurados e de cadeia ramificada (BCAA) (DEVRIES; PHILLIPS, 2015). Os BCAAs como a leucina, isoleucina e valina desempenham um papel crucial no metabolismo, homeostase da glicose no sangue e em funções neurológicas (JOY et al., 2013).

Tabela 3 – Conteúdo proteico do soro de leite

Proteína	Conteúdo (% m/m)	Massa molecular (kDa)	pH isoeletrico (pI)
β-Lactoglobulina (BLG)	50	18,3	5,35-5,49
α-Lactoalbumina (ALA)	22	14,0	4,2-4,8
Imunoglobulinas (Igs)	8,0	150-1000	5,5-8,3
Soro Albumina (BSA)	5,0	66,0	5,13
Glicomacropéptido (GMP)	12,0	6,8	4,3-4,6
Peptona	0,19	4-22	-
Lactoperoxidase (Lp)	0,5	78,0	9,5
Lactoferrina (Lf)	1,0	76,5	9,5-10,0

Fonte: (AMIRI; VALSARAJ, 2004; YADAV et al., 2015)

Sgarbieri (2004) relata o potencial biofuncional dessas proteínas para atuar como: imunomoduladora (imunoglobulinas); antimicrobiano (lactoferrina, lactoperoxidase, BLG, ALA e imunoglobulinas); antiviral (BLG); anticancerígena (concentrado de proteínas do soro; lactoferrina; BLG); antiúlcera (concentrado de proteínas do soro; ALA) e proteção ao sistema cardiovascular. Patel (2015) em sua revisão conclui que as proteínas do soro têm potencial para desempenhar inúmeros benefícios à saúde como atuar como antioxidante, na prevenção de câncer, diabetes e obesidade, além de poder desempenhar função cardioprotetora. Ademais, o autor ressalta a redução do poder alergênico dos hidrolisados de proteínas do soro.

As funcionalidades técnicas das proteínas do soro são intensamente exploradas pela indústria, e se devem, principalmente, as suas propriedades físico-químicas, que em geral, governam o comportamento dessas macromoléculas quando utilizadas como ingrediente em alimentos (KINSELLA, 1989; SEGAT et al., 2014). Essas funcionalidades podem ser associadas em dois grupos: propriedades hidrodinâmicas, ou relacionadas com hidratação, que incluem absorção de água, solubilidade, viscosidade e gelificação; e propriedades superficiais, como capacidade emulsificante, gelificação, retenção de moléculas, na formação de espuma e de filmes (IBRAHIM; KOBAYASHI; KATO, 1993; KILARA; VAGHELA, 2004; LAM; NICKERSON, 2015; MATSUDOMI, 1995; SINGH, 2011).

Dependendo do processo de obtenção, os produtos à base de proteínas de soro de leite podem conter diferentes concentrações de lipídeos, lactose e minerais, assim como variados

níveis de desnaturação e agregação dessas proteínas. Frações proteicas com elevado grau de pureza e com mínima alteração da sua estrutura nativa permitem explorar mais intensivamente as propriedades, técnico-funcionais e biológicas específicas de cada proteína (BRAMAUD; AIMAR; DAVEE, 1997; NICOLAI, 2016; NICOLAI; BRITTEN; SCHMITT, 2011; SINGH, 2011).

Dentre as proteínas presentes no soro de leite, duas se destacam pelo seu valor nutricional e técnico-funcional, a α -lactoalbumina (ALA) e a β -lactoglobulina (BLG), que são, quantitativamente, as duas principais proteínas séricas (CHARTTERTON et al., 2006).

3.2.3. β -Lactoglobulina (BLG)

BLG é uma proteína ácida (pI 5,35-5,49), presente em maior quantidade no soro de leite, cerca de 50 % (m/m) do total de proteínas do soro. Esta proteína não está presente no leite humano, motivo pelo qual tem sido associada a reações alérgicas ao leite bovino, principalmente em crianças. Variantes genéticas da BLG envolvendo algumas posições de aminoácidos têm sido relatadas para muitas espécies. A função biológica desta é associada ao carregamento de compostos hidrofóbicos bioativos covalentemente ligados (LOVEDAY; SAWYER, 2016; WILDE et al., 2016).

A estrutura globular da proteína consiste de 162 resíduos de aminoácidos (18.300 Da), porém, ocorre predominantemente como dímeros (36.600 Da) no pH do leite (pH 6,65). O monômero só existe em pHs inferiores a 3,0 ou acima de 8,0, devido a prevalência de forças eletrostáticas repulsivas (NICOLAI; BRITTEN; SCHMITT, 2011). Sua estrutura nativa é composta por 40 - 50 % folha β , 10-15 % de α -hélice e 40 % em estruturas espiraladas não ordenadas. Possui cinco resíduos de cisteína, sendo que quatro desses formam ligações dissulfeto intramolecular (66-160; 106-119) e um grupo sulfidrila (-SH) livre (121) no interior na molécula, que quando exposto, devido à desnaturação, é altamente reativo (BUROVA et al., 1998; PAPIZ et al., 1986; WILDE et al., 2016). Sua estrutura terciária pode ser visualizada na **Figura 2**.

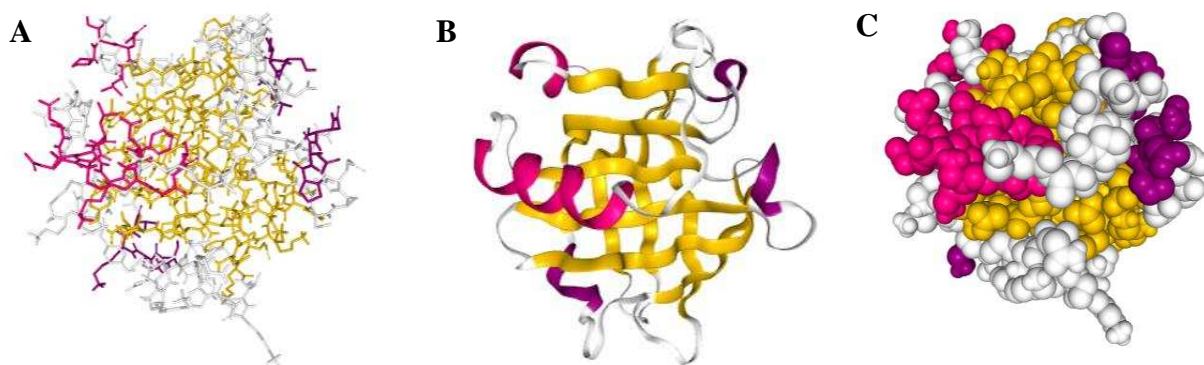


Figura 2 - Estrutura terciária da BLG em três perspectivas: A → Posição dos resíduos de aminoácido; B → Estruturas secundárias. C → Estrutura CPK. Em rosa estão representadas a estrutura secundária em α -hélice, em amarelo as β -folhas e em roxo os *Loops* (PROTEIN DATA BANK, 2017).

Estudos mostraram que a cinética de desnaturação da BLG resultou em um comportamento bifásico, ou seja, a proteína apresenta em seu interior regiões mais termosensíveis e outras mais termorresistentes, resultando em uma variação de energia livre de Gibbs (ΔG_D) total para desnaturação de $7,6 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. A ΔG_D corresponde à diferença de energia livre entre o estado nativo e o desnaturado. O processo de desnaturação da BLG é irreversível devido a sua interação com outros constituintes. Dois fatores podem ser responsáveis por essa interação: interações hidrofóbicas com glóbulos de gordura e a formação de pontes dissulfeto com outras proteínas, principalmente a fração κ -caseína presente na interface da micela de caseína (BUROVA et al., 1998; DUMITRAȘCU et al., 2013; FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2008; NICOLAI; BRITTEN; SCHMITT, 2011).

Devido a presença de um grupo tiol altamente reativo e de sua solubilidade em uma ampla faixa de pH, a BLG é frequentemente utilizada como ingrediente em produtos alimentícios, agindo diretamente em propriedades técnico-funcionais como emulsificante, gelificante e espessante. Além disso, os peptídeos bioativos derivados de hidrólise enzimática da proteína demonstraram potencial anti-hipertensivo, antioxidante, antimicrobiano e de reduzir o colesterol. Outro aspecto nutricional importante o elevado percentual de resíduos de BCAA, cerca de 25,1 % (ESTÉVEZ et al., 2016; HARAGUCHI; ABREU; DE PAULA, 2006; HERNÁNDEZ-LEDESMA; RECIO; AMIGO, 2008; LUCEY; MUNRO; SINGH, 1999; MURPHY; FARKAS; JONES, 2016; SINGH, 2011).

3.2.4. α -Lactoalbumina (ALA)

ALA é uma proteína ácida (pI 4,2 - 4,8) expressa exclusivamente na glândula mamária durante a lactação. Quantitativamente é a segunda proteína no soro, constituindo cerca de 20 % (m/m) do total de proteínas do soro. Sua função biológica é regular a síntese de lactose como parte do complexo enzimático da enzima lactose sintetase (EC 2.4.1.22) (**Eq 1**). Essa enzima é formada por uma segunda subunidade catalítica, a galactosiltransferase (GT) (EC 2.4.1.38) (KAMAU et al., 2010; PERMYAKOV; BERLINER, 2000). Na ausência da ALA, a GT catalisa a reação que transforma UDP-galactose em N-acetilglucosamina que são, posteriormente, ligados covalentemente a algumas proteínas (KILARA; VAGHELA, 2004).



Sobre sua estrutura, a ALA é uma proteína globular com 123 resíduos de aminoácidos (14.200 Da), sendo 60 % deles essenciais como a lisina, triptofano e cisteína (KAMAU et al., 2010; KINSELLA, 1989). ALA é uma metaloproteína que possui em seu interior um átomo de cálcio ligado do oxigênio do grupo carboxílico de três resíduos de ácido aspártico (Asp82, Asp87, Asp88), e da carbonila entre os resíduos lisina e ácido aspártico (Asp84 e Lis79). Esta configuração lhe confere maior estabilidade térmica, porém, é parcialmente desnaturada quando exposta a pH menor que 5 (resíduos de asparagina se tornam protonados e o íon Ca^{2+} é liberado) ou a um agente ligante de cálcio como o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (HIRAOKA et al., 1980; JAKOPOVIĆ; BARUKČIĆ; BOŽANIĆ, 2016; KAMAU et al., 2010; PARK et al., 2015; PERMYAKOV; BERLINER, 2000).

ALA nativa consiste de dois domínios: um domínio maior de α -hélice e um menor de folha β que estão interligados pela ligação como o átomo de cálcio (PERMYAKOV; BERLINER, 2000). O domínio α -hélice compreende os resíduos 1-34 e 86-123: é composto por três grandes α -hélices (H1, 5-11; H2, 23-34; H3, 86-98) e duas menores (h1b, 18-20; h3c, 115-118). O domínio folha β compreende os resíduos 35-85 (PIKE; BREW; ACHARYA, 1996). Sua estrutura terciária pode ser visualizada na **Figura 3**.

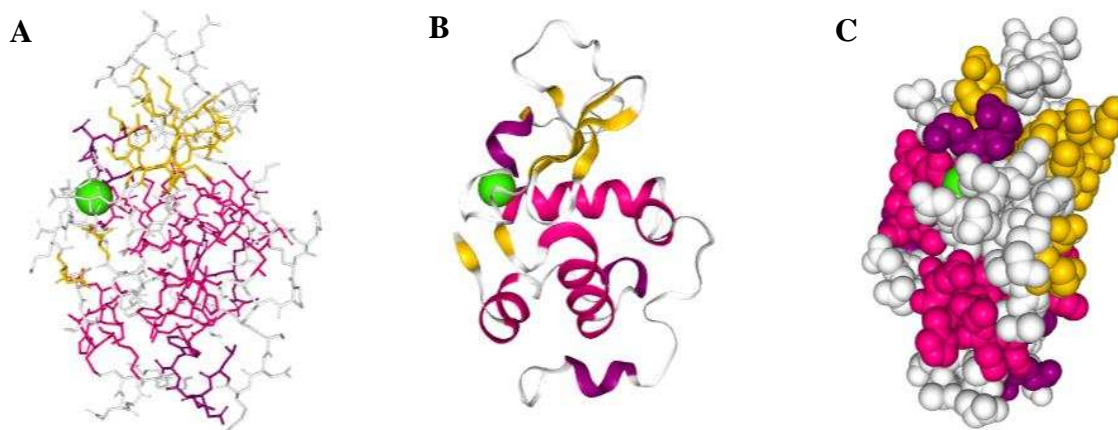


Figura 3 - Estrutura terciária da ALA em três perspectivas: A → Posição dos resíduos de aminoácido; B → Estruturas secundárias. C → Estrutura CPK. Em rosa estão representadas as estruturas secundárias em α -hélices, em amarelo as β -folhas e em roxo os *Loops* (PROTEIN DATA BANK, 2017).

ALA pode se ligar a diferentes íons metálicos em solução e exibir uma variedade de diferentes conformações dependendo do íon ao qual esteja ligada (PIKE; BREW; ACHARYA, 1996). Além disso, a adição de compostos complexantes de cálcio, como o citrato de sódio, altera sua conformação e pode promover sua desestabilização (TORO-SIERRA; TOLKACH; KULOZIK, 2013). A ΔG_D necessária para a perda da estrutura nativa da ALA é de 4,4 kcal·mol e segue um comportamento de primeira ordem. Ao contrário da BLG, a desnaturação térmica da ALA é reversível sob a maioria das condições de processamento do soro de leite. Isto se deve a ausência de grupo tiol livre para formação de pontes dissulfeto com outras moléculas (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2008; NICOLAI; BRITTEN; SCHMITT, 2011).

Devido a suas propriedades nutricionais e técnico-funcionais, a ALA oferece uma variada gama de aplicações para a indústria de alimentos, como por exemplo: capacidade de emulsificante (SINGH, 2011; ZHAI et al., 2012), espumante (TOSI et al., 2007) e gelificante (CAVALLIERI; DA CUNHA, 2008).

No leite humano a ALA é, quantitativamente, a principal proteína do soro. Além disso, a ALA bovina tem uma elevada similaridade com a ALA humana (cerca de 70 % da sequência primária), o que faz dela um componente chave para o preparo de formulações infantis para o período neonatal e para a terapia nutricional de crianças. No entanto, para a produção em larga escala da ALA é necessário investir em tecnologias de baixo custo para separar e isolar essa proteína dos outros constituintes do soro de leite (CETINKAYA; AKKAYA, 2016; KAMAU et al., 2010; SGARBIERI, 2004; ZUÑIGA, 2003).

3.3. Concentração, fracionamento, isolamento e purificação de proteínas

A separação de um ou mais componentes de uma mistura complexa é obtida com a utilização de uma sequência de operações unitárias, com a finalidade de obter produtos de alto valor agregado na indústria de alimentos, química e farmacêutica. As separações, geralmente, tem o objetivo de remover um ou mais componentes específicos e baseiam-se em explorar as diferenças físicas e/ou químicas dos componentes da mistura, como por exemplo, tamanho, forma, densidade, solubilidade e cargas elétricas na superfície de uma molécula ou partícula (GRANDISON; LEXIS, 1996).

Processos de concentração aumentam de maneira uniforme a presença de cada proteína no meio, ou seja, a quantidade relativa não muda quando o volume diminui. Geralmente a concentração consiste na remoção do solvente. Processos de fracionamento dividem a mistura em diferentes porções, cada uma contendo diferentes quantidades de proteína se comparados à solução inicial. O isolamento corresponde à separação de um único componente, porém, ainda restam outras moléculas em baixas concentrações. A purificação é a obtenção do material proteico isento de impurezas. Um esquema sobre as diferenças entre cada procedimento é apresentado na **Figura 4**.



Figura 4 - Esquema dos processos de separação utilizados na indústria de alimentos. Quadrado, círculo e estrela representam sólidos solúveis, dispersos ou suspensos.

Dentro do processo proposto neste trabalho, a solução diluída consistiu do soro de leite doce. A concentração do soro não foi realizada. O fracionamento foi atingido por meio da precipitação seletiva utilizando citrato de sódio. No isolamento, empregou-se a adsorção das proteínas ALA e BLG em HA. Por fim, a cromatografia de exclusão molecular foi utilizada para purificar as proteínas. O desenvolvimento destas técnicas para a obtenção de frações purificadas das proteínas do soro contribuiu para agregação de valor, assim como, melhora a expressão de suas propriedades técnico-funcionais quando utilizadas como ingrediente nos alimentos (CAPITANI et al., 2005).

3.3.1. Precipitação seletiva

A solubilidade de uma proteína é a manifestação termodinâmica do equilíbrio entre as interações proteína↔proteína e proteína↔solvente que dependem de uma complexa interação de quatro parâmetros (ARAKAWA; TIMASHEFF, 1985; FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2008).

- i)* Suas propriedades físicas (forma, flexibilidade, peso molecular e pH isoelétrico);
- ii)* Distribuição de grupos hidrofóbicos e hidrofílicos (carregados ou não) na superfície da proteína;
- iii)* Temperatura, pH e conteúdo salino da solução;
- iv)* Composição e concentração dos solutos presentes.

A precipitação seletiva envolve ajustes nas propriedades físicas e químicas da solução, ou adição de um agente precipitante, para promover a insolubilidade da proteína. Uma vez insolúvel, a proteína precipita permitindo sua separação. Geralmente, é utilizada nas primeiras etapas do fracionamento com a função principal de concentrar a proteína a ser separada. Pode ser específica ou não para separação de uma determinada proteína, ou seja, o procedimento pode ter como objetivo a proteína de interesse ou precipitar outras moléculas deixando proteína alvo solúvel, o que pode levar a necessidade de utilização de uma combinação de técnicas posteriores para a obtenção da fração purificada da proteína desejada (LOVRIEN; MATULIS, 1997; MATTIASSON, 2005).

Em valores de pH abaixo e acima do pI, as proteínas possuem uma carga líquida positiva ou negativa, respectivamente. A repulsão eletrostática e a hidratação dos resíduos carregados favorecem a solubilidade da proteína. A ocorrência de solubilidade mínima próxima ao pH isoelétrico, deve-se, principalmente, à redução da repulsão eletrostática, que permite a agregação e precipitação por meio de interações hidrofóbicas. No entanto, algumas proteínas são altamente solúveis em seu pI, por exemplo a BLG (pI 5,2) e albumina sérica bovina (pI 5,3). Isso se deve ao fato que essas proteínas contêm grandes proporções de resíduos hidrofílicos em relação aos grupos apolares superficiais que impedem o contato entre as moléculas, além disso, a presença de carboidratos covalentemente ligados à proteína permitem que essa permaneça solúvel mesmo no seu pI (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2008).

A **Tabela 4** apresenta trabalhos em que a precipitação seletiva foi utilizada para separar proteínas do soro de leite. Verifica-se que os principais métodos incluem alteração no pH, na concentração de sais e formação de agregados por meio da adição de polímeros. A carboximetilcelulose e o quitosano foram utilizados em associação à redução do pH para

formar complexos com as proteínas, isso permite a utilização de soluções tamponantes menos concentradas, porém, acrescenta ao sistema mais uma molécula, que posteriormente, deve ser removida. A adição de sais ao meio tem como finalidade favorecer o efeito “*salting out*”, em que, as moléculas de água deixam de interagir com a proteína e passam a solvatar os íons do tampão, o que leva a agregação das proteínas e, conseqüentemente, sua precipitação.

A adição de ácidos ao soro de leite para precipitação das proteínas pode ter duas finalidades: a primeira é reduzir o pH até o ponto isoelétrico das proteínas e promover sua desestabilização como mencionado acima. Outro ponto é a utilização de ácidos orgânicos para promover a solubilização e/ou ligação ao íon cálcio e promover a desestabilização da ALA, uma vez que, este íon essencial na manutenção da estrutura dessa proteína. Essa foi a estratégia utilizada neste trabalho, que além do ácido, no caso ácido cítrico, também foi utilizado o citrato de sódio para acelerar o processo de remoção do cálcio do interior da ALA segundo proposto por Toro-sierra; Tolkach; Kulozik, (2013).

Tabela 4 – Pesquisas envolvendo a precipitação seletiva para separação de proteínas do soro do leite.

Material	Agente precipitante	Condições	Fase solúvel	Precipitado	Referência
WPI	Carboximetilcelulose (CMC)	Adição de 2 % ($\text{m}\cdot\text{m}^{-1}$) de CMC em tampão pH 4,0 e em seguida redução do pH do sobrenadante para pH 3,2.	pH 4,0 → ALA pH 3,2 → lactose e minerais.	pH 4,0 → BLG pH 3,2 → ALA e imunoglobulinas.	(HIDALGO; HANSEN, 1971)
Soro doce	Ácido cítrico (HCit)	Adição de HCit $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ até pH 3,9 a $55 \text{ }^\circ\text{C}$ por 30 min.	BLG, GMP, lactose, sais minerais	ALA, BLG, BSA, imunoglobulinas, outras proteínas do soro.	(BRAMAUD; AIMAR; DAVEE, 1997)
Soro doce WPC WPI	Citrato de sódio Hexametáfosfato de sódio	Adição de $0,15 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ dos agentes precipitantes, utilizando ácido cítrico $6 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ para baixar o pH para 3,9 a 35 ° por 45 min.	BLG, GMP, lactose, sais minerais	ALA, BLG, BSA, imunoglobulinas, outras proteínas do soro.	(ALOMIRAH; ALLI, 2004)
Soro doce	Ácido tricloroacético (TCA) Ácido perclórico (PCA)	Adição de TCA/PCA 24 % até atingir concentrações entre 0 e 8 % de TCA a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ e deixado em repouso por 30 min.	GMP, sais, lactose	Proteínas do soro	(THOMÄ; KRAUSE; KULOZIK, 2006)

Soro doce	Quitosano ($M_n=120$ kDa, 85 % desacetilação)	Quitosano na concentração de 1,9 a $3,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em pH 6,2.	ALA, BSA, imunoglobulinas, lactose e sais.	Complexo quitosano- BLG	(CASAL et al., 2006)
Soro doce WPC WPI	Ácido cítrico Ácido láctico	Adição do ácido orgânico ($1,5$ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) até pH 4,0 a 50°C e agitação (500 rpm) por 90 min.	BLG, GMP, lactose, sais minerais	ALA, BSA, imunoglobulinas	(EUGENIA LUCENA et al., 2007)
Soro ácido	Sulfato de amônio Ácido fosfórico	Adição de sulfato de amônio 50 % ($\text{m}\cdot\text{v}^{-1}$) em pH 3,0 com ácido fosfórico concentrado. Em seguida, o precipitado foi tratado com sulfato de amônio 70 % ($\text{m}\cdot\text{v}^{-1}$).	70 % amônio → BLG	50 % amônio → BLG, ALA	(LOZANO; GIRALDO; ROMERO, 2008)
WPI	Dióxido de carbono (CO_2) supercrítico	Temperatura de 62°C Pressão de $5,5 \text{ MPa}$ $10 \text{ \% } (\text{m}\cdot\text{m}^{-1})$ proteína pH 4,0 a 4,5.	Enriquecido de BLG e GMP, menor concentração de ALA e outras proteínas do soro	ALA, BSA, imunoglobulinas, lactoferrina, GMP, BLG	(YVER et al., 2012)
WPI	Ácido clorídrico (HCl)	Adição de $\text{HCl } 4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ até pH 4,6 e deixar em repouso por 120 min a 60°C	BLG, GMP, lactose, sais minerais	ALA e outras proteínas do soro	(BONNAILLIE; TOMASULA, 2012)

WPI	Citrato de sódio ácido cítrico	Adição de ácido cítrico até pH 3,4. Adição de citrato de sódio até 60 g·L ⁻¹ e a solução aquecida até 50 ° C sob agitação (350 rpm) por 120 min. Repouso de 24 h a 4 °C.	BLG, GMP, lactose, sais minerais	ALA, BSA, imunoglobulinas, BLG, outras proteínas do soro.	(TORO-SIERRA; TOLKACH; KULOZIK, 2013)
WPI	Cloreto de sódio (NaCl)	Adição de NaCl 7 % (m·m ⁻¹).	BLG, GMP, lactose, sais minerais	Outras proteínas do soro	(HANUŠOVÁ et al., 2014)

Em que: WPI → Isolado proteico de soro; WPC → Concentrado proteico de soro; BSA → Soro-albumina bovina;

GMP → Glicomacropéptido;

3.3.2. Adsorção

A adsorção é uma operação unitária de transferência de massa do tipo fluido-sólido (TADINI et al., 2016). Ocorre devido a interações entre uma superfície sólida (adsorvente) e algum composto (adsorbato) presente em um gás ou uma solução aquosa. É caracterizada quando o aumento da concentração média de um composto na vizinhança de uma interface é maior que a concentração média do composto nas demais fases (ROUQUEROL et al., 2014). Fase é uma região do sistema em que o valor médio das propriedades intensivas não varia em toda sua extensão.

A adsorção difere-se da absorção pelo fato das moléculas difundirem-se do interior de um fluido para a superfície de um sólido formando uma fase adsorvida distinta. Na absorção, a molécula difunde-se de uma fase gasosa para uma fase líquida e, no equilíbrio, ocorre a distribuição do composto entre as fases (TADINI et al., 2016). No equilíbrio, o potencial químico das moléculas é o mesmo nas duas fases.

Em relação aos mecanismos envolvidos, a adsorção é influenciada por interações eletrostáticas, hidrofóbicas, de hidrogênio, van der Waals, entre outras. As interações de van der Waals estão sempre presentes enquanto as interações eletrostáticas somente são importantes quando o adsorvente tem uma estrutura iônica. Em se tratando de proteínas, os grupos reativos podem ser alterados modificando a conformação e a carga líquida da molécula, manipulando as condições do meio como pH, força iônica e temperatura (RUTHVEN, 1984; MAGESTE, 2012).

A variação da energia livre de Gibbs (ΔG) do sistema, ou seja, a diferença entre energia livre antes e depois do processo de adsorção, quando as proteínas (i) adsorvem-se (Γ) à interface, tem duas contribuições: a alteração da tensão interfacial (σ), devido a mudanças nas orientações das moléculas na interface, e a variação de potencial químico (μ) referente à transferência de moléculas do soluto da solução para a interface (**Eq 2**) (MAGESTE, 2012).

$$\Gamma_i = -\frac{d\sigma}{\mu_i} \quad \text{Eq. 2}$$

Proteínas (i) adsorvem-se na interface para reduzir a energia livre do sistema. Assim, a proteína adsorve-se para reduzir a tensão interfacial e para aumentar seu potencial químico na interface, uma vez que a quantidade de moléculas adsorvidas só pode ser uma grandeza positiva, por isso o sinal negativo na **Eq 2**. Além disso, a **Eq 2** profere que se o valor de Γ_i (n° de moléculas adsorvidas) é muito grande, implica que ao ir para a interface as proteínas reduzem muito a tensão interfacial à custa de um pequeno aumento no potencial químico. Ao

contrário, se Γ_1 é um valor muito pequeno, significa que, ao ir para a interface, as proteínas reduzem pouco a tensão interfacial, ao custo de aumentar muito o potencial químico da espécie na interface (MAGESTE, 2012).

Além da separação de proteínas, a adsorção tem sido utilizada em diversos processos e por diferentes setores da indústria. Nas indústrias químicas e de alimentos é utilizada na remoção de cor, odor e compostos sensorialmente desagradáveis; purificação de ar, água e recuperação de solventes orgânicos; separação/purificação de compostos de alto valor agregado como cafeína, vitaminas, diversos ácidos, compostos fenólicos, entre outros (TADINI et al., 2016).

O adsorvente é um sólido, geralmente, poroso, de baixo custo, elevada área superficial em relação ao volume, alta resistência mecânica e química, alta seletividade ao composto alvo, elevada capacidade de adsorção, deve possibilitar a regeneração e, no caso de alimentos e fármacos, deve ser atóxico (TADINI et al., 2016). Alguns adsorventes são usados em larga escala como dessecantes, agente catalítico ou suporte catalítico, liberação controlada de fármacos, tratamento de efluentes industriais, dessalinização de soluções, entre outras (ROUQUEROL et al., 2014).

A **Tabela 5** apresenta trabalhos em que foi avaliada a adsorção de proteínas em hidroxiapatita em diferentes condições de composição, pH e força iônica da fase fluida. Também na **Tabela 5** é possível verificar trabalhos em que os autores tentaram ajustar modelos cinéticos e isotérmicos aos dados obtidos para tentar descrever matematicamente o processo de adsorção. A adsorção das principais proteínas do leite e frações da caseína foram testadas em diferentes condições e verificou-se que a capacidade de adsorção (massa de proteína/massa de adsorvente) é maior para as α -caseínas, seguido da β -caseína, κ -caseína, BLG e, por último, a ALA como a proteína que menos se adsorve à HA em relação às proteínas do leite testadas.

Tabela 5 - Estudos envolvendo a adsorção de proteínas do soro de leite em hidroxiapatita.

Fonte proteica	Objetivo do trabalho	Proteína alvo	Condição	Comentário	Referência
Padrão de albumina humana	Cinética de adsorção	HSA	Albumina humana dispersa em tampão Tris-HCl, 150 mmol·L ⁻¹ NaCl, 1 mmol·L ⁻¹ de NaN ₃ , pH 7.35.	Modelo de Langmuir com bom ajuste aos dados de equilíbrio	(APTEL; VOEGEL; SCHMITT, 1988)
Padrão de BSA	Compreender interação BSA/HA	BSA	BSA dispersa em tampão fosfato 50 mmol·L ⁻¹ em pH 6,0	Tampão fosfato foi adequado para dessorção de BSA adsorvida à HA	(YANG; ZHANG, 2009)
Padrão BSA	Compreender interação BSA/HA	BSA	BSA dispersa em tampão Tris - metilhidroxiaminometano 10 mmol·L ⁻¹ , pH 9,5 e 5,25.	A morfologia do cristal de HA interfere na adsorção de BSA	(SWAIN; SARKAR, 2013)
Caseinato de sódio e WPI	Comportamento de adsorção	αs-caseínas, β-caseína, κ-caseína, BLG e ALA	O caseinato e o WPI foram suspensos em água deionizada	Capacidade de adsorção em HA para o caseinato foi: β-caseína > αs-caseína > κ-caseína. No WPI foi: BLG > ALA.	(TERCINIER et al., 2013)

Padrão de BSA e lisozima	Comportamento de adsorção	BSA e lisozima	BSA e lisozima dispersa em tampão fosfato de potássio 0,1 mol·L ⁻¹ pH 7,0	Modelo de Langmuir com bom ajuste aos dados de equilíbrio	(KANDORI et al., 2014)
Padrão de ALA	Isoterma de adsorção	ALA	ALA dispersa em tampão fosfato de sódio e tampão citrato de sódio 0,1 mol·L ⁻¹ pH (4,0 – 8,0)	Modelo de Langmuir com bom ajuste aos dados de equilíbrio	(SOUSA et al., 2014)
Padrão de lisozima	Cinética de adsorção	Lisozima	Lisozima dispersa em tampão fosfato de sódio 0,1 mol·L ⁻¹ pH (7,0 – 10,5)	Modelo de Pseudo-segunda-ordem com bom ajuste aos dados cinéticos	(LAFETÁ JUNIOR, 2014)
Leite	Fracionamento	ALA	ALA dispersa em tampão fosfato de potássio 100 mmol·L ⁻¹ pH 7,0	NaCl 1 mol·L ⁻¹ e EDTA 1 mol·L ⁻¹ interferem na adsorção	(CETINKAYA; AKKAYA, 2016)
Padrão de BSA e lisozima	Comportamento de adsorção	BSA e lisozima	BSA e lisozima dispersa em tampão fosfato de potássio 11 mmol·L ⁻¹	O tamanho dos poros afeta o comportamento da adsorção das proteínas em HA	(NAGASAKI et al., 2017)

Padrões de α - caseínas, β - caseína, κ - caseína, BLG e ALA	Comportamento de adsorção	α -caseínas, β - caseína, κ - caseína, BLG e ALA	Proteínas dispersas em tampão HEPES 7 e 100 mmol·L ⁻¹ em pH 7,0	Capacidade de adsorção em HA: α -caseínas > β -caseína > κ -caseína > BLG > ALA	(TERCINIER et al., 2017)
----------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------

Em que: HSA – albumina do leite humano; BSA – albumina do leite bovino; WPI – isolado proteico de soro de leite bovino; Tampão HEPES - ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanesulfônico.

3.3.3. Dessorção

A dessorção pode ser definida como a liberação de uma substância adsorvida da interface para o solvente. A dessorção depende da reversão/enfraquecimento dos mecanismos envolvidos na adsorção, em cromatografia significa favorecer a interação da substância com a fase móvel (CAMBRAIA; OLIVEIRA, 2002).

Essa etapa pode ser realizada retirando-se o sistema adsorbato-adsorvente do equilíbrio de adsorção. Para isso, algumas técnicas frequentemente utilizadas envolvem calor e alteração da composição da fase fluida. No caso de alimentos e substâncias termosensíveis, o emprego de temperatura elevadas pode não ser desejável, assim, uma combinação dos dois fatores citados pode ser empregada (TADINI et al., 2016). Esta é uma área com poucos trabalhos na literatura, tamanha a dificuldade dos pesquisadores em conciliar um procedimento que promova a dessorção da molécula sem que esta perca sua funcionalidade técnica ou nutricional.

3.3.4. Métodos cromatográficos

Os métodos cromatográficos são extensivamente utilizados para o fracionamento, isolamento, purificação e quantificação de proteínas. Contudo, estes processos ainda apresentam um custo elevado de operação e de aquisição dos equipamentos, além de gerar consideráveis quantidades de resíduos (PEDERSEN et al., 2003). Os métodos cromatográficos podem ser classificados com base em seus mecanismos de separação como cromatografia de: Adsorção, troca iônica, afinidade, exclusão molecular, partição e fase rever/interação hidrofóbica. Em alguns casos, o sistema opera sobre altas pressões.

Sistema de HPLC (*High Pressure Liquid Phase*) é um dos métodos analíticos mais utilizados para fins qualitativos e quantitativos. Dentro dos sistemas que utilizam alta pressão destaca-se a utilização de colunas cuja fase estacionária é hidrofóbica, neste caso, o processo é denominado de cromatografia de fase reversa (RP – *Reverse Phase*). As colunas utilizadas em HPLC-RP consistem de uma fase estacionária de menor polaridade. Esse sistema traz como principais vantagens: uso de fases móveis menos tóxicas e de menor custo, como acetonitrila e água; fases estacionárias estáveis a diferentes condições; rápido equilíbrio da coluna após a mudança da fase móvel; maior rapidez em análises e boa resolução dos picos e melhor reprodutibilidade dos tempos de retenção (TONHI; COLLINS; JARDIM, 2002).

Outra grande vantagem deste tipo de sistema é a possibilidade de alterar a composição da fase móvel durante a eluição. Nesse caso, a eluição pode ser classificada como sequencial, se a composição da fase móvel muda abruptamente, ou por gradiente, quando a fase móvel

aumenta seu poder de eluição gradualmente. Em muitos casos, esse procedimento é essencial para que a separação ocorra. No caso de proteínas, se a separação dependesse apenas da interação com a fase estacionária seria necessário o uso de colunas maiores e, conseqüentemente, tempo de eluição também maior. Assim, a eluição em gradiente modifica o equilíbrio de interação entre as moléculas e as fases estacionária e móvel, o que promove a separação das proteínas (JANDERA; CHUCÁCEK, 1985).

3.3.5. Cromatografia de exclusão molecular (CEM)

A CEM foi introduzida em 1953, com o nome de filtração géllica. Esta é uma técnica cromatográfica do tipo líquido-líquido. O suporte sólido é constituído por partículas esféricas com poros de tamanho cuidadosamente controlado pelo grau de cruzamento do polímero que compõem a partícula. Essa rede pode ser formada por dextrana, poliacrilamida ou agarose. A fase móvel é um tampão aquoso devidamente escolhido para promover a difusão das moléculas pelo suporte sólido. A fase estacionária, geralmente, é a própria fase móvel que preenche o interior dos poros (FEKETE et al., 2014).

Basicamente, a CEM é um processo de separação entropicamente dirigido no qual as moléculas são separadas com base na diferença de tamanho/peso molecular. A extensão das alterações entrópicas depende das dimensões tanto das macromoléculas quanto dos poros da matriz géllica. Moléculas maiores que o diâmetro dos poros não tem acesso ao interior das partículas do gel, por isso são ditas “totalmente excluídas”, eluindo-se primeiro, por apresentarem menor entropia configuracional. De modo inverso, moléculas menores penetram no interior das esferas do gel, aumentando sua entropia configuracional, o que aumenta o tempo de eluição. Assim, o fracionamento dos compostos é dependente do “caminho” percorrido no interior da coluna cromatográfica (BARTH, H.G., SAUNDERS, 2012; BOUVIER; KOZA, 2014).

Com base no acesso das moléculas ao interior dos poros, a separação na CEM pode ser dividida em (FISCHER, 1974):

i) Separação por grupos: geralmente utilizada em processos de dessalinização de soluções proteicas, em que um grupo de substâncias é totalmente excluído (proteínas) e o outro grupo penetra nos poros e têm tempo/volume de eluição maior (sais).

ii) Separação por fracionamento: utilizada quando as moléculas em separação possuem tamanho/peso molecular que permitam o acesso limitado ao interior das esferas que compõem o suporte sólido. Neste caso, se trata de uma separação em que todas as moléculas têm acesso ao interior dos poros, porém em níveis diferenciados. O grau de retardamento das moléculas

na coluna, ou seja, o fracionamento é inversamente correlacionado com seu tamanho e peso molecular.

A principal vantagem da CEM é que a eluição transcorre sob condições suaves de pH, força iônica e temperatura. Isso permite a separação com mínimo impacto na estrutura conformacional das proteínas (FEKETE et al., 2014). Outra característica desta técnica é que a eluição é isocrática, ou seja, a composição da fase móvel não se altera durante a corrida cromatográfica. Como o fracionamento ocorre somente pelo tamanho da molécula, componente entrópica, não faz sentido alterar as interações fase móvel↔proteínas↔fase estacionária (CAMBRAIA; OLIVEIRA, 2002).

3.4. Hidroxiapatita como adsorvente

A HA é uma biocerâmica de fosfato de cálcio de origem natural ou sintética com estequiometria $(Ca)_{10}_x(PO_4)_6_x(OH)_2_x$. Este mineral desperta interesse devido à sua biocompatibilidade e similaridade química com a porção mineral do osso humano. Além disso, sua elevada afinidade por proteínas permite uma ampla aplicação na indústria alimentícia. Dependendo da forma como é obtida, a HA difere em relação à sua composição, cristalinidade, tamanho do cristal, morfologia e estequiometria. A razão cálcio/fosfato (Ca/P) da HA estequiométrica é 1,67. Para a HA sintética essa relação depende enormemente das condições empregadas, com valores que variam de 1,24 a 1,79. Em relação às apatitas biológicas, estas possuem uma razão Ca/P que varia de 1,63 e 1,61 para o esmalte e a dentina respectivamente, e 1,71 para o osso humano (LEGEROS, 1993, 2002; LAFETÁ JUNIOR, 2014).

A HA possui uma superfície hidrofílica. Em particular, o uso de HA como um adsorvente se deve à sua elevada área interfacial, alta estabilidade térmica e química, baixa toxicidade e alta capacidade de troca iônica tanto para cátions quanto para ânions (CETINKAYA; AKKAYA, 2016). Além disso, variáveis como a porosidade, tamanho das partículas, distribuição de cargas na superfície e dos sítios polares e apolares têm impacto na capacidade de adsorção de HA. No caso de proteínas, a adsorção à superfície da HA é afetada por variáveis como: tamanho, conformação, estabilidade da conformação, concentração de proteínas, o pH e a força iônica do meio, carga superficial, perfil de resíduos de aminoácidos da interface e a hidrofobicidade (WANG et al., 2012).

As forças eletrostáticas promovem a atração entre os grupamentos N-terminal, acrescidos dos grupos laterais carregados positivamente, das proteínas e os sítios fosfatos da HA. Embora a atração inicial dos grupos carboxílicos seja também eletrostática, a ligação aos

sítios de cálcio envolve ainda a formação de fortes quelatos, ligações covalentes e troca de ânions (CUMMINGS; SNYDER; BRISACK, 2009). Além dessas interações, Shen et al., (2008) demonstraram que grupos sem carga, como $-OH$ e $-NH_2$, presentes nas proteínas, podem interagir com os sítios de cálcio e fosfato por interações de hidrogênio. Dong et al., (2007) por meio de simulação, também, verificaram que esses grupos não carregados têm grande influência no processo de adsorção das proteínas em HA.

As interações entre proteínas e HA são altamente influenciadas pelo pH, força iônica e temperatura (SOUSA et al., 2014). A maioria das proteínas é adsorvida utilizando tampões fosfato de baixa força iônica, em concentrações inferiores a $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Assim, a dessorção pode ser realizada por troca aniônica. O aumento da concentração de íons ou alteração do pH promove a eluição das proteínas, em gradiente ou sequencial (CUMMINGS; SNYDER; BRISACK, 2009; FREITAG; BREIER, 1995; MONTEIRO, 2008).

3.5. Métodos analíticos para identificação de compostos

3.5.1. Sistema de energia dispersiva (EDS)

A EDS é uma técnica de análise multielementar não destrutiva que permite a avaliação qualitativa e quantitativa de elementos inorgânicos de um material. Entre as vantagens dessa técnica destacam-se a possibilidade de poder analisar tanto materiais líquidos quanto sólidos e a quase ausência de preparação da amostra para realização do procedimento analítico. Ao irradiar um material com raios X, este emite radiações com comprimento de onda que é característico de cada constituinte. A intensidade guarda uma relação com a concentração do elemento, por isso, a técnica também fornece informações quantitativas (SCHIMIDT, 2015).

Para a análise de sólidos, a superfície deve ser homogênea e plana e, sempre que possível, realizar a leitura em diferentes pontos do material. Um inconveniente desta técnica é que a intensidade medida não é proporcional à concentração do elemento presente na amostra devido aos efeitos de matriz. Quando dois elementos presentes em um material são irradiados, pode ocorrer a emissão de radiação secundária de um elemento no outro, ou seja, um átomo A recebe a radiação do aparelho e emite radiação que é absorvida por um elemento B e causa alteração na intensidade do sinal obtida pelo detector. Outro grande problema em análise multielementar por EDS é a sobreposição de linhas espectrais, característica comum a elementos vizinhos na tabela periódica, em função das proximidades das energias de excitação dos elétrons (WASTOWSKI et al., 2010). No caso da HA, a técnica pode fornecer informações sobre a composição e a presença de outras fases por meio da relação Ca/P.

3.5.2. Difração de raios X (DRX)

O estudo da estrutura cristalina e da microestrutura de um material é fundamental para a caracterização e entendimento de suas propriedades. Alguns sólidos podem ser completamente ou parcialmente cristalizados, sendo o cristal definido como uma estrutura com arranjo ordenado e periódico de átomos. Os raios X são radiações eletromagnéticas que correspondem a uma faixa do espectro entre 1 a 10 Å, porém, essa medida é um parâmetro arbitrário que pode variar entre as referências consultadas (RODRIGUES, 2009).

Os átomos funcionam como obstáculos, ou centros de espalhamento, e quando um feixe de raios X monocromático incide sobre um material, diversos fenômenos podem ocorrer, um deles é a difração. A Eq. 3 conhecida como lei de Bragg estabelece a condição para que um feixe de raios X, com comprimento de onda (λ) conhecido, incidindo sobre um conjunto de planos paralelos (ABC), cuja distância interplanar é (d_{hkl}), fazendo um ângulo θ em relação a esse plano, seja difratado no mesmo ângulo θ (RODRIGUES, 2009).

$$2d \cdot \sin\theta = \lambda \quad \text{Eq. 3}$$

A Figura 5 apresenta um esquema em que estão representados os planos paralelos ABC, a distância interplanar (d_{hkl}), os raios e os ângulos θ incidente e difratado.

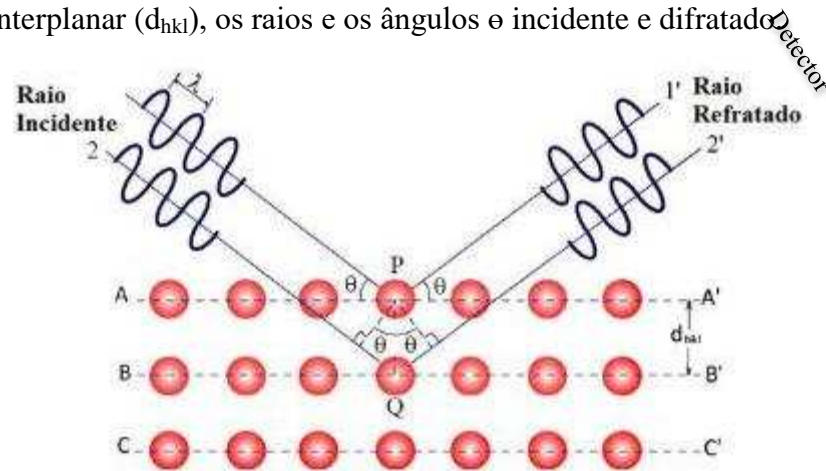


Figura 5 - Vista lateral do conjunto de planos paralelos ABC. Fonte: <http://google.com/ec2-107-21-65-169>

O resultado é uma curva que relaciona o ângulo 2θ com a intensidade de radiação difratada que chega até o detector denominado difratograma. A leitura e interpretação do difratograma consiste em obter o ângulo 2θ de cada pico observado. Como o comprimento de onda é conhecido, procede-se o cálculo da distância interplanar por meio da Eq. 3. Em seguida, calcula-se a intensidade relativa para cada pico. A partir da distância interplanar

referente aos 3 (três) picos de maior intensidade é possível identificar o material por meio de comparação com fichas de difração de fases conhecidas (RODRIGUES, 2009).

Além da identificação de constituintes a difração de raios X pode ser empregada na estimativa do percentual de fase cristalina, tamanho médio de cristais, construção de diagrama de fases, avaliação de alterações na estrutura de um sólido, entre outras informações (PORALAN JR et al., 2015; SGS, 2017).

3.5.3. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

A espectroscopia no infravermelho corresponde à região do espectro eletromagnético situada na faixa de número de ondas de 14290 a 200 cm^{-1} . No entanto, a região que apresenta o número de ondas de 4000 a 400 cm^{-1} é a mais comumente utilizada para compostos orgânicos e inorgânicos. Sua aplicação envolve o estudo de polímeros, identificação de compostos orgânicos e inorgânicos, análises de misturas complexas, controle de qualidade de produtos diversos, entre outras (BARBOSA, 2007).

A utilização da transformada de Fourier consiste em decompor o sinal capturado em suas componentes elementares seno e cosseno. O espectrômetro com transformada de Fourier emprega um interferômetro do tipo Michelson. Essa diferença para equipamentos antigos que utilizavam prismas e grades para filtrar a radiação, permite uma redução no tempo de análise, melhor resolução dos picos e maior precisão dos resultados (WASTOWSKI et al., 2010).

Diferentemente das radiações nas regiões do ultravioleta e do visível, que causam transições eletrônicas, a radiação infravermelha causa alteração nos modos rotacionais e vibracionais da molécula. Para que determinada vibração resulte em absorção, é necessário que esta cause alteração no momento dipolo da molécula (BARBOSA, 2007). Ou seja, ocorra um desequilíbrio nas forças de atração e repulsão entre os átomos que constituem a molécula.

Ao fim da análise são obtidas curvas denominadas espectro de absorção, nas quais, o número de ondas, que corresponde ao inverso do comprimento de onda, é plotado em relação ao percentual de transmitância ou absorbância. A interpretação do resultado para um composto conhecido consiste na identificação dos grupos funcionais referentes às bandas de absorção observadas no espectro obtido e comparação com outra curva obtida para o mesmo composto. A análise completa compreende tanto a comparação entre os picos característicos presentes como os ausentes (BARBOSA, 2007).

3.5.4. Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman é uma técnica analítica muito utilizada para o estudo de sistemas moleculares. A nível molecular, a radiação pode interagir com a matéria por processos de absorção, como acontece com a análise de FT-IR, ou de espalhamento, e este último pode ser elástico ou inelástico, sendo este último chamado de espalhamento Raman. Em resumo, quando uma molécula que se encontra em um estado vibracional inicial E_0 absorve um fóton de energia, ela passa para um nível de energia mais elevado E_1 , ou também chamado de estado excitado, ao emitir esse fóton adsorvido, a molécula pode reduzir seu nível de energia para um estado igual (E_0), maior (E_2) ou menor (E_3) de energia comparado ao inicial. A diferença de energia entre os estados E_0 e E_2/E_3 é chamada de deslocamento ou decaimento Raman (**Figura 6**). Portanto, a radiação que chega ao detector possui uma pequena parcela composta de frequências diferentes daquela incidente. As componentes deslocadas para cima ou para baixo são chamadas de Stoke e anti-Stokes, respectivamente (RODRIGUES; GALZERANI, 2012; WASTOWSKI et al., 2010).

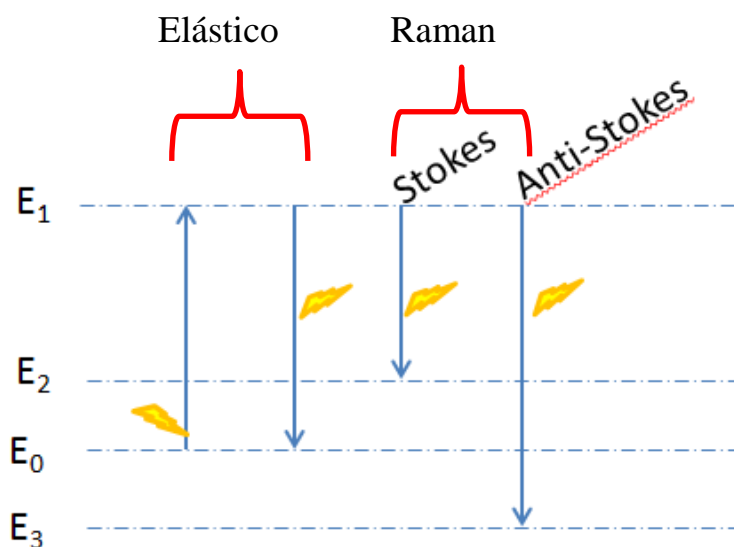


Figura 6 - Esquema do espalhamento Raman

As curvas obtidas são chamadas de espectros de Raman. No eixo das abscissas são colocados os valores do número de ondas (cm^{-1}) e no eixo das ordenadas, a intensidade Raman, em unidades arbitrárias. A interpretação das curvas para um composto conhecido é realizada por meio da identificação dos grupos funcionais característicos e comparação com dados obtidos anteriormente para o material.

3.6. Estudo da adsorção

3.6.1. Potencial Zeta (ζ)

A presença de duas fases em contato promove uma diferença de potencial entre elas. No caso de uma das fases ser um líquido polar, como a água, e se nela estão presentes íons, existe uma tendência à formação de um gradiente de cargas ao longo da interface. Esse gradiente iônico, que está sob influência do campo eletromagnético gerado pelas moléculas presentes na interface, formam uma camada difusa de íons chamada dupla camada elétrica. A presença, ou principalmente, a intensidade desse potencial elétrico formado pode estar relacionado à estabilidade, ou falta dela, em diferentes sistemas dispersos. Fenômenos como a eletrocatalise, corrosão, crescimento de cristais, interação entre moléculas, estabilidade coloidal e adsorção não podem ser completamente compreendidos sem o conhecimento da distribuição de cargas na região interfacial (HUNTER, 1981).

A medida do potencial Zeta é realizada indiretamente por meio da mobilidade eletroforética. A técnica consiste em inserir uma suspensão coloidal em uma cubeta, equipada com dois eletrodos, e aplicação de um potencial elétrico à suspensão. A mudança de frequência é diretamente proporcional à mobilidade eletroforéticas das partículas (MALENA; LIMA; EM, 2003). A estimativa do potencial Zeta é realizada por meio da **Eq.4**.

$$\zeta = \frac{3U_E \eta}{2\epsilon f(k.a)} \quad \text{Eq. 4}$$

Em que, os valores para a viscosidade (η) e a constante dielétrica do meio (ϵ) são fornecidos ao programa, ζ é o potencial Zeta, U_E a mobilidade eletroforéticas e $f(k.a)$, a função de Henry.

A adsorção das proteínas por HA pode ser avaliada por meio de alteração do potencial Zeta (NAGASAKI et al., 2017; TERCINIER et al., 2017).

3.6.2. Cinética de adsorção

Os experimentos cinéticos fornecem informações sobre a velocidade com a qual as moléculas do adsorbato são adsorvidas pelo adsorvente. Além disso, é possível prever qual tipo de interação ocorre entre adsorvente e adsorbato, a capacidade de adsorção e alguns fatores limitantes ao processo de adsorção como temperatura, pH e força iônica. Esses dados são essenciais no dimensionamento e determinação das condições de qualquer processo adsortivo (HO; MCKAY, 1999).

Diversos modelos podem ser utilizados para tentar descrever as condições cinéticas de processos envolvendo adsorção. Essa diversidade ocorre devido às pressuposições teóricas aplicadas a cada modelo. Dentre os modelos que se destacam pela quantidade de trabalhos publicados e qualidade dos ajustes estão os modelos de pseudo-primeira ordem, pseudo-segunda ordem e de difusão intraparticular (HO; MCKAY, 1999).

O modelo de pseudo-primeira ordem aborda o processo de fisissorção. A **Eq. 5** foi deduzida por Lagergren em 1898 sendo uma das primeiras a tratar da cinética de adsorção de líquidos em sólidos baseado na capacidade do sólido. Mesmo antiga esta é uma das equações de velocidade mais aplicadas para adsorção em meios aquosos, e pode ser representada por (HO; MCKAY, 1999):

$$\frac{dq(t)}{dt} = k_1[q_c - q(t)] \quad \text{Eq. 5}$$

Em que, q_c e $q(t)$ são as capacidades de máxima adsorção em mg.g^{-1} e a capacidade de adsorção em um tempo t mg.g^{-1} , respectivamente, e k_1 é a constante cinética de adsorção de pseudo-primeira-ordem em $\text{mg.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

Integrando para os limites de $t = 0$ a $t = t$ e $q(t) = 0$ a $q(t) = q(t)$ e fazendo as manipulações matemáticas necessárias, a **Eq. 6** pode ser rearranjada para uma forma linear:

$$\text{Ln}[(q_c - q(t))] = \text{Ln}(q_c) - k_1 t \quad \text{Eq. 6}$$

O modelo de pseudo-segunda ordem trata da quimissorção. Neste modelo (**Eq.7**), assume-se que ocorre o compartilhamento de elétrons devido a forças covalentes existentes entre o adsorbato e o adsorvente (HO, 2006). Este modelo é representado por (HO; MCKAY, 1999):

$$\frac{dq(t)}{dt} = k_2[(q_c - q(t))]^2 \quad \text{Eq. 7}$$

Em que, k_2 é a constante cinética de pseudo-segunda-ordem de adsorção em $\text{mg.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$. Integrando de $t = 0$ a $t = t$ e $q(t) = 0$ a $q(t) = q(t)$ e fazendo as manipulações matemáticas necessárias, a **Eq. 8** pode ser rearranjada para uma forma linear:

$$\frac{1}{[(q_c - q(t))]} = \frac{1}{(k_2 \cdot q_c^2)} + \frac{1}{q_c} \cdot t \quad \text{Eq. 8}$$

Plotando um gráfico $\frac{t}{q_t}$ em função de t é possível obter o valor de q_C e k_2 .

Quando o adsorvente é um material poroso e/ou irregular, além dos fenômenos de interação na superfície deve-se considerar a difusão de material pelo interior do adsorbato. O modelo (**Eq. 9**) que trata difusão intraparticular como etapa determinante da taxa de adsorção é a lei de Fick, representado por (LAFETÁ JUNIOR, 2014):

$$q(t) = K_{dif} \cdot t^{\frac{1}{2}} + C \quad \text{Eq. 9}$$

Em que, K_{dif} é coeficiente de difusão intrapartícula ($\text{mg.g}^{-1}.\text{min}^{-1/2}$) e C é a constante relacionada com a resistência à difusão (mg.g^{-1}).

A utilização das equações linearizadas apresentadas acima permite avaliar qual modelo se ajusta melhor aos dados experimentais. Assim, obtém-se os parâmetros cinéticos e as constantes para cada modelo (HO; MCKAY, 1999).

3.6.3. Isotermas de adsorção

O estudo da distribuição do adsorbato entre a fase fluida e o adsorvente, em condições de equilíbrio, é fundamental para o entendimento e dimensionamento de um processo. O equilíbrio entre as fases é governado pelos princípios termodinâmicos. Vale salientar, que equilíbrio, neste caso, trata-se de um conceito dinâmico adotado quando a taxa de moléculas que se adsorvem ao adsorvente é igual à taxa de dessorção. A condição de equilíbrio é representada na forma de isotermas de adsorção que são curvas que relacionam a concentração do adsorbato nas fases fluida e sólida. Em muitos casos, a determinação de isotermas é o primeiro passo no estudo de um novo sistema adsorbato/adsorvente (SOUSA et al., 2014; TADINI et al., 2016).

Um dos primeiros passos na interpretação de dados isotérmicos é a observação do perfil da curva obtida. Tadini et al. (2016) cita sete diferentes tipos de curvas de isotermas de adsorção aceitas pela IUPAC. A isoterma do Tipo I corresponde à adsorção em monocamada, essa isoterma apresenta uma elevada inclinação da curva em concentrações menores de adsorbato. A do Tipo II apresenta menor inclinação inicial e possui duas inflexões, o que indica adsorção em multicamadas. Os outros tipos de isotermas não foram observados nos dados obtidos, por isso, não serão descritos. Em geral, dados experimentais são descritos por modelos isotérmicos simples, como Langmuir e Freundlich.

A isoterma de Langmuir é um dos modelos mais utilizados devido à base teórica bem definida ao qual foi desenvolvido. Para a utilização do modelo, algumas considerações devem ser primeiramente esclarecidas (TADINI et al., 2016):

A adsorção ocorre em um número fixo de sítios disponíveis;

A adsorção ocorre unicamente por monocamada;

O processo é reversível;

A condição de equilíbrio deve ser alcançada;

A adsorção de uma molécula não deve interferir na vizinhança.

O modelo é representado por (TADINI et al., 2016) **(Eq.10)**:

$$q_E = \frac{q_m \cdot k_d \cdot C_E}{1 + k_d \cdot C_E} \quad \text{Eq. 10}$$

Em que, q_E é a concentração de equilíbrio do adsorbato na fase sólida em mg.g^{-1} ; C_E é a concentração de adsorbato em equilíbrio na fase líquida em mg.cm^{-3} ; q_m representa a capacidade adsortiva máxima do adsorvente para o adsorbato em mg.g^{-1} ; k_d é a constante do modelo de Langmuir. Observando a equação é possível verificar que um bom adsorvente é aquele que apresenta elevado valor de q_m e pequeno para a constante k_d .

A isoterma de Freundlich é uma formulação empírica utilizada para adsorção de compostos em soluções líquidas. A equação foi proposta a partir de estudos sobre a adsorção de compostos orgânicos presentes em soluções aquosas na superfície de carvão vegetal. O modelo obtido é representado por (TADINI et al., 2016) **(Eq. 11)**:

$$q_E = k(C_E)^{\frac{1}{n}} \quad \text{Eq. 11}$$

Em que, q_E e C_E tem o mesmo significado apresentado na equação de Langmuir; k e n são as constantes do modelo e representam a capacidade de adsorção do adsorvente e o efeito da concentração de adsorbato na capacidade de adsorção, respectivamente. Ao avaliar a equação é possível verificar que um bom adsorvente apresenta um valor de k elevado e um valor de n baixo.

4. Material e métodos

A síntese da HA, os experimentos de cinética, a determinação das isoterma de adsorção e a separação das proteínas foram realizados no Laboratório de Operações e Processos (LOP). As análises de potencial Zeta, energia dispersiva de raios X e microscopia eletrônica de varredura foram realizadas no Laboratório de Embalagem, ambos, do Departamento de Tecnologia de Alimentos. As análises de difração de raios X e espectroscopia Raman foram realizadas no Departamento de Física. A análise de infravermelho foi realizada no Laboratório de Infravermelho do Departamento de Química. A quantificação das proteínas por cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada no Laboratório de Biocombustíveis do Departamento de Engenharia Agrícola, todos da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

4.1. Procedimento experimental

Inicialmente a HA foi sintetizada utilizando como reator um béquer imerso em banho ultrassônico e, após a síntese, envelhecida em meio aquoso por 30 dias segundo Lafeté Júnior (2014). A hidroxiapatita foi caracterizada em termos de difração de raios X, FT-IR, espectroscopia Raman, espectroscopia de raios X de energia dispersiva e microscopia eletrônica de varredura. Em seguida, testes para entender o processo adsorptivo foram realizados para determinação dos parâmetros cinéticos (3 repetições) e de equilíbrio (2 repetições) envolvidos na etapa de adsorção das proteínas ALA e BLG em HA comercial e sintetizada. Nesses testes foram utilizadas proteínas ALA e BLG comerciais (pureza de 96 e 93 % $m \cdot m^{-1}$; Davisco Foods, EUA). Modelos isotérmicos e cinéticos foram ajustados aos dados por meio do programa SigmaPlot 11.0.

O soro de leite doce foi obtido a partir da fabricação de queijo Minas Frescal segundo Furtado (1994). Após a formação do coágulo, o soro foi filtrado em algodão para remoção de aglomerados de caseínas. Em seguida, o filtrado passou por centrifugação (1.900 g/5 min) a 25 °C para remoção de gordura residual. O soro centrifugado foi o material de partida para as etapas de separação das proteínas apresentadas a seguir.

1^a) Precipitação seletiva: O objetivo desta etapa foi separar as proteínas ALA e BLG. O procedimento foi executado de acordo com Toro-Sierra, Tolkach e Kulozik (2013). Ao soro de leite foi adicionado citrato de sódio na concentração de 20 g·L. Logo após, sob agitação constante (50 rpm), o pH do material foi ajustado para 3,4 com ácido cítrico 2 mol·L⁻¹. Em seguida, a mistura foi aquecida a 50 °C e mantida sob agitação (100 rpm) por 120 min. Decorrido o tempo, a suspensão foi deixada em repouso a 4 °C por 24 h. Este procedimento

teve a finalidade de desestabilizar e formar agregados de ALA. Após as 24 h, o material foi centrifugado (5.800 g/15 min) a 25 °C obtendo-se duas frações: o precipitado, do qual foi possível recuperar a ALA, juntamente com outras proteínas do soro (KAMAU et al., 2010) que posteriormente foram ressuspensas em tampão CaCl_2 1 mol·L⁻¹ com o pH ajustado para 6,0 com NaOH 1 mol·L⁻¹; e a fase fluida, do qual foi possível recuperar a BLG juntamente com lactose e sais minerais, constituintes em solução no soro de leite.

2ª) Adsorção de ALA e BLG em HA. Esta etapa teve o objetivo de isolar as proteínas ALA e BLG presentes no precipitado e na fase fluida, respectivamente. O procedimento consistiu em colocar em contato, sob agitação (50 rpm), 10 mL de cada dispersão (precipitado e fase fluida) com HA comercial e sintetizada por 1 h. A massa de HA e a temperatura foram definidas por meio das isotermas e o tempo de contato entre as dispersões e o adsorvente pelo estudo cinético de adsorção. Decorrida 1 h, as suspensões foram centrifugadas (5.800 g/ 15 min) a 25 °C.

3ª) Dessorção de ALA e BLG da HA. Os ‘pellets’ obtidos na etapa anterior foram colocados em contato com 10 mL de tampão de fosfato de sódio 0,4 mol·L⁻¹ pH 6,8 a 50 °C e permaneceram sob agitação (50 rpm) por 1 h. Em seguida, foram centrifugados (5.800 g/15 min) a 25 °C e as proteínas foram recuperadas no sobrenadante.

4ª) CEM de ALA e BLG. O procedimento foi executado para purificar as proteínas segundo condições definidas por Rojas (2001). Uma alíquota de 0,5 mL contendo as proteínas isoladas foi aplicada em coluna P10-Sephadex G-25 para realização de cromatografia de exclusão molecular (CEM). O volume de eluído contendo as proteínas foi definido por meio da colorimetria utilizando reagente de Bradford. Em média, foram coletados 3 mL de solução ao final da CEM.

Ao final de cada etapa, as concentrações de ALA e BLG foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa (HPLC-RP). As etapas de separação das proteínas do soro de leite foram realizadas em 3 (três) repetições e os valores médios das concentrações das proteínas ALA e BLG, obtidas diretamente do soro de leite, foram comparados por meio de teste t a 5 % de significância.

Os reagentes e equipamentos utilizados durante a execução dos experimentos estão listados nas **Tabelas 11 e 12** do Anexo I.

O esquema geral de todo o processo pode ser visualizado na **Figura 7**.

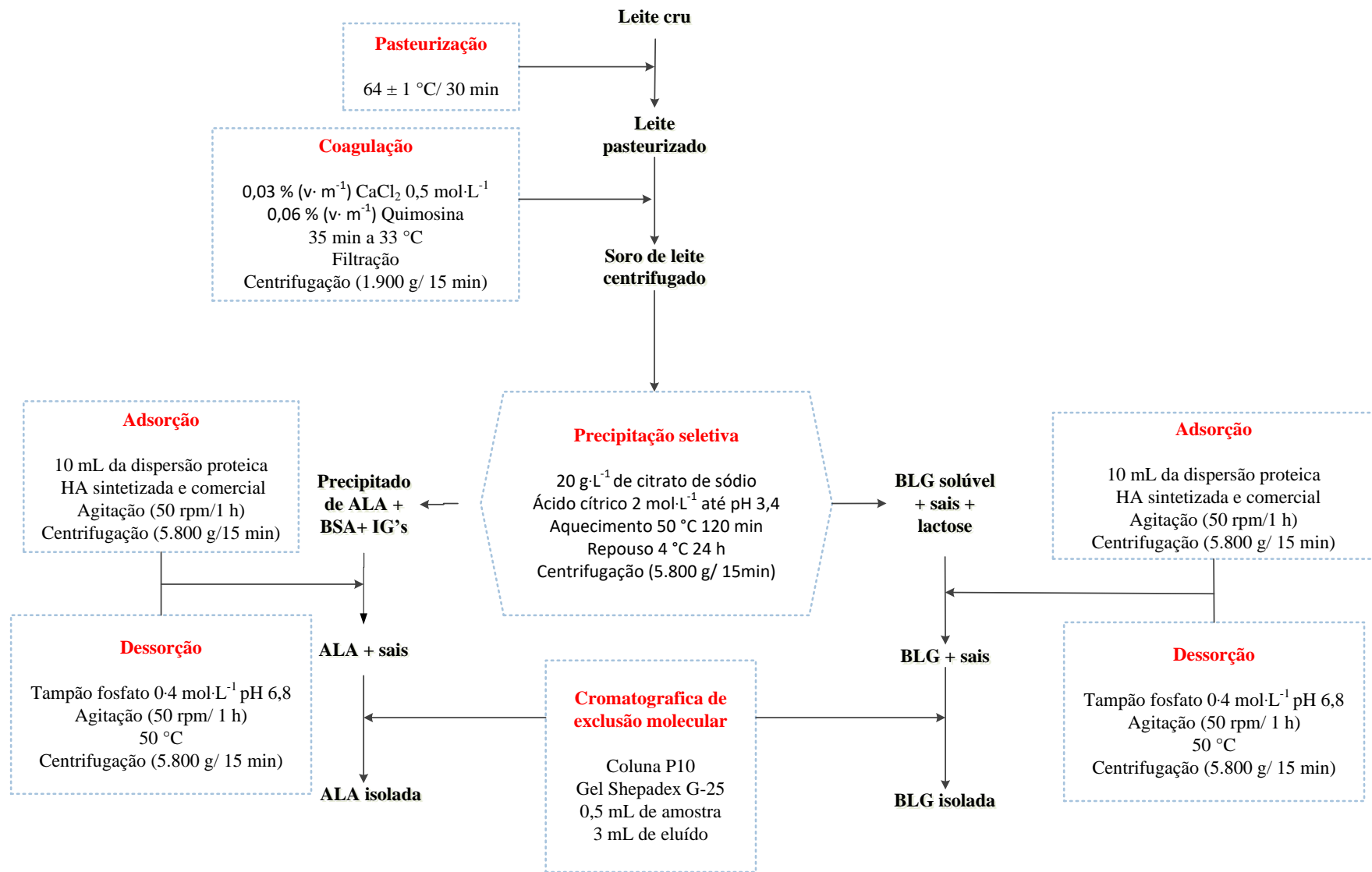


Figura 7 - Esquema geral do processo de separação das proteínas ALA e BLG

4.2. Síntese da hidroxiapatita

A HA foi sintetizada em meio aquoso sob agitação (210 rpm/min), em recipiente imerso em banho ultrassônico (SC 1400 Unique, Brasil), conforme o procedimento sugerido por Lafetá Júnior (2014) que o apresentou como o melhor resultado para a adsorção da proteína sérica lisozima. No presente trabalho, a HA sintetizada foi testada para a adsorção das proteínas ALA e BLG.

A **Figura 8** traz o esquema do procedimento empregado para a síntese de HA. Foram misturados 500 mL de solução $0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de CaCl_2 e 500 mL de solução $0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de Na_2HPO_4 , em um fluxo de $250 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$, em béquer de 1000 mL, contendo inicialmente 50 mL de $\text{NaCl } 1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, sob agitação constante de 210 rpm a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Este béquer ficou parcialmente submerso em banho ultrassônico (SC 1400 Unique, Brasil) sob uma frequência de 25 kHz. Foi observada a formação de precipitados leitosos que foram decantados e lavados duas vezes com água destilada. Em seguida, 25 mL de $\text{NaOH } 40 \text{ } \%$ ($\text{m}\cdot\text{v}^{-1}$) foram adicionados e a mistura foi aquecida até a fervura sob agitação (100 rpm) por 1 h. A solução decantada foi deixada em repouso por 30 dias à temperatura ambiente. Após esse tempo, o decantado foi seco em estufa (T5-50 Thoth, Brasil) a $103 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ por 12 h. Após seco, o material foi triturado e peneirado através de peneiras de 200 MESH e estava pronto para ser usado na adsorção. Obteve-se um rendimento aproximado de 25 g de pó seco. A HA comercial também foi peneirada para padronizar a granulometria dos pós.

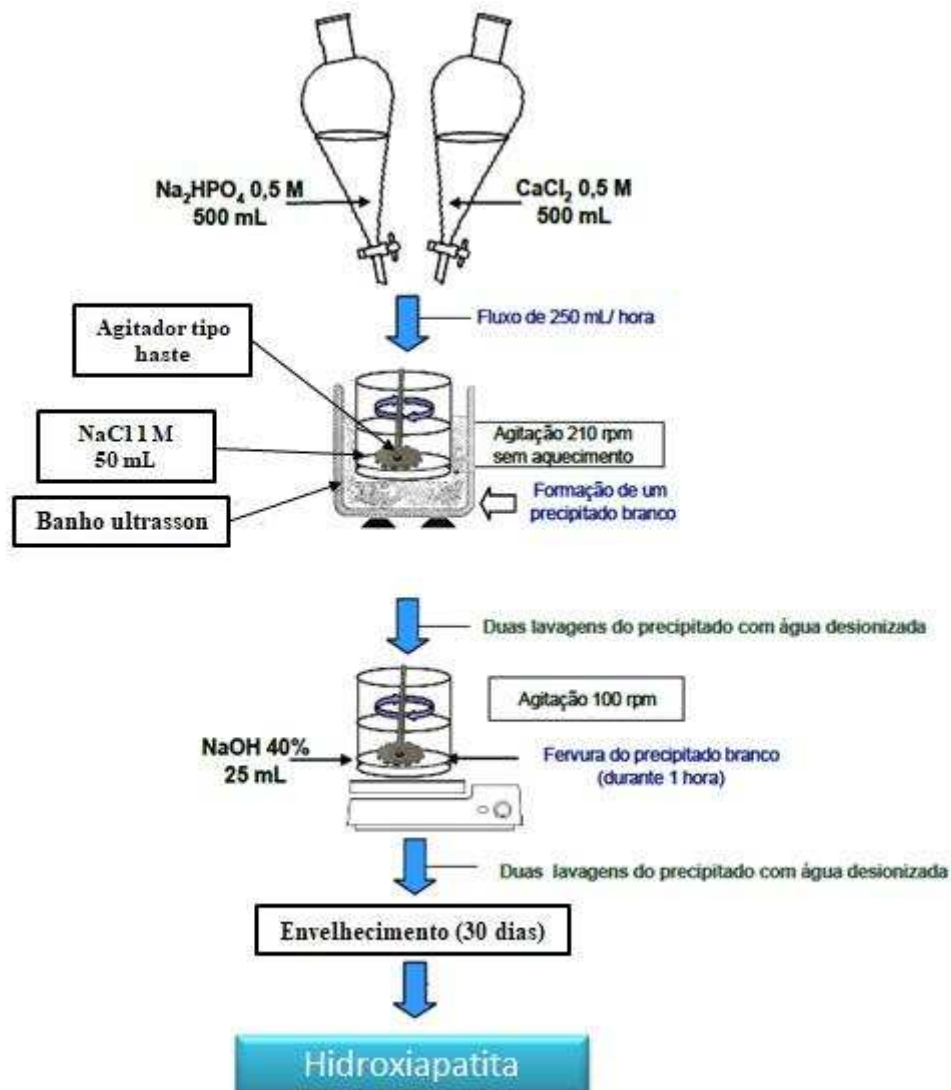


Figura 8 - Esquema do processo para síntese de HA. Adaptado de Lafetá Júnior (2014).

4.3. Caracterização da hidroxiapatita

4.3.1. Espectroscopia de raios X de energia dispersiva (EDS)

A quantificação de cálcio e fósforo foi realizada por meio da técnica espectroscópica de raios X de energia dispersiva. O equipamento utilizado foi Microscópio Eletrônico de Varredura (TM3000 Hitachi High-Tech, Japão) acoplado ao sistema de energia dispersiva (EDS). As amostras foram fixadas em “stubs” cobertas com uma camada de carbono (entre 20 e 30 nm).

4.3.2. Microscopia eletrônica de varredura

As microscopias das HAs, comercial e sintetizada, foram realizadas com auxílio de Microscópio Eletrônico de Varredura (TM3000 Hitachi High-Tech, Japão) com aumento de 500 e 2.500 X. As amostras foram fixadas em “stubs” cobertas com uma camada de carbono (entre 20 e 30 nm).

4.3.3. Difração de raios X (DRX)

O difratômetro foi modelo D8 Discover, marca Brukernequipado com tubo de cobalto (radiação Co-K α , $\lambda = 1,54060 \text{ \AA}$), com um monocromador de cristal curvo de grafite no feixe difratado, operado com uma diferença de potencial de 40 kV e uma corrente elétrica de 30 mA. As varreduras foram realizadas no modo passo a passo em intervalo de 5 a 80 graus 2θ com $0,05^\circ$ de incremento e 1 segundos de contagem de tempo em cada passo. Os dados foram trabalhados utilizando o software OriginPro 8.5.1.

4.3.4. Espectroscopia no infra-vermelho com Transformada de Fourier

Os espectros na região do infravermelho foram determinados em espectrofotômetro infravermelho (600IR VARIAN, EUA) com acessório de reflêctância atenuada PIKE GladiATR na região de 400 a 4000 cm^{-1} . Os dados foram trabalhados utilizando o software OriginPro 8.5.1.

4.3.5. Espectroscopia Raman

Os espectros Raman foram obtidos em espectrômetro micro-Raman Renishaw (Micro-Raman Renishaw, EUA) equipado com laser de argônio 514,5 nm e potência de excitação 0,05 mW. O feixe de laser foi guiado através de um filtro de linha e focado com uma objetiva de microscópio de 50x. As medidas foram feitas na faixa espectral de 785 nm a 720 cm^{-1} e 512 acumulações, com um tempo de análise de aproximadamente 5 s. Em todos os espectros obtidos, as amostras não passaram por nenhum preparo prévio, sendo levadas diretamente à lâmina com o auxílio de uma espátula. Os dados foram trabalhados utilizando o software OriginPro 8.5.1.

4.3.6. Potencial Zeta (ζ)

As leituras foram realizadas em triplicata em equipamento Zetasizer Nano ZS (Nano ZS Zetasizer, Reino Unido). O dispersante foi a água a 298,15 K, com viscosidade fixada em 0,8872 cP, índice de refração em 1.330 e constante dielétrica em 78,5. Oito tratamentos foram testados em 4 valores de pH (3,4; 6,0; 7,0 e 8,0).

- 1) ALA 5 mg·mL⁻¹
 - 2) BLG 5 mg·mL⁻¹
 - 3) HA comercial 0,1 g + 3 mL de tampão
 - 4) HA sintetizada 0,1 g + 3 mL de tampão
 - 5) HA comercial 0,1 g + 3 mL de solução ALA (5 mg·mL⁻¹)
 - 6) HA sintetizada 0,1 g + 3 mL de solução de ALA (5 mg·mL⁻¹)
 - 7) HA comercial 0,1 g + 3 mL de solução de BLG (5 mg·mL⁻¹)
 - 8) HA sintetizada 0,1 g + 3 mL de solução de BLG (5 mg·mL⁻¹)
- x (pH 3,4; 6,0; 7,0 e 8,0)

As soluções tampão utilizadas foram: *i*) fosfato de sódio monobásico (NaH₂PO₄) + fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄), em proporções adequadas, para ajustes dos pHs 6,0; 7,0 e 8,0 e, *ii*) ácido cítrico (C₆H₈O₇) + fosfato de sódio dibásico para ajuste do pH 3,4, todos na concentração de 0,01 mol·L⁻¹. Após o preparo, as suspensões referentes aos tratamentos 5, 6, 7 e 8 foram mantidas em contato por 12 h, seguido de centrifugação (5430 Eppendorf, Alemanha) (5.800 g/15 min) a 25°C. O sobrenadante contendo as proteínas que não adsorveram foi descartado e o *pellet* foi ressuspensão novamente no tampão adequado.

4.4. Estudo da adsorção de ALA e BLG em HA

4.4.1. Cinética de adsorção

O estudo da cinética de adsorção foi realizado segundo Lafetá Júnior (2014). A **Figura 9** apresenta o esquema geral do procedimento. Em tubo tipo *ependorf* (capacidade de 1,5 mL) contendo 50 ± 0,2 mg de HA sintetizada ou comercial foi adicionado 1,5 mL de solução padrão de ALA e BLG comerciais (pureza de 96 e 93 % m·m⁻¹; Davisco, EUA) na concentração de 3 mg·mL⁻¹, em diferentes valores de pH (3,4; 6,0; 7,0; 8,0). As soluções tampão utilizadas foram: *i*) fosfato de sódio monobásico (NaH₂PO₄) + fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄), em proporções adequadas, para ajustes dos pHs 6,0; 7,0 e 8,0 e, *ii*) ácido cítrico (C₆H₈O₇) + fosfato de sódio dibásico para ajuste do pH 3,4, todos na concentração de 0,01 mol·L⁻¹. Não foram realizados testes em valores de pH entre 3,4 e 6,0 devido à baixa solubilidade das proteínas comerciais ALA e BLG próximo ao pH isoelétrico, 4,2-4,8 e 5,3-5,4 respectivamente. O material foi agitado (30 rpm) a 25 °C em 16 tempos diferentes (variação de 0 a 180 minutos). O tubo *ependorf* era retirado da agitação assim que o tempo de análise era atingido.

Após a agitação, os tubos foram centrifugados (5430 Eppendorf, Alemanha) (5.800 g/15 min) a 25 °C. O objetivo dessa etapa foi interromper a etapa de adsorção. Em seguida, uma alíquota de 0,25 mL do sobrenadante, em que se encontrava a proteína não adsorvida, foi misturada a 2,75 mL de água e realizada a quantificação por espectrofotometria de UV-VIS

(Cary 50 Varian, Austrália) pelo método de leitura direta, a 280 nm. Para relacionar a absorbância lida no espectrômetro com a concentração de proteína, foram construídas curvas padrão das soluções de ALA e BLG para cada um dos valores de pH testados. O modelo de regressão foi ajustado e possibilitou determinar as equações matemáticas necessárias.

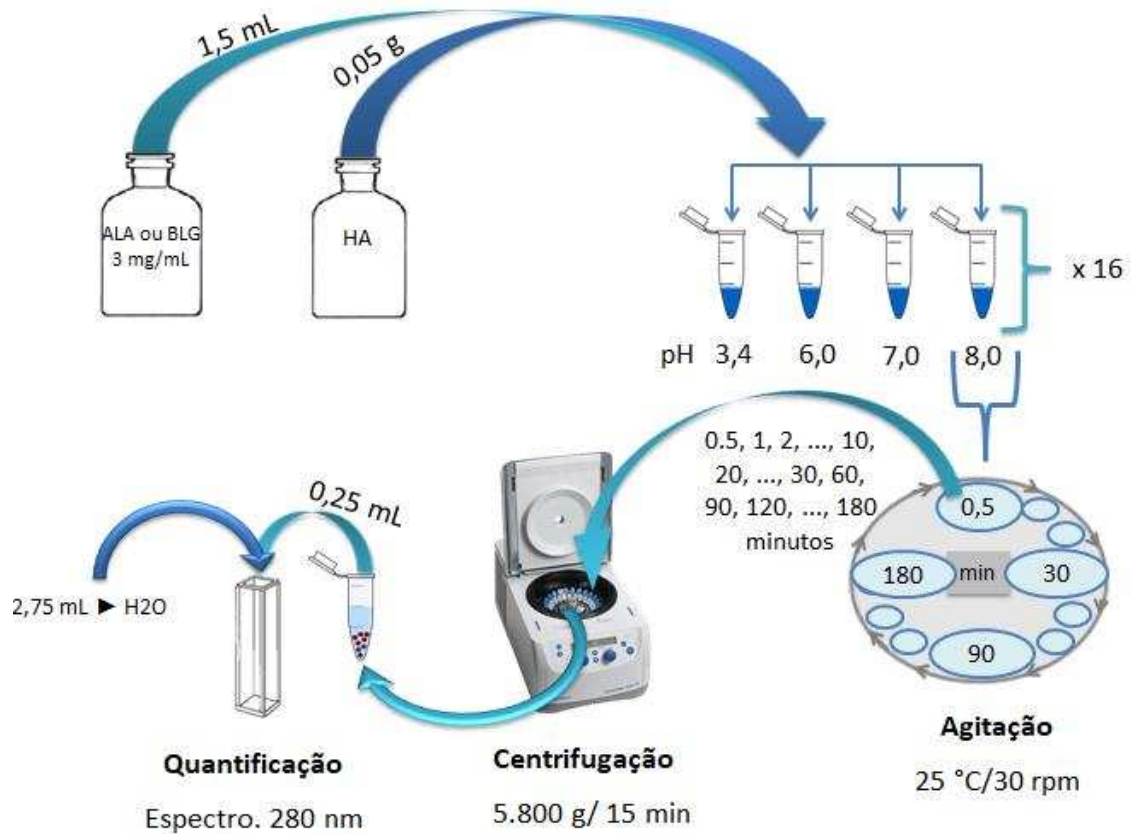


Figura 9 - Procedimento para determinação da cinética de adsorção de HA-ALA.

A proteína adsorvida foi determinada por meio de balanço de massa **Eq. 3**:

$$q = \left[\frac{(C_0 - C)}{m_{HA}} \right] * V \quad \text{Eq. 3}$$

Em que, q é a quantidade de proteína adsorvida por miligrama de resina, C_0 é a concentração de proteína inicial ($3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), C é a concentração de proteína no sobrenadante após a centrifugação, m_{HA} é a massa de HA (50 mg) e V é o volume da solução (1,5 mL).

4.4.2. Isoterma de adsorção

As isotermas de adsorção foram obtidas segundo Sousa et al. (2014). As temperaturas testadas foram 5, 15, 25, 35 e 45 °C. A **Figura 10** traz o esquema do procedimento realizado. Foram preparadas 10 soluções para cada proteína, ALA e BLG comerciais, em concentrações

crecentes de 1 a 10 mg·mL⁻¹ em tampão 0,01 mol·L⁻¹ nos valores de pH 3,4 e 6,0. As soluções tampão utilizadas foram: i) fosfato de sódio monobásico (NaH₂PO₄) + fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄), em proporções adequadas, para ajustes do pH 6,0; ii) ácido cítrico (C₆H₈O₇) + fosfato de sódio dibásico para ajuste do pH 3,4.

Foram adicionados 1,5 mL de cada solução em tubo *ependorf* contendo 50 ± 0,2 mg de HA comercial ou sintetizada. O material ficou sob agitação (50 rpm) por 12 h na temperatura adequada para garantir o equilíbrio dinâmico de adsorção, ou seja, quando a taxa de adsorção e dessorção são iguais, em cada temperatura. A quantificação da proteína adsorvida ocorreu de maneira semelhante ao procedimento realizado no ensaio de cinética de adsorção por meio de espectrofotometria de UV-VIS (Cary 50, Varian, Austrália) pelo método de leitura direta, a 280 nm.

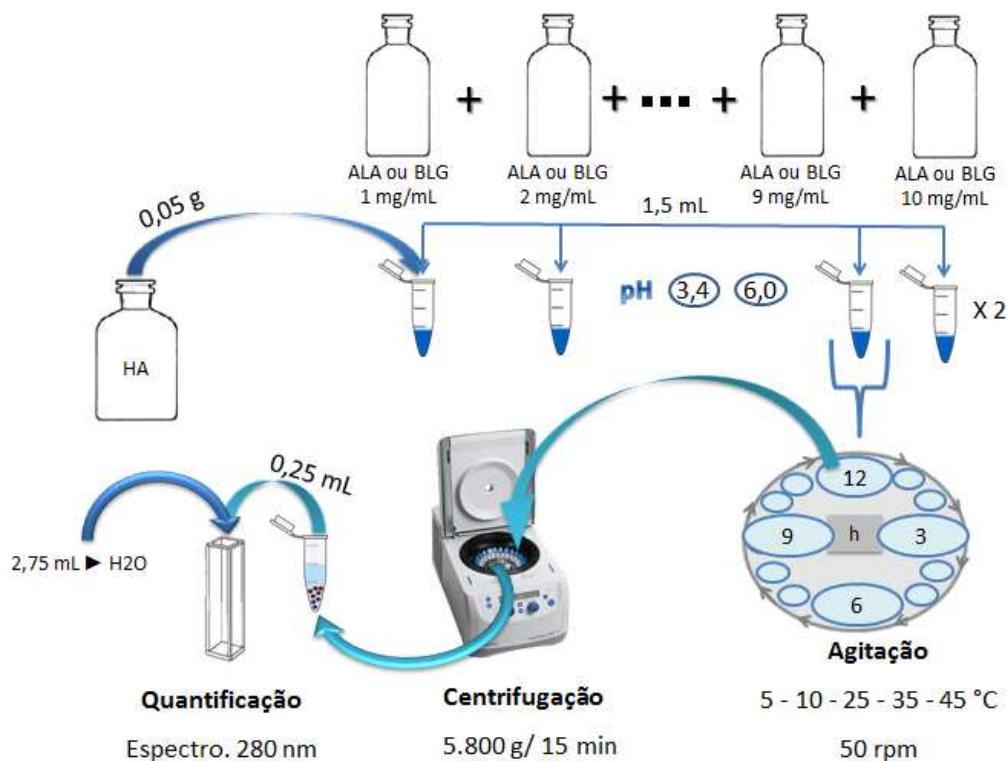


Figura 10 - Procedimento para determinação da isoterma de adsorção de HA-ALA/BLG.

4.5. Separação das proteínas ALA e BLG do soro de leite

4.5.1. Obtenção do soro de leite

O soro de leite doce utilizado neste trabalho foi obtido por meio da fabricação de queijo Minas Frescal sem adição de cultura láctica de acordo com Furtado (1994). Para isso, foi utilizado 1 kg de leite cru fornecido pelo Departamento de Zootecnia da UFV. O leite passou por processo de pasteurização lenta (64 ± 1 °C/30 min) em banho termostático. Ao leite

pasteurizado foram adicionados 0,03 % (v·m⁻¹) de solução de CaCl₂ 0,5 mol·L⁻¹, seguido de 0,06 % (v/m) da enzima quimosina, de origem bacteriana, a 33 °C. Após a ação da enzima e formação do coágulo (cerca de 35 min), este foi cortado em cubos com tamanho médio de aresta de 1 cm e agitado lentamente por 45 minutos para expulsão do soro. Logo após, o soro foi separado da coalhada por meio de filtração simples utilizando algodão. Em seguida, o filtrado foi centrifugado (5430 Eppendorf, Alemanha) (1.900 g/5 min) a 25 °C para remoção de gordura residual.

4.5.2. Quantificação de ALA e BLG

Para quantificar e obter o rendimento em cada etapa do processo de separação das proteínas ALA e BLG do soro de leite, foi empregada a cromatografia líquida sob alta pressão em coluna de fase reversa (HPLC-RP) em cromatógrafo CLURP (Cromatógrafo líquido ultra rápido Prominence; Shimatzu, Japão) com detector SPD M20A e monitorado via software LC solution de acordo com a metodologia descrita por Xiao-Yu et al. (2012).

As condições de análise foram as seguintes:

- Coluna de fase reversa: (VP-ODS-C18) de 150 mm por 4,6 mm
- Coluna de guarda: (CLCG-ODS) de 10 mm por 4 mm
- Degaseificador: DGU – 20A5
- Bomba LC 20 AT
- Forno CT0 20A a 30 °C
- Fase móvel: (A) 0,1 % de TFA em água, (B) 0,1 % de TFA em acetonitrila
- Vazão da fase móvel: 1 mL·min⁻¹
- Temperatura: 30 °C
- Volume de injeção: 20 µL (Injeção automática)
- Comprimento de onda: 215 nm

O gradiente para as soluções A (0,1 % de TFA em água e pH 2,5) e B (0,1 % de TFA em acetonitrila em pH 1,02) foi programado da seguinte forma:

70 % A, 30 % B → 50 % A, 50 % B, de 0 → 35 min

50 % A, 50 % B → 30 % A, 70 % B, de 35 → 37 min

As amostras de leite cru e pasteurizado foram tratadas para remover caseínas e glóbulos de gordura. O procedimento consistiu em adicionar HCl 1 mol·L⁻¹ até pH 4,6 seguido de filtração em papel de filtro. O filtrado foi centrifugado (5430 Eppendorf, Alemanha) (1.900 g/5 min) a 25 °C para remoção de gordura residual. Todas as amostras, inclusive aquelas utilizadas

na construção da curva de calibração, foram filtradas antes da injeção em membrana com tamanho médio de poros de 0,22 μm .

Para quantificar as proteínas foram construídas curvas analíticas com 5 (cinco) pontos utilizando padrões das proteínas ALA e BLG. Todas as soluções foram preparadas com água deionizada e desgaseificada. Para ALA, a faixa de concentração utilizada foi de 0,5 a 2,5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Para a BLG, a faixa utilizada foi de 1 a 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Para estimar a concentração das variantes A e B da BLG foi realizado cálculo da proporção das áreas dos picos segundo a **Eq. 12**. A equação de regressão foi obtida por meio da relação entre as áreas dos picos e a concentração das proteínas nos padrões.

$$[BLG A/B] = \frac{Ar_{BLG A/B}}{Ar_{Total}} \times [BLG] \quad \text{Eq. 12}$$

Em que, $[BLG A/B]$ é a concentração das variantes A ou B da BLG na amostra, $Ar_{BLG A/B}$ é a área relativa ao pico de cada uma das variantes, Ar_{Total} é área total dos dois picos relativos a BLG e $[BLG]$ é a concentração empregada no padrão de BLG.

4.5.3. Precipitação seletiva

O procedimento de precipitação seletiva foi conduzido segundo Toro-Sierra, Tolkach, Kulozikt (2013). Ao soro de leite foi adicionado citrato de sódio 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ a 25 °C. Sob agitação (50 rpm), ácido cítrico 2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ foi adicionado até atingir pH 3,4. Em seguida, a dispersão foi aquecida a 50 °C e mantida sob constante agitação (100 rpm/min) por 120 min. Logo após, o material foi resfriado e deixado em repouso a 4 °C por 24 h, para que aumentassem o tamanho dos agregados de ALA. Após o repouso, a solução foi centrifugada (5430 Eppendorf, Alemanha) (5.800 g /15 min) a 25 °C. Ao final do processo, a ALA pode ser recuperada no precipitado e a BLG na fase fluida. A dispersão do precipitado foi realizada em tampão CaCl_2 1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e adição de NaOH 1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ até pH 6,0. A fase fluida contendo a BLG foi mantida em pH 3,4.

4.5.4. Adsorção

A massa de HA e a temperatura foram calculadas de acordo com as isotermas. Foram colocados em contato, 10 mL das fases fluida ou precipitado ressuspendido, obtidos na precipitação seletiva, com a HA comercial e a sintetizada em tubos do tipo *Falcon* (capacidade de 45 mL). Os tubos ficaram sob agitação (50 rpm) por 1 h a 25 °C. Em seguida, cada suspensão foi centrifugada (5430 Eppendorf, Alemanha) (5.800 g /15 min) a 25 °C. O sobrenadante referente à dispersão contendo BLG (fase fluida da precipitação seletiva) passou

por novo procedimento de adsorção para elevar o percentual de recuperação da proteína. As proteínas presentes no sobrenadante foram quantificadas por HPLC-RP e, assim, foi estimada a concentração das proteínas adsorvidas à HA por meio de balanço de massa.

4.5.5. Dessorção

Os ensaios iniciais de dessorção foram realizados com ALA ou BLG previamente adsorvidas em HA como proposto por Genaro et al. (2002). O objetivo foi verificar qual o tampão apresentava melhor recuperação das proteínas. Todas as soluções foram preparadas com água deionizada. As soluções testadas foram:

- i) CaCl_2 de 1, 10 e 20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$
- ii) MgCl_2 0,1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
- iii) NaCl de 0,1, 0,15 e 0,3 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
- iv) Tampão fosfato pH 6,8 de 0,1, 0,4 e 0,8 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. (25, 30, 40 e 50 °C)

Os melhores resultados foram obtidos para o tampão fosfato 0,4 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ a 50 °C. Portanto, para promover a dessorção, as proteínas adsorvidas às HAs foram colocadas em contato com 10 mL de tampão fosfato de sódio 0,4 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ em pH 6,8 agitação (50 rpm) a 50 °C por 1 h. Ao final, os tubos foram centrifugados (5430 Eppendorf, Alemanha) (5.800 g /15 min) a 25 °C, o que permitiu recuperar as proteínas no sobrenadante.

4.5.6. Cromatografia de exclusão molecular (CEM)

As condições operacionais da CEM para purificação das proteínas, tanto ALA quanto BLG, foram determinadas segundo Rojas (2001). O sistema de CEM utilizado foi o PD-10 Columns da Pharmacia Biotech e o procedimento foi executado a 25 °C. A resina utilizada foi a Shepadex G-25® M (50-150 μm). A **Figura 11** apresenta um esquema do procedimento executado. Foi aplicado um volume de 0,5 mL de amostra para separar as proteínas dos compostos salinos do tampão utilizado na dessorção. A fase móvel foi a água deionizada e degaseificada. O volume coletado de eluído após a coluna foi definido utilizando reagente de Bradford. Em geral, para todos os tratamentos, foram coletados 3 mL de eluído.

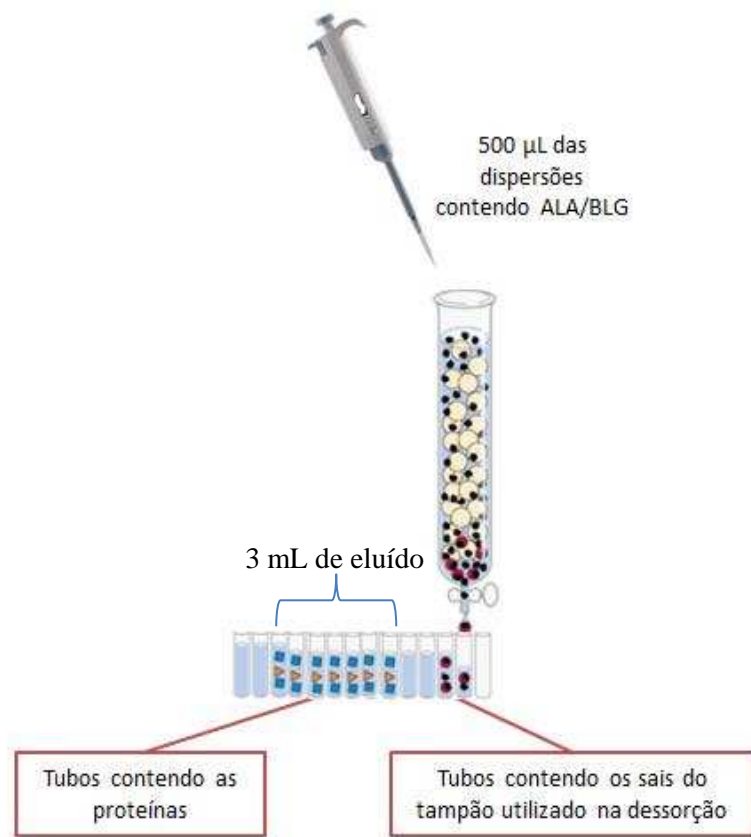


Figura 11 - Esquema da cromatografia de exclusão molecular.

5. Resultados e Discussão

A HA se apresenta como um adsorvente versátil que pode ser aplicado a diferentes processos adsorptivos nas indústrias químicas, farmacêutica e alimentícia. Para a indústria de alimentos em especial, sua baixa toxicidade, elevada resistência mecânica e química e alta afinidade por proteínas, a colocam em boas condições frente a outros adsorventes tradicionais como o carvão ativado e a sílica. No presente trabalho, HA foi sintetizada por meio de um processo simples e de baixo custo. A seguir serão apresentados os resultados de caracterização, estudos cinéticos e isotérmicos e a aplicação prática da HA na recuperação das proteínas ALA e BLG diretamente do soro de leite doce.

5.1. Caracterização da hidroxiapatita

Hidroxiapatita sintetizada por via úmida foi caracterizada utilizando técnicas microscópicas (MEV), espectroscópicas (EDS, FITR e Raman) e difração de raios X. Os resultados foram comparados à HA comercial (Sigma Aldrich, CA 21223, EUA) e trabalhos da literatura para avaliar a presença de grupos funcionais característicos de HA, presença de outras fases, percentual de cristalização, tamanho de cristal e pureza do material.

5.1.1. Microscopia eletrônica de varredura

As microscopias foram realizadas para comparar a morfologia das partículas das HAs comercial e sintetizada (**Figura 11**). A partir das imagens é possível perceber nitidamente diferenças entre as HAs. O material comercial (Sigma Aldrich, CA 21223, EUA) tem prevalência de estruturas agregadas e amorfas, com superfície mais arredondada. A presença desses agregados pode reduzir a capacidade de adsorção, uma vez que inviabiliza o acesso do adsorbato aos sítios ativos presentes na superfície da HA (CETINKAYA; AKKAYA, 2016). No caso da HA sintetizada é possível verificar numerosas estruturas com arestas mais angulares. Essas estruturas são, provavelmente, devidas ao processo de secagem em estufa que permite a formação de uma película lisa e densa na superfície da suspensão devido ao contato direto com o ar quente.

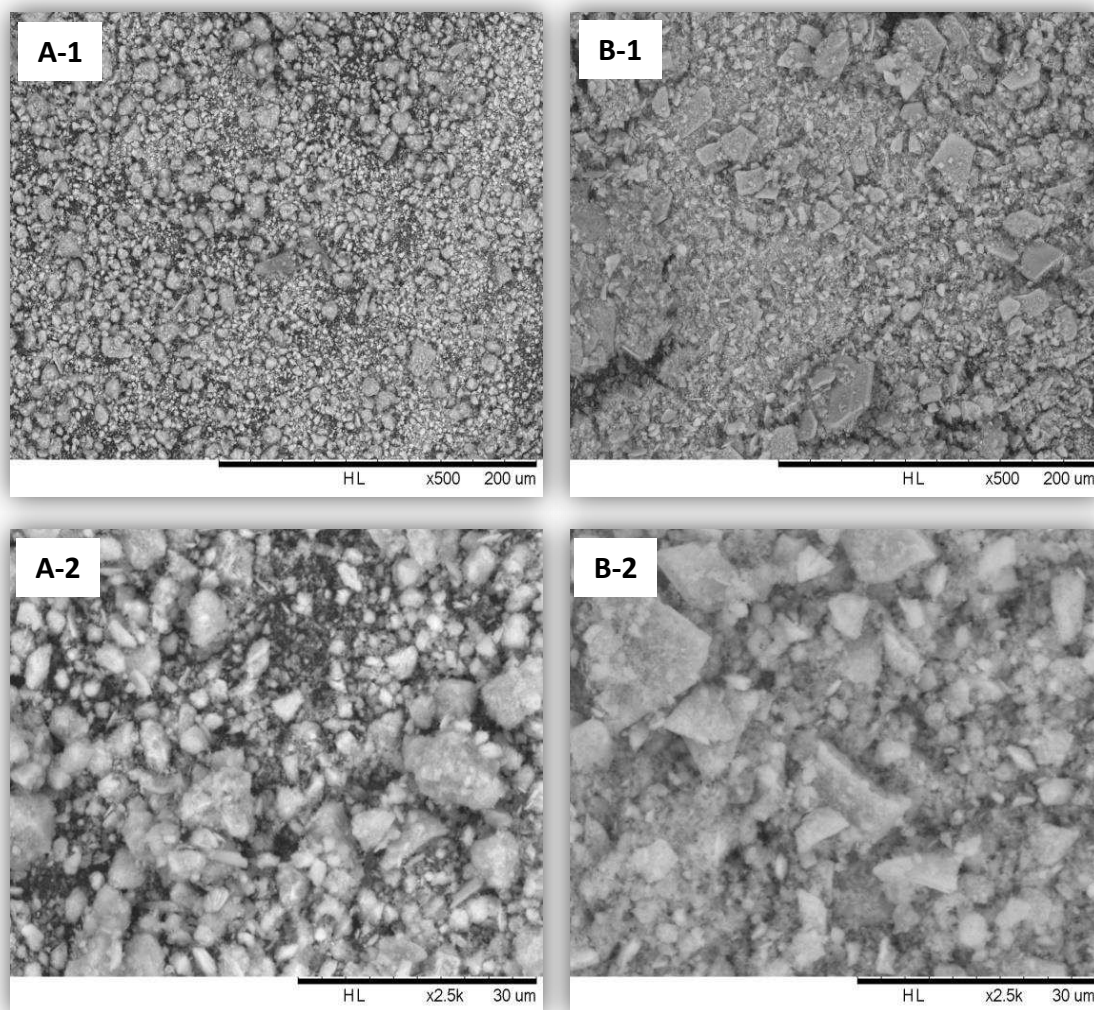


Figura 12 - MEV das hidroxiapatitas: (A) comercial e (B) sintetizada com aumento de (1) 500x e (2) 2.500x.

5.1.2. Espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS)

A EDS foi utilizada para determinar a relação Ca/P. Essa informação é utilizada para comparar diferentes procedimentos empregados durante a síntese da HA. Portanto, o distanciamento do valor estequiométrico da HA, de 1,67, pode indicar falta de controle do processo ou a presença de outras fases cristalinas (PORALAN JR et al., 2015).

O valor encontrado para a relação Ca/P foi de 1,57 e 1,33 para a HA sintetizada e comercial, respectivamente. O valor mais baixo, em relação à literatura, encontrado para a HA sintetizada pode ser devido ao tempo de envelhecimento empregado após a síntese. Provavelmente, ocorreu a solubilização parcial do íon Ca^{2+} , em substituição a outros íons, como por exemplo, o íon CO_3^{2-} (LAFETÁ JUNIOR, 2014). Como será apresentado no decorrer deste trabalho, outras fases foram encontradas na HA comercial, provavelmente, isso também pode ter levado à redução da relação Ca/P observada.

5.1.3. Difração de raios X (DRX)

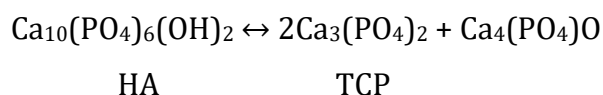
A DRX foi utilizada para identificar picos referentes às fases cristalinas características de HA. Segundo a lei de Hanawalt, a presença dos três picos de maior intensidade [$d(\text{Å}) = 2,820 \text{ nm}$], [$d(\text{Å}) = 2,795 \text{ nm}$] e [$d(\text{Å}) = 2,728 \text{ nm}$] confirmam a presença de HA no material sintetizado (LEE; PAI; CHANG, 2013; RODRIGUES, 2009; YAMINI et al., 2014). Os dados foram comparados à carta de referência, no caso da HA, JCPDS número 09-0432. Além dos picos citados, diversos outros podem ser verificados por comparação do $d(\text{Å})$ entre a HA sintetizada e as HAs padrão (carta 09-0432) e comercial (**Tabela 6**).

Tabela 6 – Distância interplanar [$d(\text{Å})$] das HAs padrão, comercial e sintetizada

d(Å) nm da HA padrão	d(Å) nm		Intensidade relativa de HA sintetizada (%)
	HA comercial	HA sintetizada	
JCPDS Card N° 09-0432			
5.250	5.289	5.289	4
4.720	4.979	-	-
4.070	4.083	4.092	5
3.880	3.906	3.906	8
3.440	3.444	3.457	10
3.170	3.179	3.179	12
3.080	3.129	3.097	7
2.814	2.816	2.820	100
2.778	2.782	2.795	80
2.720	2.728	2.728	59
2.631	2.635	2.635	25
2.528	2.534	2.530	4
2.296	2.266	2.269	18
2.262	2.260	2.263	16
2.148	2.159	2.154	5
2.065	2.063	2.065	4
2.000	1.998	2.002	5
1.943	1.945	1.947	23
1.890	1.892	-	-

1.871	-	-	-
1.841	1.845	1.843	30
1.806	1.807	1.809	13
1.780	1.784	1.784	9
1.684	1.681	-	-
1.611	1.609	1.614	3
1.542	1.542	1.538	4
1.530	-	-	-
1.474	1.476	-	-

O difratograma obtido para a HA comercial apresentou duas bandas referentes a possíveis impurezas, fosfato tricálcico (TCP) e fosfato de cálcio (CaHPO₄). A amostra de HA sintetizada apresentou apenas o pico referente ao TCP (**Figuras 13 e 14**). (LAFETÁ JUNIOR, 2014; PORALAN JR et al., 2015; TÜRK et al., 2017) também encontraram picos referentes ao TCP em HA. Esses autores relacionam a presença de TCP à redução da relação Ca/P e da cristalinidade devido à competição por alguns sítios que geram distorções no cristal de HA. Provavelmente, as condições empregadas (temperatura, umidade e pH) na síntese em meio aquoso e o tempo de envelhecimento favoreceram a transição de HA para TCP (**Eq. 13**) (HENCH, 2013).



Eq. 13

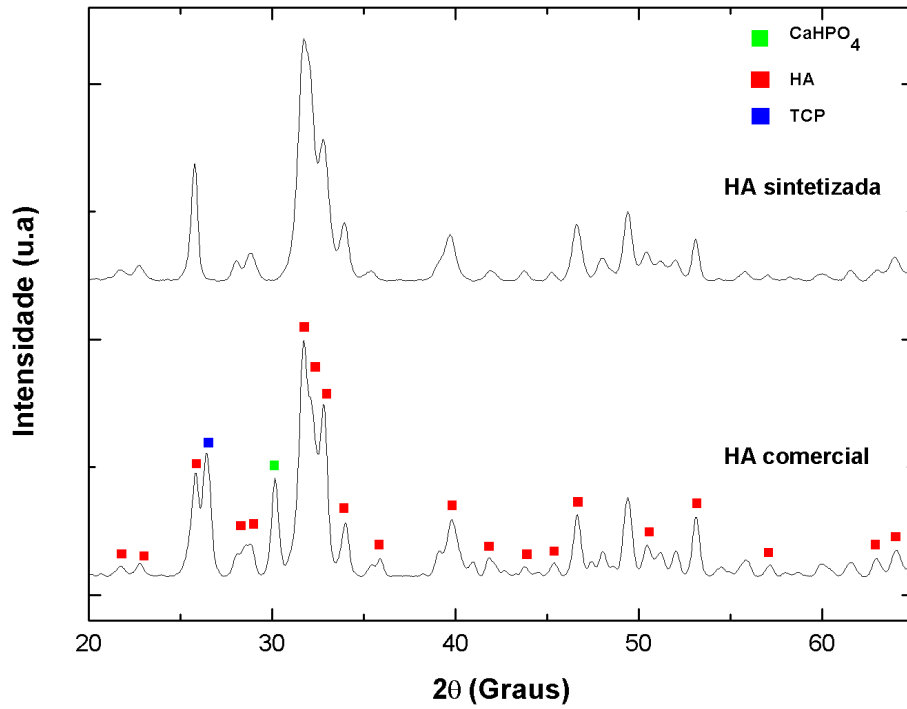


Figura 13 - Difratoograma das HAs comercial e sintetizada: ■ HA; ■ TCP; ■ CaHPO₄.

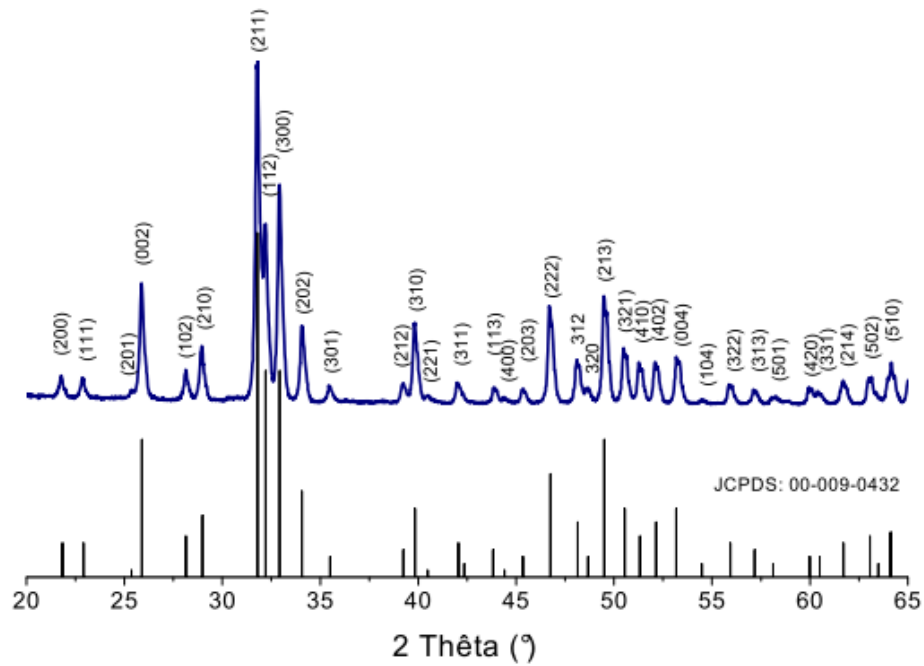


Figura 14 - Difratoograma padrão de HA pura (JCPDS 09-0432).

A presença de picos com bases largas no difratograma indicam baixa cristalinidade tanto para a HA comercial quanto para a HA sintetizada. A Eq. 14 foi utilizada para estimar a fração cristalina (X_C) das HAs.

$$X_C = \frac{I_{300} - V_{112/300}}{I_{300}} \times 100 \quad \text{Eq. 14}$$

Em que, X_C é a fração de fase cristalina em porcentagem, I_{300} é a intensidade do pico de difração (300) e $V_{112/300}$ é a intensidade do vale entre os picos de difração (112) e (300).

O cálculo é baseado no fato de que a HA 100 % cristalina possui boa resolução para os picos (112) e (300). Portanto, alterações na intensidade do vale formado entre esses picos citados e a intensidade do pico (300) são indicativos do grau de cristalinidade do material (LANDI et al., 2000; PORALAN JR et al., 2015). A HA comercial apresentou cristalinidade superior à HA sintetizada, 34,93 e 9,29 %, respectivamente. A medida da largura a meia altura do pico referente ao ângulo $2\theta = 46,6$ confirma o resultado, uma vez que, o pico da HA comercial foi mais estreito comparado à HA sintetizada, $0,4421^\circ$ e $0,5566^\circ$, respectivamente. A baixa cristalinidade de HA produzida por meio aquoso também é relatada por outros autores (LAFETÁ JUNIOR, 2014; RIGO; GEHRKE; CARBONARI, 2007; YAMINI et al., 2014). Para aumentar o grau de cristalinidade, deve-se atentar para as condições durante a síntese (fluxo de reagentes, impurezas dos reagentes, temperatura, agitação, entre outras). Além disso, deve-se evitar a formação de outras fases diferentes da HA e, quando possível, tratar termicamente os pós, entre 300 e 600 °C (Sinterização) (LAFETÁ JUNIOR, 2014; LEE; PAI; CHANG, 2013).

O tamanho médio dos cristais (τ) foi estimado pela **Eq. 15**, conhecida por aproximação de Debye-Scherrer (PORALAN JR et al., 2015).

$$\tau = \frac{k\lambda}{\beta \cos\theta} \quad \text{Eq. 15}$$

Em que, τ é o tamanho médios dos cristais em nanômetros, λ é o comprimento de onda da radiação ($1,5406 \text{ \AA}$), β é a largura à meia altura do pico ($2\theta = 46,6^\circ$) e k é a constante de alargamento utilizada como 0,9 (PORALAN JR et al., 2015). A HA comercial apresentou tamanho médio dos cristais superior à HA sintetizada, 34 e 27 nm, respectivamente. A redução do tamanho dos cristais por ser atribuída à baixa cristalinidade verificada para a HA sintetizada.

Análises de DRX das HAs com as proteínas ALA e BLG comerciais previamente adsorvidas foram realizadas. Por meio da comparação das curvas não foi possível observar diferenças entre as HAs com e sem a presença de proteínas adsorvidas (**Figura 15**). Isso mostra que a adsorção de proteínas não alterou a estrutura dos cristais das HAs.

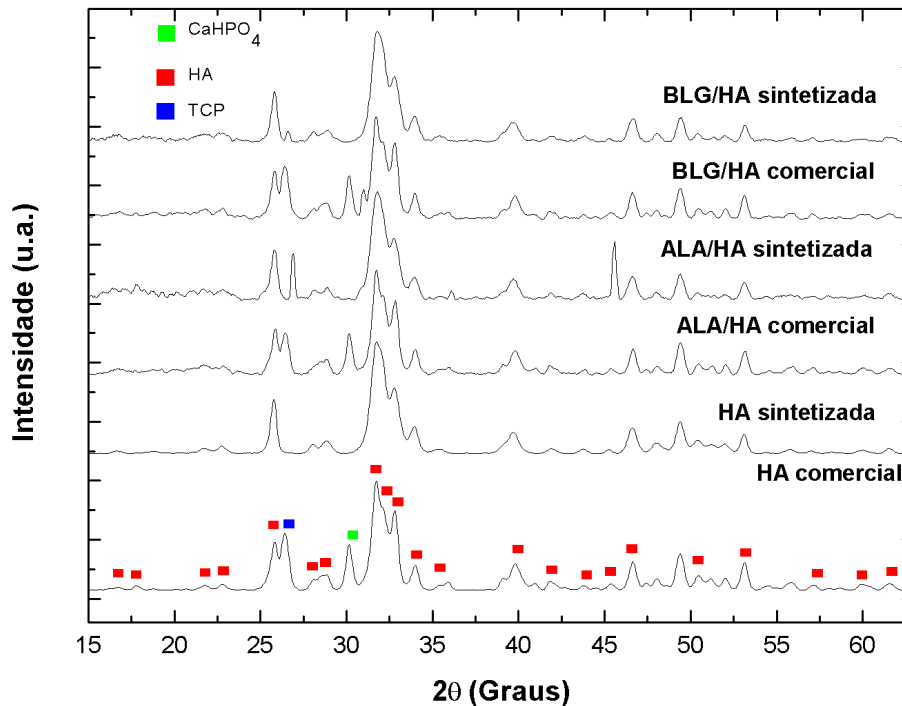


Figura 15 - Difratomogramas das HAs comercial e sintetizada e da adsorção de ALA e BLG às respectivas HAs

■ HA; ■ TCP; ■ CaHPO₄

5.1.4. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

A espectroscopia na região próxima ao infravermelho foi utilizada para identificar a absorção/emissão de radiação de grupos associados à HA. Considerando sua cristalografia, a HA ocorre como um cristal empacotado em formato hexagonal pertencendo ao grupo espacial P6₃/m cuja célula unitária consiste de grupos Ca²⁺, PO₄³⁻ e OH⁻ (PORALAN JR et al., 2015). Portanto, a presença de bandas pertencentes a estes grupos iônicos são indícios da presença de fosfato de cálcio do tipo HA. A **Figura 16** apresenta os espectros de FT-IR das HAs comercial e sintetizada.

As bandas na faixa de 100 a 1100 cm⁻¹ e uma vibração entre 580 e 540 cm⁻¹ são características do íon PO₄³⁻ em HA (BARBOSA, 2007; MIR et al., 2012). Além dessas, os estiramentos em 565 cm⁻¹, 603 cm⁻¹, 1035 cm⁻¹ e um ombro em 963 cm⁻¹ também são atribuídos ao íon PO₄³⁻ (LEE; PAI; CHANG, 2013). Os picos referentes às bandas de 570 e 620 cm⁻¹ também são utilizados como indicativo da cristalinidade da HA. À medida que a HA se torna mais cristalina, sua estrutura hexagonal se torna mais evidente, com isso, esses picos se tornam mais simétricos (PORALAN JR et al., 2015). Portanto, os dados reforçam o elevado percentual de HA amorfa, tanto no material comercial quanto no sintetizado.

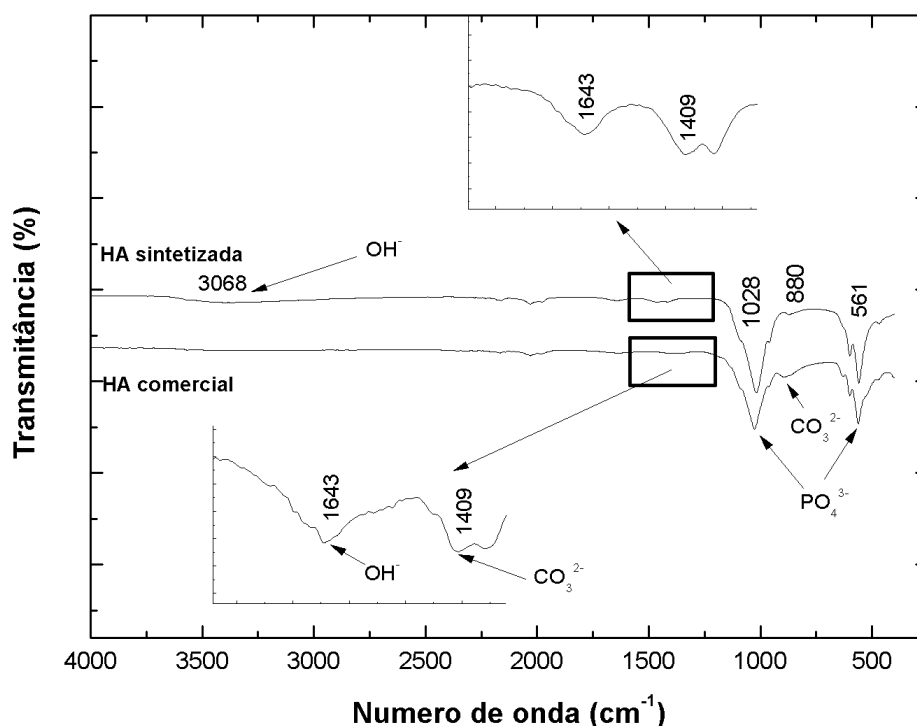


Figura 16 - Espectro de FT-IR das HAs comercial e sintetizada.

Vibrações associadas ao íon OH^- foram detectadas pelas bandas em 3068 e 1630 cm^{-1} . A banda larga a 3098 cm^{-1} encontrada nos espectros da HA sintetizada resulta de uma sobreposição de vibrações de hidrogênio: vibrações de estiramento do OH^- da água e/ou de grupos OH^- pertencentes à estrutura da HA. A banda de baixa intensidade em 1630 cm^{-1} é atribuída às moléculas de água fortemente adsorvidas à HA (GRANADOS CORREA; BONIFÁCIO MARTINEZ; SERRANO GÓMEZ, 2010; TÜRK et al., 2017).

As fracas bandas em 880 e 1049 cm^{-1} presentes tanto em HA comercial quanto em HA sintetizada são atribuídas ao íon CO_3^{2-} . A presença de bandas representando compostos que contém carbono são relativas às impurezas presentes nos reagentes ou pela solubilização de gases atmosféricos, principalmente, o CO_2 (GRANADOS CORREA; BONIFÁCIO MARTINEZ; SERRANO GÓMEZ, 2010; HENCH, 2013; SILVA et al., 2002). A HA permite substituições catiônicas e aniônicas, principalmente a inserção de CO_3^{2-} , entre os sítios de PO_4^{3-} e OH^- devido à sua estrutura porosa e aberta. A presença do íon CO_3^{2-} provoca redução na cristalinidade, aumento de solubilidade, variações em algumas posições atômicas e alterações na conformação dos cristais (MOREIRA; PAULA; MOREIRA, 2007). Outros trabalhos também relatam a presença de bandas características relacionadas ao íon CO_3^{2-} em HA (GRANADOS CORREA; BONIFÁCIO MARTINEZ; SERRANO GÓMEZ, 2010; HENCH, 2013; MIR et al., 2012; RIGO; GEHRKE; CARBONARI, 2007).

Devido à baixa intensidade dos picos referentes aos íons carbonato, os espectros de FT-IR obtidos sinalizam para a elevada pureza da HA sintetizada. Segundo Granados Correa et al. (2010) quanto maior a pureza, maior é o número de sítios de adsorção e, conseqüentemente, mais elevada é a capacidade de adsorver da HA.

Swain; Sarkar (2013) e Yang; Zhang (2009) avaliaram a adsorção de BSA em HA e identificaram picos característicos de aminas/amidas que foram relacionados com a presença da proteína adsorvida. Entretanto, nos espectros obtidos no presente trabalho não se verificou alteração detectável devido à adsorção das proteínas, tanto ALA quanto BLG (**Figura 17**).

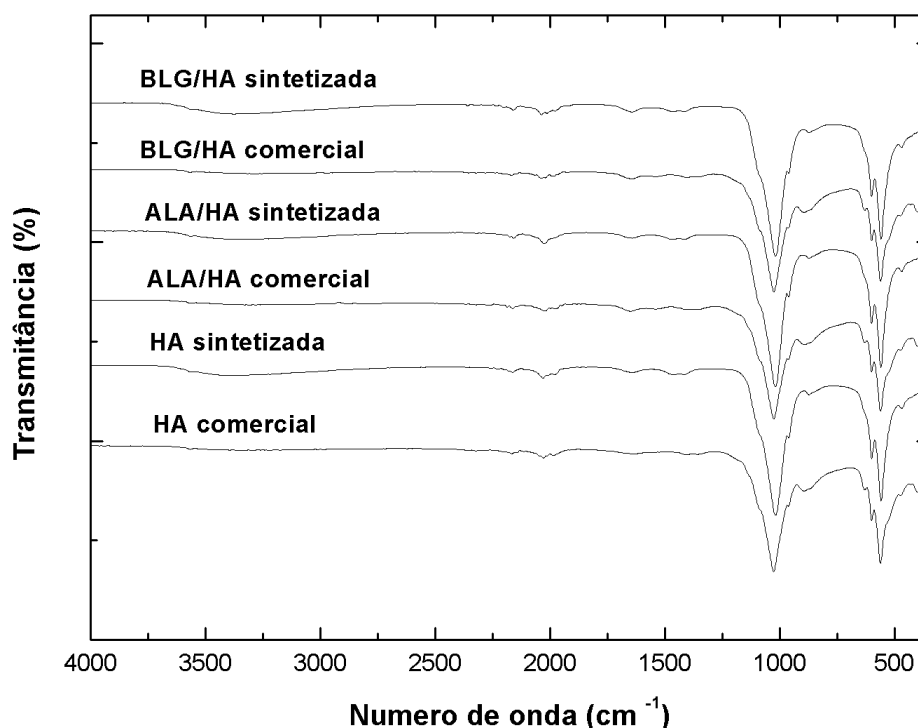


Figura 17 - Espectros de FT-IR das proteínas ALA e BLG adsorvidas às HAs comercial e sintetizada

5.1.5. Espectroscopia Raman

As vibrações tipo Raman de íons fosfatos, carbonatos e hidroxil em apatitas aparecem em picos acima de 400 cm^{-1} . Espectros de Raman característicos de HA com elevada intensidade de grupos fosfatos (PO_4^{3-}) foram observados em HA sintetizada em bandas de 430, 590, 962 e 1047 cm^{-1} (SILVA et al., 2002; TÜRK et al., 2017). Todos os picos detectados para a HA comercial foram observados na HA sintetizada, o que reforça que o processo de síntese proposto foi eficiente em obter fosfato de cálcio do tipo HA (**Figura 18**). Novamente, assim como aconteceu com a DRX e FT-IR, não foi possível perceber alteração nos espectros Raman em que as proteínas ALA e BLG estavam adsorvidas à HA.

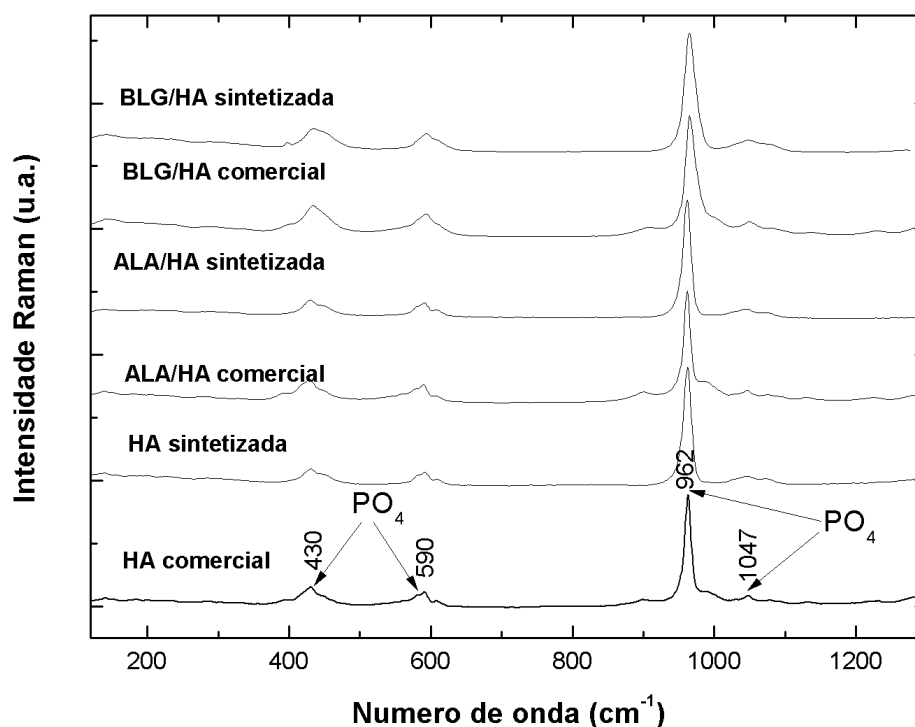


Figura 18 - Espectro Raman das amostras de HA comercial, sintetizada e da adsorção das proteínas ALA e BLG adsorvidas às respectivas HAs.

Em resumo, por meio dos resultados apresentados foi possível constatar que foi possível obter HA com elevado teor de pureza e baixo grau de cristalinidade por meio do processo de precipitação química por via úmida. A **Tabela 7** resume alguns espectros de FI-TR e Raman presentes na literatura e os compara com os espectros obtidos para as HAs comercial e sintetizada.

Tabela 7 - Picos dos espectros Raman e IR obtidos para as HAs comercial e sintetizada comparados com dados de referência.

	Raman (cm⁻¹)			HA (COM)	HA (SINT)
	(ELLIOTT, 1994)	(SILVA et al., 2002)	(YAMINI et al., 2014)		
$\nu_3(\text{PO}_4)$	1053	1056	1049	1047	1046
$\nu_1(\text{PO}_4)$	962	958	963	962	961
$\nu_4(\text{PO}_4)$	593	590	592	579	582
$\nu_4(\text{PO}_4)$	432	-	430	429	431

<u>FT-IR (cm⁻¹)</u>					
OH ⁻	3572	3478	-	3567	3568
OH ⁻	-	1630	-	1643	1643
v ₃ (CO ²⁻ ₃)	-	1500	-	-	1465
v ₃ (CO ²⁻ ₃)	-	1415	-	1408	1415
v ₃ (PO ³⁻ ₄)	1065	1060	-	1028	1018
V ₁ (PO ²⁻ ₄)	962	961	-	962	961
V ₂ (CO ²⁻ ₃)	-	873	-	894	873
	631	634	-	-	-
V ₄ (PO ³⁻ ₄)	602	605	-	600	600
V ₄ (PO ³⁻ ₄)	565	568	-	561	559

HA (COM): HA comercial; HA (SINT): HA sintetizada.

5.2. Estudo da interação entre HA e as proteínas ALA e BLG comerciais

A seguir serão apresentados e discutidos os resultados obtidos nos estudos cinéticos e de equilíbrio da adsorção das proteínas ALA e BLG comerciais com pureza de 96 e 93 % (m·m⁻¹) de pureza, respectivamente, em HAs comercial e sintetizada. Os parâmetros obtidos pelos modelos cinéticos e pelas isotermas serão utilizados para o planejamento das etapas do processo de separação dessas proteínas no soro de leite.

5.2.1. Potencial Zeta (ζ)

Medidas de potencial Zeta foram realizadas nas proteínas ALA e BLG comerciais, nas HAs comercial e sintetizada e no material proveniente da adsorção entre elas. Não foram testados valores de pH entre 3,4 e 6,0 devido ao aumento da interação entre as proteínas ALA e BLG, verificados pela presença de turbidez do meio. Isso ocorre por estarem em pH próximos aos valores de seus pH isoeletricos.

O pH isoeletrico (pI) estimado a partir do ponto em que a linha de tendência cruza o ponto em que o potencial Zeta é igual a zero foi de 4,8 para a ALA e de 4,6 para a BLG (**Figura 19**). Os valores estão no intervalo observado para a ALA e abaixo do que é relatado para a BLG (YADAV et al., 2015). Porém, este procedimento não tem alta precisão para realizar este tipo de análise, uma vez que, a variação do potencial Zeta com o pH não é necessariamente uma relação linear. Para determinar o pI das proteínas deve-se realizar uma titulação com solução alcalina/ácida variando o pH e, simultaneamente, medir o potencial Zeta. No momento em que esse atingir o valor igual a zero tem-se o pH isoeletrico, em que, o somatório das cargas

positivas e negativas na superfície da molécula é igual a zero (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2008). As HAs comercial e sintetizada apresentaram potencial Zeta negativo, entre -20 e -30 mV, para todos os valores de pH testados. Os valores estão de acordo com Nagasaki et al., 2017; Yin et al. (2002).

A medida do potencial Zeta sugere que ocorreu adsorção entre as proteínas e as HAs. Em todos os tratamentos, verificou-se a variação do potencial Zeta após a adsorção, o que indica a interação entre adsorvente e adsorbato (KANDORI et al., 2014; TERCINIER et al., 2017). Nesse caso, a adsorção de ALA e BLG em HA pode ser atribuída majoritariamente às interações eletrostáticas entre os cátions Ca^{2+} e os grupos COO^- presentes na superfície das moléculas de proteínas e, analogamente, entre os ânions PO_4^{3-} da HA e grupamentos NH_3^+ das proteínas (SWAIN; SARKAR, 2013).

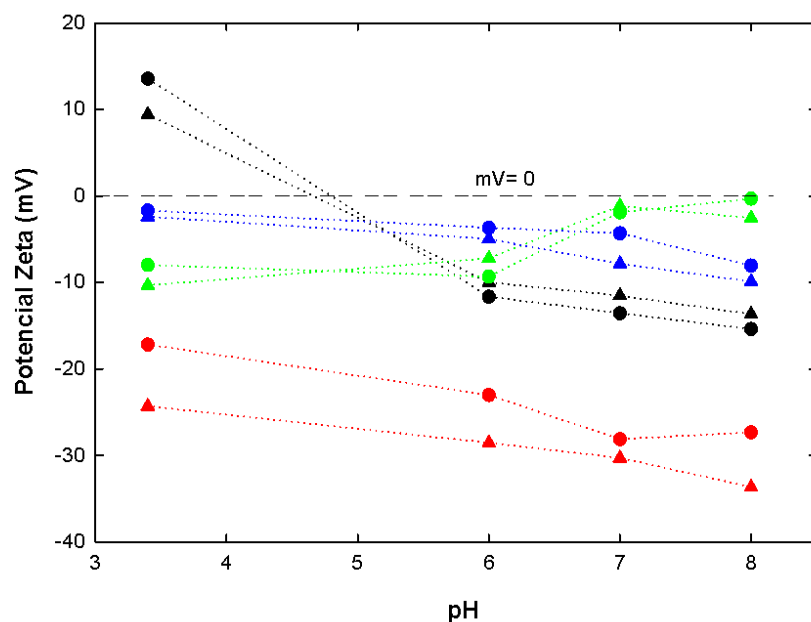


Figura 19 - Potencial Zeta das proteínas ALA e BLG, das HA comercial e sintetizada e do sistema adsorvente proteína/HA. ● ALA; ▲ BLG; ● HA comercial; ▲ HA sintetizada; ● ALA/HA comercial; ▲ ALA/HA sintetizada; ● BLG/HA comercial; ▲ BLG/HA sintetizada.

5.2.2. Cinética de adsorção

O estudo cinético da adsorção de proteínas é de fundamental importância, tanto para o dimensionamento, quanto para a operação do processo. A partir dos resultados é possível obter, por exemplo, os fatores limitantes como temperatura, pH, força iônica e composição da fase fluida, além da capacidade e da taxa de adsorção das proteínas pelo adsorvente (NAKANISHI; SAKIYAMA; IMAMURA, 2001).

As proteínas foram quantificadas pelo método de leitura direta em espectrofotometria na região do UV-vis. O comprimento de onda utilizado foi de 280 nm. Esse foi o mesmo utilizado

em outros trabalhos envolvendo proteínas do soro de leite bovino (LAFETÁ JUNIOR, 2014; ROJAS, 2001; ZUÑIGA, 2003). A utilização desse comprimento de onda é possível devido à presença dos resíduos de aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e, principalmente, triptofano nas proteínas ALA e BLG, que absorvem radiação nesta região do espectro (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2008). A correlação entre a absorvância e a concentração de proteínas foi obtida por meio da construção de curvas de calibração para todos os tratamentos testados. O coeficiente de determinação (R^2) para todas as curvas foi superior a 0,98.

Inicialmente, realizou-se testes para avaliar o comportamento da adsorção das proteínas ALA e BLG comerciais em HA comercial. Nestes experimentos foram utilizados a mesma concentração de proteína ($3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e massa de adsorvente ($50 \pm 0,02 \text{ mg}$), sendo o tempo, a variável durante as repetições e o pH, a variável entre os tratamentos. Logo que o tempo de contato entre adsorbato e adsorvente era atingido, empregava-se a centrifugação para interromper a adsorção. Uma alíquota do sobrenadante era então coletada e a leitura realizada no espectrofotômetro. Por meio dos testes, observou-se que praticamente todo processo adsorptivo ocorria logo nos primeiros minutos. Portanto, o experimento foi estruturado com intervalos de coleta e leitura de 1 em 1 minuto para os primeiros 5 minutos, sendo a primeira leitura realizada logo que as proteínas eram colocadas em contato com o adsorvente. Em seguida, aumentaram-se os intervalos para 10 minutos até completar uma hora. Como não foi observada grande variação após esse tempo, o intervalo de leitura de absorvância foi estendido para 30 minutos até atingir 180 minutos.

Outro ponto avaliado durante os testes foi a concentração do tampão fosfato de sódio a ser utilizado. Primeiramente, a concentração testada foi de $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, porém, a massa de proteínas adsorvida foi baixa. O mesmo comportamento foi observado por Yin et al., (2002). Esses autores relatam que o aumento da concentração do tampão fosfato acarreta em maior quantidade do íon PO_4^{3-} na interface da HA, esse íon tem maior afinidade ao adsorvente comparado às proteínas, o que acarreta redução da adsorção. Portanto, foram realizados testes com o mesmo tampão, porém, em concentrações reduzidas. Observou-se uma melhoria na adsorção para a concentração de $0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Este valor superou inclusive o teste com ausência total fosfato de sódio, o que demonstra a necessidade da presença de íons para que a adsorção se desenvolva. Provavelmente, o efeito “*salting in*”, ou seja, formação de um gradiente de íons na interface da proteína e/ou do adsorvente contribua para a adsorção.

A **Figura 20** apresenta o comportamento cinético de adsorção das proteínas ALA e BLG comerciais nas HAs comercial e sintetizada. É possível observar que a adsorção atinge o

platô em menos de 20 minutos para todos os tratamentos. Esse é um resultado satisfatório, uma vez que, uma das características desejáveis para um bom adsorvente é sua rápida interação com o adsorbato. Em relação à capacidade de adsorção ($q_C \rightarrow$ mg de proteína/ g de HA), os experimentos em pH 6,0 foram os que apresentaram melhores resultados para ALA. No caso da BLG, os maiores valores de q_C foram observados para os valores de pH 3,4 e 6,0. A proximidade do pH isoeletrico reduz a carga líquida negativa na superfície da proteína, e consequentemente, reduz a repulsão eletrostática entre as proteínas e a HA em pH 6,0. O pH 3,4 é inferior ao pI da proteína, portanto, a carga líquida é positiva na superfície da BLG, o que favorece a interação com HA que apresenta carga elétrica negativa em toda a faixa de pH avaliada. No entanto, a ALA neste pH, encontra-se desnaturada, o que aumenta sua liberdade conformacional, podendo assim, ocupar mais sítios de adsorção reduzindo assim, a q_C (KAMAU et al., 2010). Estas informações são fundamentais na definição das condições para os experimentos de equilíbrio, uma vez que, determinam o tempo de contato e a massa de HA necessária para adsorver a proteína.

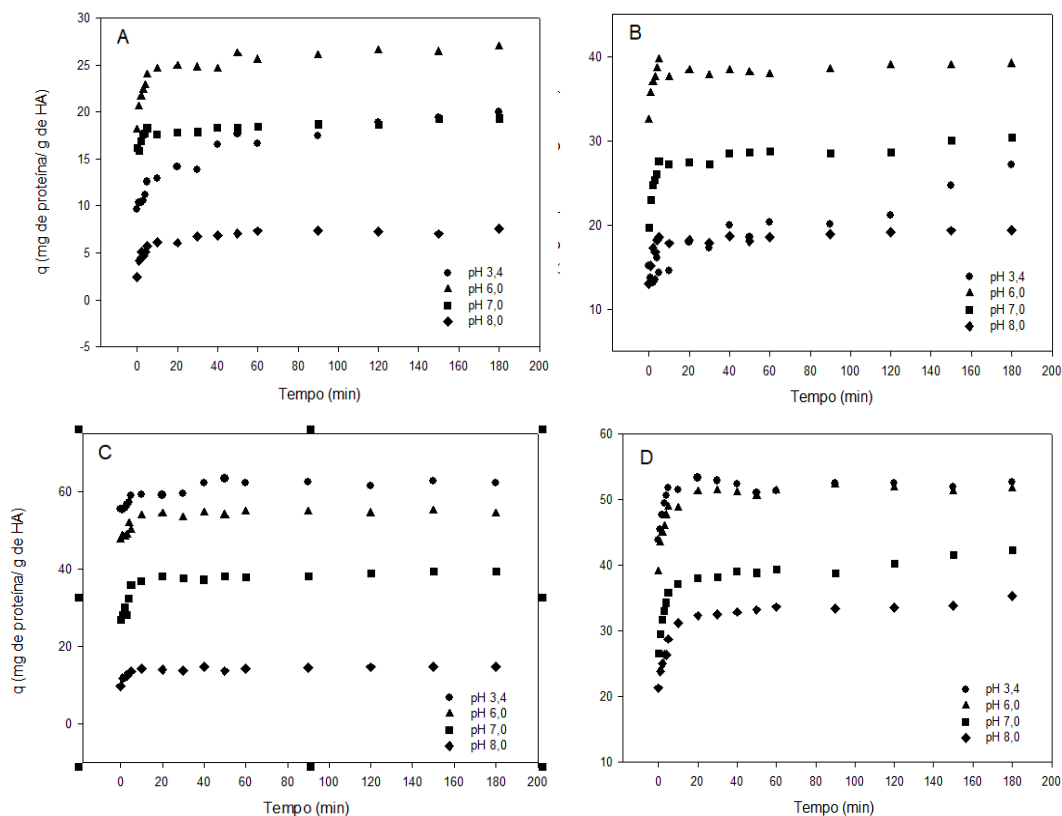


Figura 20 - Cinética de adsorção em pH 3,4; 6,0; 7,0 e 8,0: A \rightarrow ALA em HA sintetizada; B \rightarrow ALA em HA comercial; C \rightarrow BLG em HA sintetizada; D \rightarrow BLG em HA comercial.

Observa-se que sob condições semelhantes, a adsorção de BLG é mais favorável que a da ALA. Este mesmo comportamento foi observado por (TERCINIER et al., 2013). Como comentado no tópico que abordou o comportamento do potencial Zeta em função do pH, a adsorção das proteínas em HA é fortemente influenciada por interações eletrostáticas. No entanto, este não é o único fator que afeta a adsorção. A concentração, formato, tamanho e perfil de resíduos de aminoácidos na interface das proteínas, a ocorrência de outros tipos de interação (dipolos, Vander Walls, hidrofóbicas) e possíveis rearranjos na estrutura terciária da proteína podem facilitar ou tornar-se um empecilho à adsorção (HO, 2006; NAKANISHI; SAKIYAMA; IMAMURA, 2001; RABE; VERDES; SEEGER, 2011). Neste caso específico, a redução da qC para a ALA possivelmente ocorreu devido a maior liberdade conformacional dessa proteína quando comparada à BLG. Alterações estruturais na ALA permitem que ela tenha acesso a mais sítios de adsorção, o que leva à saturação da superfície da HA com uma quantidade menor de proteína adsorvida (MAGESTE, 2012).

Para entender melhor a cinética de adsorção de ALA e BLG comerciais nas HAs, as equações linearizadas dos modelos de pseudo-primeira ordem, pseudo-segunda ordem e difusão intraparticular apresentadas no item 3.5.2 foram ajustadas para todos os tratamentos. O modelo de pseudo-segunda ordem foi o que melhor se ajustou aos dados em todas as condições testadas apresentando os maiores coeficientes de determinação (R^2) (**Tabela 8**). Além disso, os resultados para a análise de variância da regressão para os parâmetros do modelo foram significativos (p -valor $< 0,01$) para todos os tratamentos.

O modelo de pseudo-primeira ordem trata de fisissorção, enquanto o modelo de difusão de partículas é adequado aos processos em que o adsorvente é um material poroso e a etapa de difusão das partículas pelos poros é determinante ao processo de adsorção (MAHDI et al., 2016; TADINI et al., 2016). Outros trabalhos na literatura tentaram ajustar os modelos de primeira ordem e de difusão de partículas à adsorção de proteínas sem sucesso (CRISTINA et al., 2017; LAFETÁ JUNIOR, 2014; MAHDI et al., 2016). A equação de pseudo-segunda ordem é aplicada com bons ajustes à adsorção de íons metálicos, íons bivalentes, corantes, herbicidas, óleos e substâncias orgânicas em soluções aquosas. Além disso, esse modelo é utilizado para descrever processos que envolvam quimissorção, como, as interações eletrostáticas e trocas iônicas (HO, 2006). A quimissorção ocorre apenas na primeira camada de elétrons adsorvidas na superfície do adsorvente, podendo ser seguida de fisissorção em camadas adicionais (TADINI et al., 2016).

A equação linearizada (**Eq. 8**) descreve o comportamento do modelo de pseudo-segunda ordem. Os dados de t/q versus t apresentaram um comportamento linear para todas as condições testadas (**Figura 21**). A massa de proteína adsorvida por grama de HA (qC) foi obtida matematicamente por meio do coeficiente angular $\left(\frac{1}{qC}\right)$. O valor para a constante cinética do modelo (K_2) foi obtida por meio do coeficiente linear das curvas $\left(\frac{1}{K_2 \cdot qC^2}\right)$.

$$\frac{1}{[qC - q(t)]} = \left(\frac{1}{K_2 \cdot qC^2}\right) + \left(\frac{1}{qC}\right)t \quad \text{Eq. 8}$$

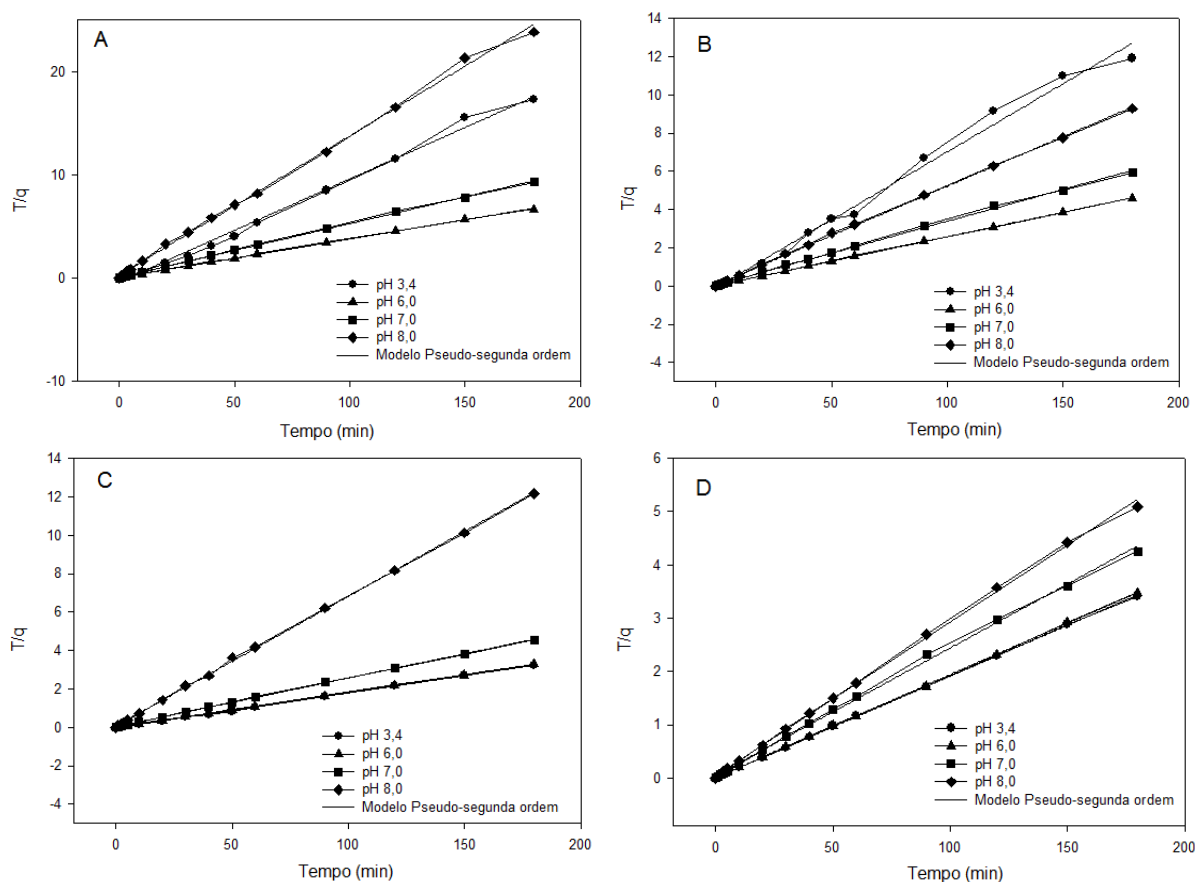


Figura 21 - Modelo linearizado pseudo-segunda ordem. A → ALA em HA sintetizada; B → ALA em HA comercial; C → BLG em HA sintetizada; D → BLG em HA comercial.

Os valores para K_2 e qC obtidos por meio do modelo podem ser observados na **Tabela 8**. Como discutido anteriormente, os baixos valores da constante K_2 reforçam que a saturação da interface do adsorvente ocorre em curto período de tempo. Os valores de qC foram similares aos resultados experimentais, em que, maiores valores são obtidos para o pH 6,0 para a ALA e pH 3,4 e 6,0 para a BLG. A grande vantagem modelo de pseudo-segunda ordem é a facilidade para obtenção desses parâmetros (K_2 e qC), que são

fundamentais no momento de se definir as condições de qualquer processo de adsorção, isso, sem a necessidade da realização de experimentos de equilíbrio (HO, 2006).

Tabela 8 - Parâmetros de ajuste do modelo de pseudo-segunda ordem aos dados dos experimentos cinéticos.

HA	Prot.	pH	Coeficientes de determinação (R ²)			qC mg de ptn .g de HA ⁻¹	K ₂ (g.mg ⁻¹ .min ⁻¹)
			Pseudo primeira ordem	Pseudo segunda ordem	Difusão entre partículas		
		3,4	0,13	0,99	0,91	10,04	0,27
	ALA	6,0	0,6	0,99	0,73	26,74	0,83
		7,0	0,51	0,99	0,74	19,19	0,94
		8,0	0,40	0,99	0,71	7,41	0,53
Sint.			3,4	0,22	0,99	0,84	55,56
	BLG	6,0	0,10	0,99	0,65	54,95	3,87
		7,0	0,65	0,99	0,65	39,37	0,94
		8,0	0,27	0,99	0,58	14,79	1,12
			3,4	0,22	0,99	0,72	14,06
	Com. ALA	6,0	0,39	0,99	0,33	39,06	2,24
		7,0	0,72	0,99	0,68	29,94	0,71
		8,0	0,50	0,99	0,52	19,34	0,96
			3,4	0,22	0,99	0,72	14,06

BLG	3,4	0,32	0,99	0,42	52,36	5,02
	6,0	0,32	0,99	0,60	51,81	3,27
	7,0	0,83	0,99	0,76	41,67	0,57
	8,0	0,70	0,99	0,744	34,60	0,72

5.2.3. Isoterma de adsorção

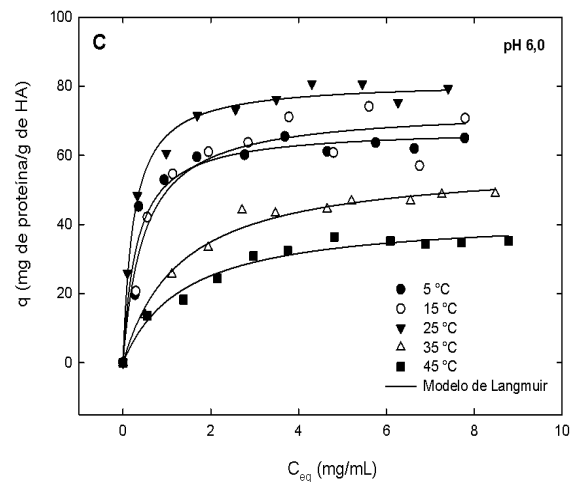
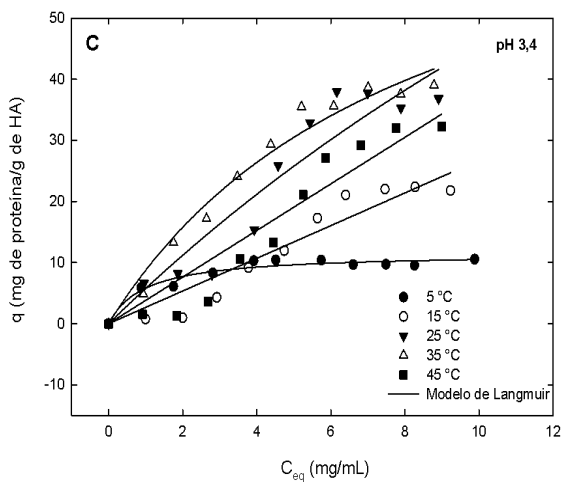
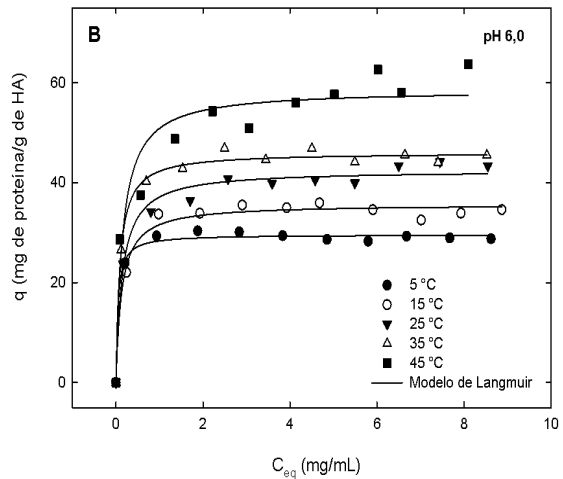
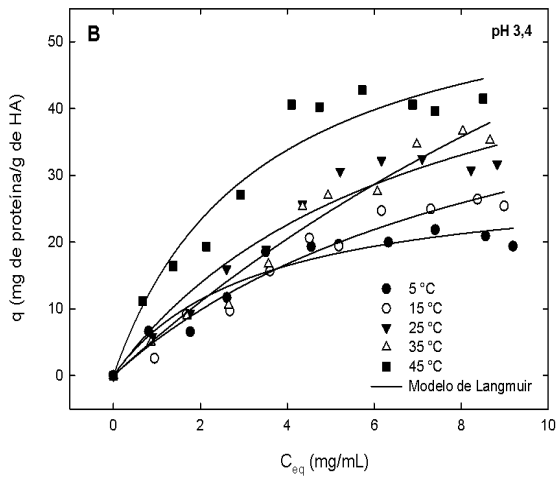
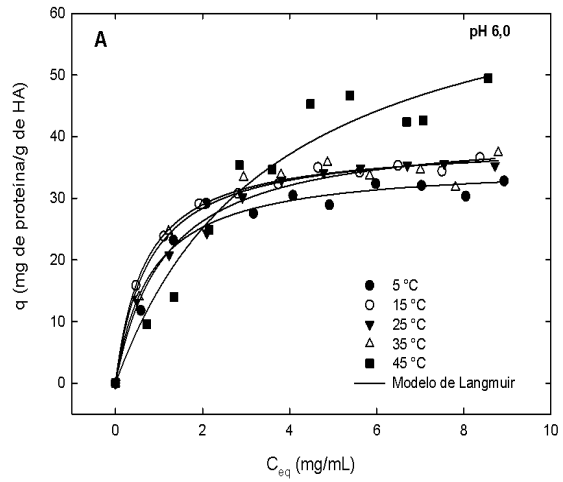
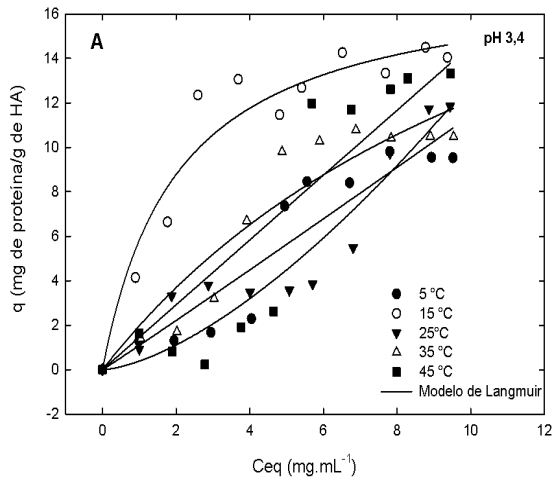
Os experimentos de equilíbrio foram realizados para a construção de isotermas que são diagramas em que variação da concentração do adsorbato no adsorvente é plotada em relação à concentração do adsorbato na fase fluida, sob condições de equilíbrio, a uma determinada temperatura. Por meio dos dados isotérmicos é possível calcular a quantidade de adsorvente e dimensionar os equipamentos necessários ao processo de adsorção (SOUSA et al., 2014).

As condições dos experimentos (pH, concentração tampão e tempo de contato) foram definidas em concordância com os resultados obtidos nos experimentos cinéticos. Portanto, os valores de pH testados foram 3,4 e 6,0 em tampão fosfato de sódio $0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. As proteínas ALA e BLG comerciais em concentrações crescentes (1 a $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) dispersas em pH adequado foram mantidas em contato com $50 \pm 0,2 \text{ mg}$ de adsorvente (HA comercial ou sintetizada) por 12 h para garantia do equilíbrio entre as fases. As temperaturas avaliadas foram 5, 15, 25, 35 e $45 \text{ }^\circ\text{C}$. A quantificação das proteínas seguiu protocolo semelhante ao utilizado nos experimentos cinéticos.

A **Figura 22** apresenta as isotermas obtidas para todos os tratamentos testados. Ao avaliar as curvas, percebe-se um acréscimo da capacidade de adsorção no equilíbrio ($q_E =$ massa de proteína mg/massa de HA em g) com o aumento da concentração de proteína na fase fluida. A alta afinidade das proteínas pelo adsorvente pode ser evidenciada pela inclinação inicial das isotermas. De acordo com o perfil apresentado, as isotermas obtidas são, predominantemente, do Tipo 1 e 2 que corresponde a adsorção em monocamada (TADINI et al., 2016).

Os modelos de Langmuir e Freundlich ajustados aos dados estão representados nas **Figuras 22 e 23**, respectivamente. Esses modelos diferem-se entre si pelo fato que Langmuir trata a adsorção de forma homogênea e a isoterma de Freundlich é uma equação empírica aplicada a processos de adsorção heterogêneos (MAHDI et al., 2016). Nas **Tabelas 9 e 10** estão

representados os parâmetros dos modelos de Langmuir e Freundlich, respectivamente, ajustados aos dados experimentais. A discussão a seguir envolverá cada condição de pH separadamente devido às diferenças observadas nos ajustes dos modelos.



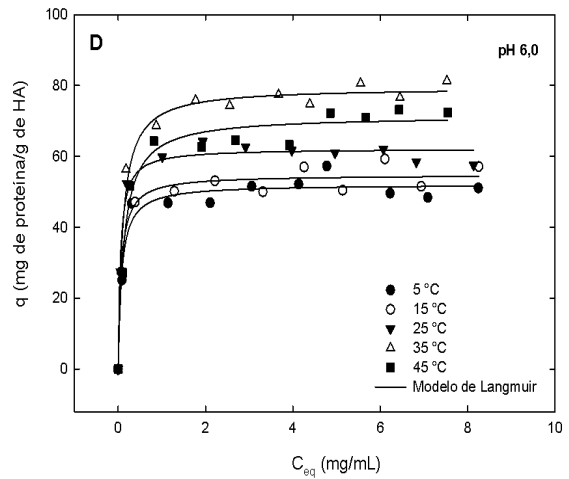
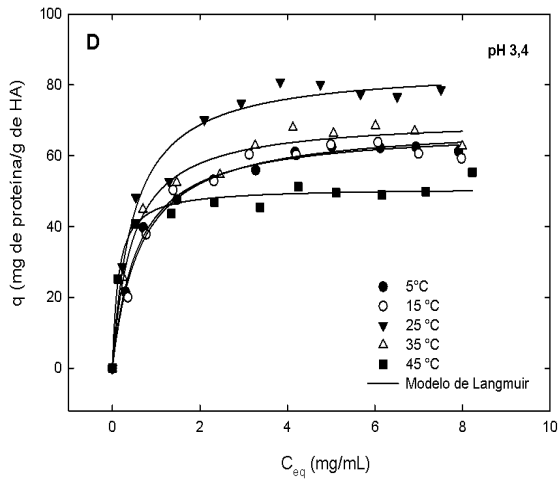
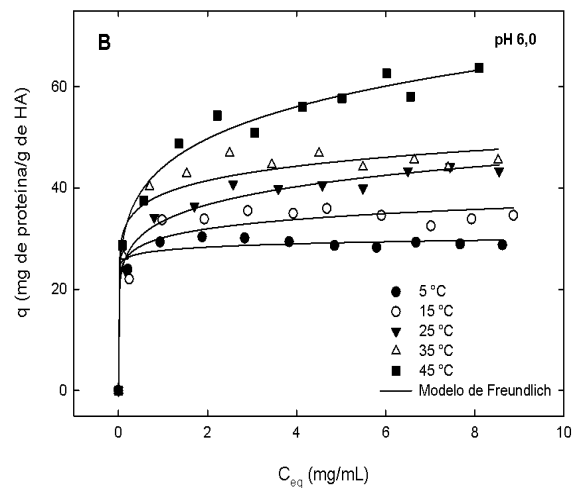
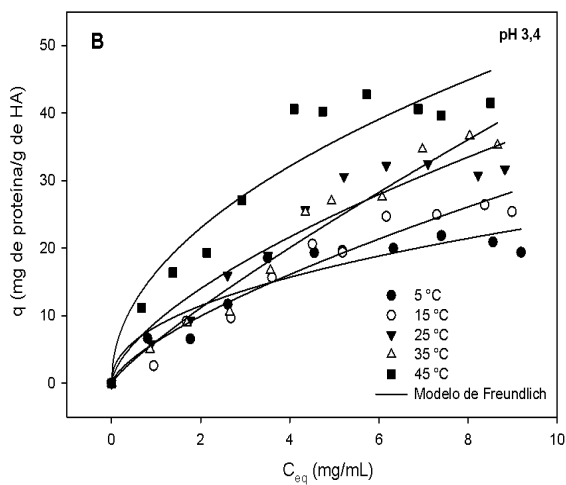
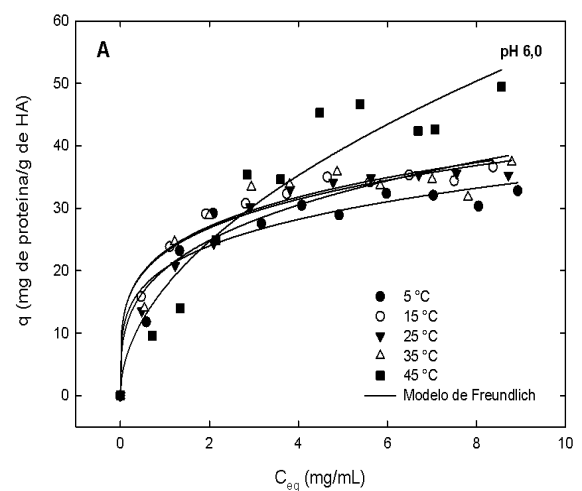
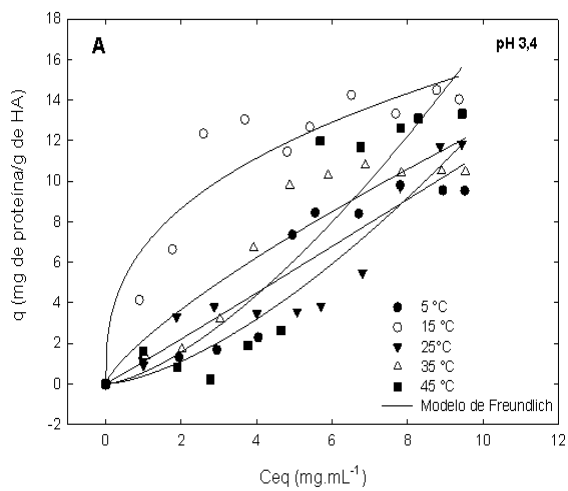


Figura 22 - Isotermas de adsorção ajustada ao modelo de Langmuir em pH 3,4 e 6,0: A → ALA em HA sintetizada; B → ALA em HA comercial; C →; BLG em HA sintetizada; D → BLG em HA comercial.



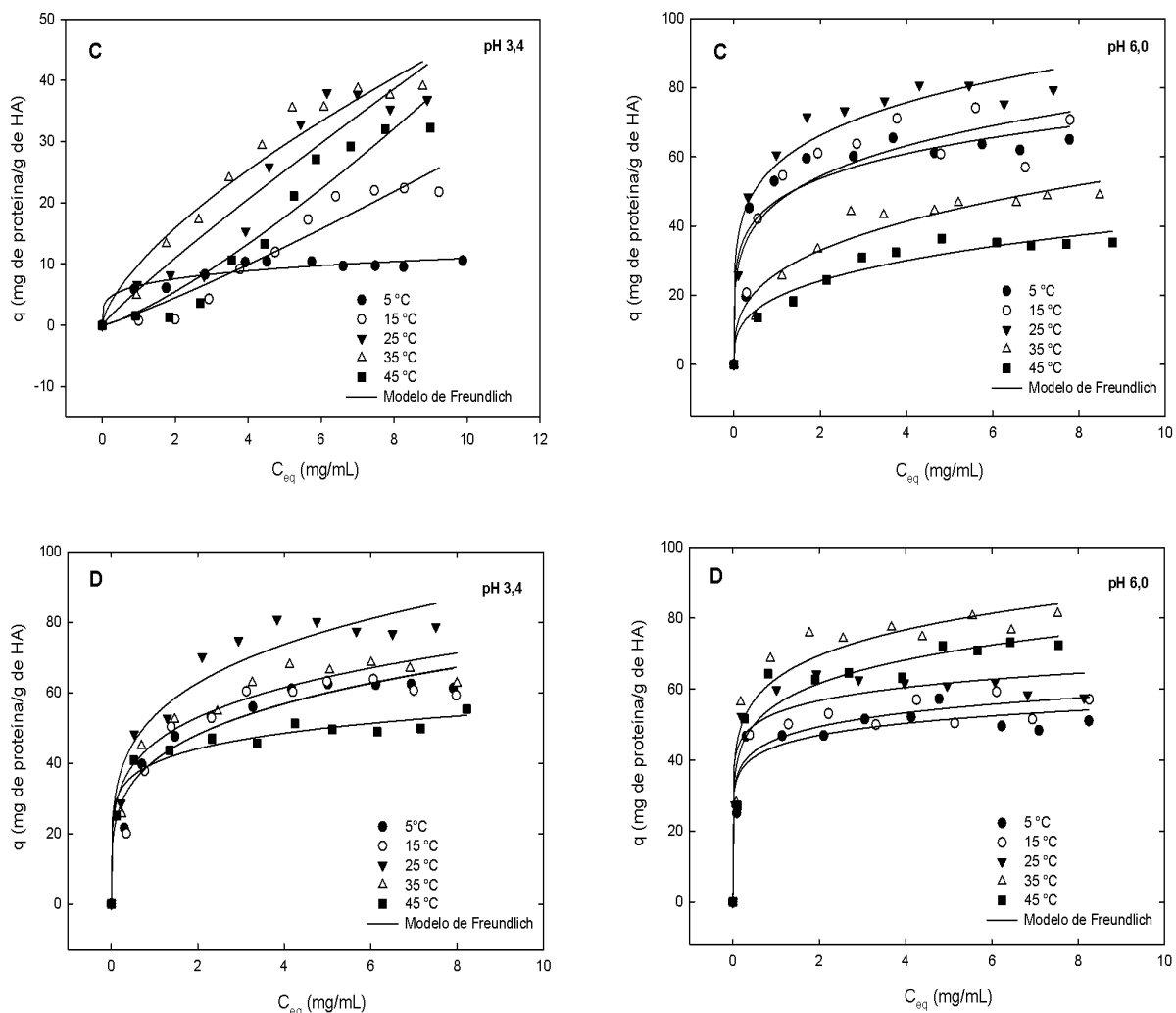


Figura 23 - Isotermas de adsorção ajustada ao modelo de Freundlich em pH 3,4 e 6,0: A → ALA em HA sintetizada; B → ALA em HA comercial; C →; BLG em HA sintetizada; D → BLG em HA comercial.

Adsorção em pH 6,0

Para esse pH, os valores dos coeficientes de determinação (R^2) foram superiores a 0,90 e as análises de variância da regressão foram significativas (p -valor < 0,05) para todos os tratamentos, tanto para o modelo de Langmuir quanto para o de Freundlich. Ademais, os maiores valores para a capacidade de máxima adsorção (q_m) também foram observados neste pH.

Em relação às proteínas, a adsorção de BLG apresentou maior q_m quando comparada à ALA para ambos os adsorventes, independente do modelo avaliado. Esse resultado vai de encontro ao que foi observado nos experimentos cinéticos. Ainda sobre a BLG, os maiores valores de q_m foram próximos para os dois adsorventes ($81,35 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ à 25°C para a HA sintetizada; e $79,41 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ à 35°C para a HA comercial). No caso da ALA, os maiores valores de q_m também foram próximos entre os adsorventes ($60,95 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ à 45°C em HA sintetizada; e $58,56 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ à 45°C para a HA comercial).

Segundo Fennema et al. (2008) a hidrofobicidade da ALA é maior que da BLG, consequência da presença do resíduo de aminoácido triptofano, portanto, a adsorção desta proteína em um adsorvente hidrofílico, como a HA, é menos favorecida. MAGESTE et al. (2012) estudaram a adsorção de ALA e BLG em nanotubos de carbono. Nesse trabalho, a q_m da ALA também foi menor e os autores atribuíram o resultado à menor rigidez conformacional da ALA quando comparada à BLG. Provavelmente, isso permite, durante a adsorção, uma maior cobertura da interface do adsorvente proveniente da maior liberdade conformacional da proteína. O que levaria à saturação da interface com uma quantidade menor de moléculas adsorvidas.

No tocante à temperatura, os maiores valores de q_m para a BLG são observados entre 25 e 35 °C. Como mencionado, a temperatura de 45 °C apresentou q_m mais elevado para a ALA para os dois adsorventes. Essa proteína tem variação de energia livre de desnaturação (ΔG_D) de 4,4 kcal·mol⁻¹, valor menor que da BLG que é de 7,6 kcal·mol⁻¹ (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2008). Possivelmente, devido ao tempo elevado de exposição a 45 °C (12 h) ocorreram alterações na conformação da proteína que levaram à exposição de resíduos de aminoácidos que normalmente não estão presentes na interface, possibilitando uma maior interação entre a proteína e o adsorvente o que levou ao aumento do valor de q_m nessa temperatura.

Adsorção em pH 3,4

Nesse pH, os modelos ajustados obtiveram coeficientes de determinação menores que 0,90 para alguns tratamentos. Além disso, para a análise de variância da regressão, alguns parâmetros não foram significativos ($\rho > 0,05$). Esse resultado dificulta a comparação entre os tratamentos, uma vez que, a informação retirada dos modelos pode não expressar realmente o processo de adsorção. O modelo de Langmuir ajustou-se somente ao tratamento em que a HA comercial adsorveu BLG. No caso do modelo de Freundlich, apenas o tratamento em que a HA sintetizada adsorveu ALA não se ajustou aos dados, para todos os outros, o coeficiente de determinação foi superior a 0,90 e os parâmetros foram significativos ($\rho < 0,05$) na análise de variância.

Apesar da falta de ajuste dos modelos no pH 3,4, as informações relativas ao q_m foram utilizados no desenvolvimento do restante do projeto. Por esse motivo, esses resultados foram mantidos no trabalho com o intuito de demonstrar como foram determinadas as condições experimentais para as etapas de separação das proteínas no soro de leite.

No geral, os valores da q_m aumentaram com o aumento de temperatura para os dois modelos ajustados. O ajuste do modelo de pseudo-segunda ordem aos dados dos experimentos

cinéticos mostrou que ocorre interação química, ou quimissorção, entre as proteínas e a HA. Nesse processo, o aumento de temperatura favorece o processo de adsorção química, enquanto a redução de temperatura favorece a adsorção física ou fisissorção (TADINI et al., 2016).

Os valores obtidos para as constantes dos modelos (k_d para o modelo de Langmuir e k para o modelo de Freundlich) em pH 6,0 foram baixos (**Tabela 9 e 10**). Isso é um indicativo que o processo de adsorção é favorável, uma vez que, observando as equações apresentadas no item 3.5.3, quanto menor o valor das constantes, maior a quantidade de proteína adsorvida. No entanto, para o pH 3,4 os valores observados são consideravelmente maiores quando comparados aos resultados obtidos em pH 6,0. Esse resultado reforça a importância da interação entre grupos carregados negativamente presentes na proteína e os sítios de adsorção da HA, apesar do adsorvente e adsorbato apresentarem carga líquida negativa em pH 6,0.

Segundo Nakanishi (2001), a temperatura afeta dois fenômenos durante a adsorção: o estado de equilíbrio entre as fases sólida e fluida e a cinética de adsorção das proteínas. Um acréscimo da adsorção é esperado quando a difusividade das proteínas é acelerada em direção à superfície do adsorvente, ou seja, com o aumento da taxa de adsorção. Isso é ocasionado pelo aumento da energia cinética das moléculas devido à elevação da temperatura. Além disso, a principal força motriz para a adsorção de proteínas em suportes sólidos é o ganho de entropia decorrente da liberação de água e de íons inicialmente adsorvidos e dos rearranjos na conformação da proteína. Como o termo entrópico aumenta com a temperatura (em módulo), espera-se com isso uma maior adsorção. Porém, a uma determinada temperatura, o equilíbrio do meio é modificado, desfavorecendo o processo de adsorção, isso vai depender tanto do adsorbato e da constituição da fase fluida quanto do adsorvente (KIM; GRITTI; GUIOCHON, 2004).

Sousa et al. (2014) realizaram experimentos isotérmicos por meio da adsorção de ALA em HA em temperaturas de 5 a 35 °C nos valores de pH 4,0; 6,0 e 8,0. Verificou-se uma tendência de aumento na q_m com a elevação da temperatura, sendo que os maiores valores foram observados a 25 °C em pH 6,0. Além disso, verificou-se que a adsorção é endotérmica, ou seja, a variação da entalpia padrão de adsorção (ΔH°_{ad}) foi positiva, e o processo entropicamente dirigido. No mesmo trabalho, concluiu-se que a variação da energia livre de Gibbs padrão para a adsorção (ΔG°_{ad}) é negativa e diminui com a temperatura, o que indica que o processo é espontâneo nas condições avaliadas e essa espontaneidade tende a aumentar com o aumento da temperatura.

Tabela 9 - Parâmetros do modelo de Langmuir para adsorção de ALA e BLG em HA comercial e sintetizada.

<u>ALA/HA sintetizada</u>															
5 °C			15 °C			25 °C			35 °C			45 °C			
pH	q _m	k _d	R ²	q _m	k _d	R ²	q _m	k _d	R ²	q _m	k _d	R ²	q _m	k _d	R ²
3,4	145,55*	120,64*	0,87	17,81	2,06	0,93	34,90*	3,15*	0,85	27,98*	13,71*	0,89	15,36*	6,07*	0,81
6,0	35,62	0,81	0,97	38,76	0,67	0,99	41,18	1,13	0,99	39,20	0,14	0,97	60,95	3,64	0,95
<u>ALA/HA comercial</u>															
3,4	29,90	3,26	0,92	56,91	9,60	0,96	61,39	6,87	0,95	139,84*	23,29*	0,97	61,77	3,31	0,94
6,0	29,60	0,04	0,99	35,67	0,12	0,98	42,47	0,14	0,98	46,01	0,08	0,99	58,56	0,15	0,9
<u>BLG/ HA sintetizada</u>															
3,4	11,53	0,98	0,94	28,04*	10,09*	0,92	194,91*	32,83*	0,90	80,80	8,25	0,97	50,52*	13,12*	0,91
6,0	67,76	0,31	0,94	73,38	0,477	0,93	81,35	0,23	0,99	57,78	1,30	0,98	42,57	1,38	0,97
<u>BLG/HA comercial</u>															
3,4	67,62	0,58	0,99	68,93	0,64	0,98	84,97	0,47	0,97	70,59	0,44	0,98	50,89	0,13	0,97
6,0	52,08	0,08	0,96	54,76	0,06	0,97	62,17	0,05	0,98	79,41	0,10	0,98	71,41	0,13	0,97

* (p-valor > 0,05); q_m → Massa de proteína (mg)/massa de adsorvente (g); k_d → constante do modelo de Langmuir;

Tabela 10 - Parâmetros do modelo de Freundlich para adsorção de ALA e BLG em HA comercial e sintetizada.

<u>ALA/HA sintetizada</u>															
	5 °C			15 °C			25 °C			35 °C			45 °C		
pH	k	n	R²	k	n	R²	k	n	R²	k	n	R²	k	n	R²
3,4	1,09*	1,02	0,87	6,72	0,36	0,89	0,38*	1,52	0,89	2,15	0,76	0,87	0,56*	1,48	0,85
6,0	20,35	0,24	0,92	23,10	0,23	0,97	30,23	0,30	0,97	32,90	0,22	0,92	37,29	0,51	0,91
<u>ALA/HA comercial</u>															
3,4	8,40	0,45	0,90	6,12	0,70	0,95	9,06	0,63	0,93	6,21	0,85	0,96	16,44	0,48	0,91
6,0	27,67	0,03	0,97	30,18	0,08	0,94	33,45	0,13	0,98	38,78	0,10	0,95	44,11	0,17	0,98
<u>BLG/ HA sintetizada</u>															
3,4	16,47	0,22	0,92	24,03	1,14	0,92	54,84	0,91	0,90	49,95	0,67	0,95	42,27	1,27	0,93
6,0	47,37	0,18	0,90	46,77	0,22	0,90	57,85	0,19	0,95	26,29	0,32	0,94	29,42	0,31	0,94
<u>BLG/HA comercial</u>															
3,4	40,70	0,24	0,95	40,69	0,24	0,92	53,37	0,23	0,94	45,66	0,21	0,95	40,01	0,13	0,97
6,0	43,85	0,10	0,91	45,82	0,11	0,94	53,22	0,09	0,90	62,87	0,14	0,93	55,57	0,14	0,93

* (p-valor > 0,05); **k** → Massa de proteína (g)/massa de adsorvente (g); **n** → constante do modelo de Freundlich;

5.3. Separação de ALA e BLG a partir do soro de leite

As proteínas ALA e BLG foram obtidas diretamente do soro de leite bovino. Processos de fracionamento de proteínas, geralmente, envolvem uma série de operações unitárias que exploram aspectos físico-químicos das proteínas com o intuito de obter a molécula de interesse ou de remover impurezas, o que acarreta aumento da fração molar/mássica da molécula desejada no meio. Para a separação de ALA e BLG utilizou-se a precipitação seletiva com citrato de sódio e ácido cítrico em pH 3,4. Para os processos de isolamento das proteínas utilizou-se a adsorção e dessorção em HA comercial e sintetizada. E por fim, para separar as proteínas dos íons presentes no tampão empregado na dessorção, utilizou-se a CEM. Foram realizadas 3 (três) repetições e os resultados das médias comparados por meio do teste t.

A quantificação das proteínas foi realizada em cromatografia líquida de alta pressão em coluna de fase reversa (HPLC-RP) segundo Xiao-yu et al. (2012). A identificação dos picos foi possível pela passagem de soluções padrão contendo apenas uma das proteínas, ALA ou BLG comerciais, na concentração de $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Um exemplo de cromatograma típico contendo as duas proteínas pode ser visto na **Figura 24**. Como observado, obteve-se boa resolução para o pico referente à proteína ALA. Entretanto, os picos referentes à BLG A e BLG B ficaram sobrepostos. As áreas de cada pico foram obtidas utilizando o artifício de estender o pico até a linha de base como pode ser observado pela linha vermelha tracejada abaixo do pico referente à BLG A. Para quantificação da BLG total foi utilizado o somatório das áreas dos dois picos referentes à BLG A e BLG B. A relação entre o valor encontrado para a área de cada pico e a concentração de proteínas foi realizada por meio de curva analítica. Todas as curvas obtidas apresentaram coeficientes de determinação (R^2) superiores a 0,99.

A **Figura 25** apresenta o diagrama de blocos com o a quantificação das proteínas (ALA, BLG A, BLG G e BLG total) em cada etapa. Além disso, podem ser visualizadas as operações unitárias e as respectivas condições empregadas. No caso do leite pasteurizado, o percentual de recuperação das proteínas é calculado em relação ao leite cru. No entanto, como o objetivo principal do trabalho é a separação das proteínas a partir do soro de leite, as demais etapas de fracionamento têm o soro como referência para o cálculo do percentual de recuperação. Com o intuito de discutir melhor os resultados, o restante deste tópico será decomposto em cada umas das operações unitárias que constituem o processo.

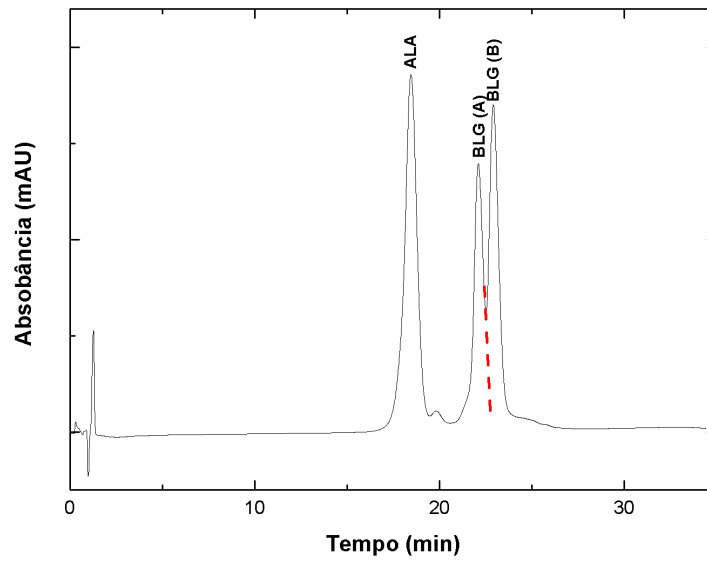


Figura 24 - Cromatograma da solução padrão contendo ALA e BLG. Coluna VP-ODS-C18 de 150 mm por 4,6 mm; Fase móvel: (A) 0,1 % de TFA em água, (B) 0,1 % de TFA em acetonitrila; 70 % A, 30 % B → 50 % A, 50 % B, de 0 → 35 min; 50 % A, 50 % B → 30 % A, 70 % B, de 35 → 37 min.

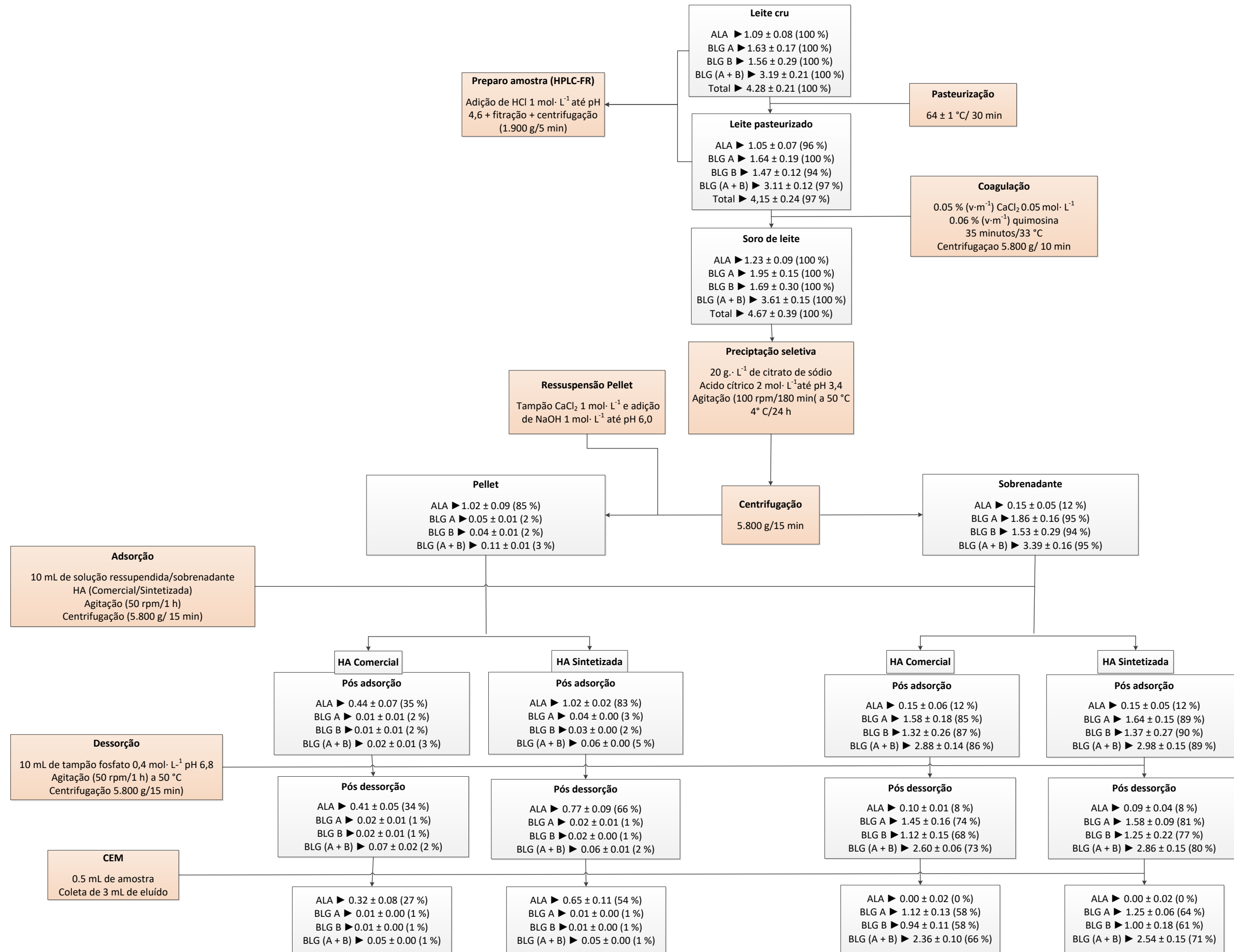


Figura 25 - Esquema geral do processo de separação das proteínas ALA e BLG.

5.3.1. Pasteurização

O leite cru integral foi pasteurizado para reproduzir as condições operacionais exigidas pela legislação (MAPA, 1996). O processamento térmico do leite é uma etapa essencial em produtos lácteos e é adotado por laticínios do mundo inteiro. O tratamento térmico no leite tem o objetivo de reduzir a carga microbiana, preparar a matéria prima para outros processos e conferir características organolépticas desejáveis ao produto (RAIKOS, 2010). Com o intuito de alterar minimamente o conteúdo e a qualidade das proteínas do leite, o método utilizado foi pasteurização lenta, que emprega uma temperatura menor e tempo de residência longo (*Low Temperature Long Time*, LTLT; 64 ± 1 °C). Os testes revelaram que durante o processo ocorria uma redução no volume de 12 % ($v \cdot v^{-1}$) devido à evaporação de água, o que gerava concentração dos sólidos lácteos. Para contornar esse problema, 1 (um) kg de leite foi pesado antes e depois da pasteurização. A diferença de peso foi corrigida com água destilada e pasteurizada.

Para quantificar as proteínas antes e após a pasteurização, uma alíquota foi tomada e o pH reduzido para 4,6 com HCl $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ para precipitar as caseínas. Neste procedimento as proteínas do soro permanecem dispersas na fase fluida (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006). A gordura residual foi removida por centrifugação (1.900 g/5 min). O cromatograma do leite cru pode ser visto na **Figura 26**.

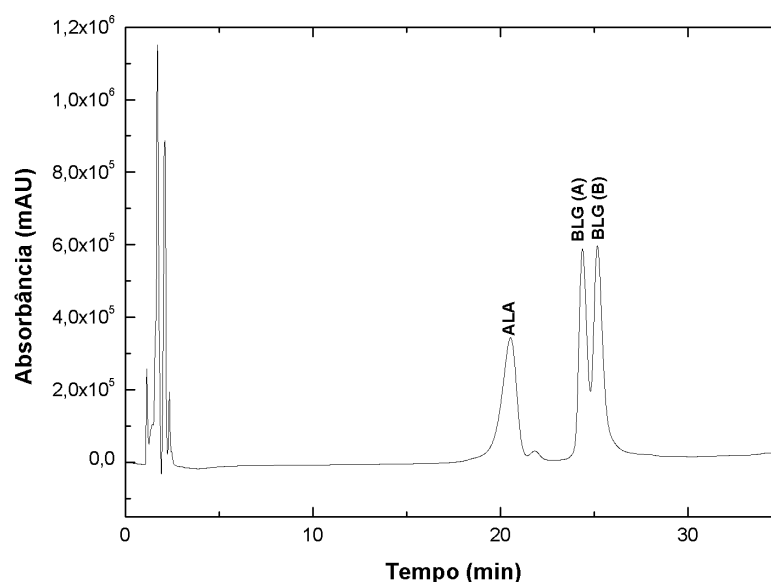


Figura 26 - Cromatograma do leite cru. Coluna VP-ODS-C18 de 150 mm por 4,6 mm; Fase móvel: (A) 0,1 % de TFA em água, (B) 0,1 % de TFA em acetonitrila; 70 % A, 30 % B → 50 % A, 50 % B, de 0 → 35 min; 50 % A, 50 % B → 30 % A, 70 % B, de 35 → 37 min.

A quantificação das proteínas pode ser visualizada na **Figura 27**. As concentrações de ALA e BLG total no leite cru estão de acordo com Raikos, 2010 e Walstra; Wouters; Geurts, (2006). Os resultados observados para o leite pasteurizado não apresentaram diferença significativa com o leite cru (p -valor $> 0,05$). A desnaturação, associada à interação entre proteínas globulares e outras moléculas presentes no leite são frequentemente relacionadas à redução no conteúdo/disponibilidade proteico após a pasteurização (FOX, 2001). Alguns fatores podem ter dificultado a detecção de redução no conteúdo das proteínas após a pasteurização, como: o método aplicado para pasteurizar o leite, o pH e a desnaturação reversível das proteínas.

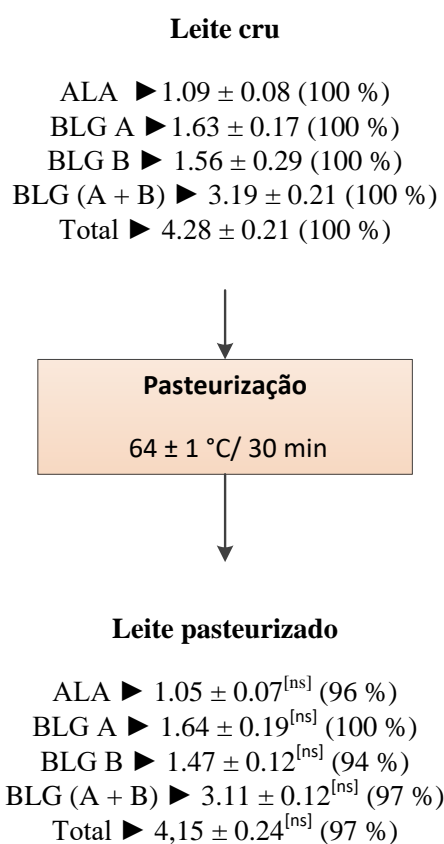


Figura 27 - Quantificação das proteínas ALA e BLG da pasteurização do leite. [ns] (p -valor $> 0,05$) em relação ao leite cru.

Segundo Raikos (2010) em temperaturas acima de 65 °C, as proteínas do soro desnaturam e são capazes de interagir entre elas e com outras moléculas presentes no leite. Essa interação é devida, principalmente, à exposição de grupos hidrofóbicos normalmente empacotados no interior da molécula. No caso da BLG, um tipo de interação irreversível comum no leite, deve-se à exposição de grupos -SH em temperaturas superiores a 70 °C, que

possibilita a formação de ligações dissulfeto com outras moléculas presentes no meio, principalmente caseínas (WIJAYANTI; BANSAL; DEETH, 2014).

Além da faixa de temperatura mais amena na pasteurização, em valores de pH acima de 6,60, a maioria dos agregados de proteínas do soro se localizam na fase solúvel (PESIC et al., 2014; RAIKOS, 2010). Como o pH do leite utilizado teve média de $6,75 \pm 0,02$ e as proteínas globulares foram quantificadas no soro após a precipitação das caseínas, possivelmente, mesmo ocorrendo a formação de agregados, estes foram quantificados durante a HPLC-RP.

Por último, a desnaturação de proteínas globulares monoméricas de baixa massa molecular, como ALA e BLG, pode ser reversível. Além disso, essas proteínas passam por diferentes estágios de desnaturação que afetam sua agregação e permitem retomar sua estrutura nativa e permanecer dispersa no leite sem interagir com outras moléculas (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2008).

5.3.2. Obtenção do soro de leite

O soro de leite doce foi obtido por meio de coagulação enzimática. Ao leite pasteurizado foi adicionado cloreto de cálcio (0,05 % v/m) e, logo em seguida, a enzima quimosina (EC 3.4.23.4; 0,06 % v·m⁻¹). O recipiente foi então coberto com filme plástico para evitar evaporação de solvente durante a coagulação. O corte da massa foi realizado com o devido cuidado para que as arestas dos cubos de coágulo apresentassem tamanho médio de 1 (um) cm. Movimentos suaves e contínuos foram realizados para auxiliar na expulsão do soro do interior dos grãos por cerca de 45 minutos. Em seguida, o material foi filtrado em algodão. Ao final da filtração foram coletados 830 g de soro com $7,5 \pm 0,3$ °Brix. A partir do Brix inicial do leite, $11,8 \pm 0,4$, foi possível estimar o extrato seco da massa do queijo em 33 % (m·m⁻¹) por meio de balanço de massa. Queijos com esse conteúdo de sólidos são classificados como “Queijos de muita alta umidade” (MAPA, 1996). O cromatograma para o soro de leite pode ser observado na **Figura 28**.

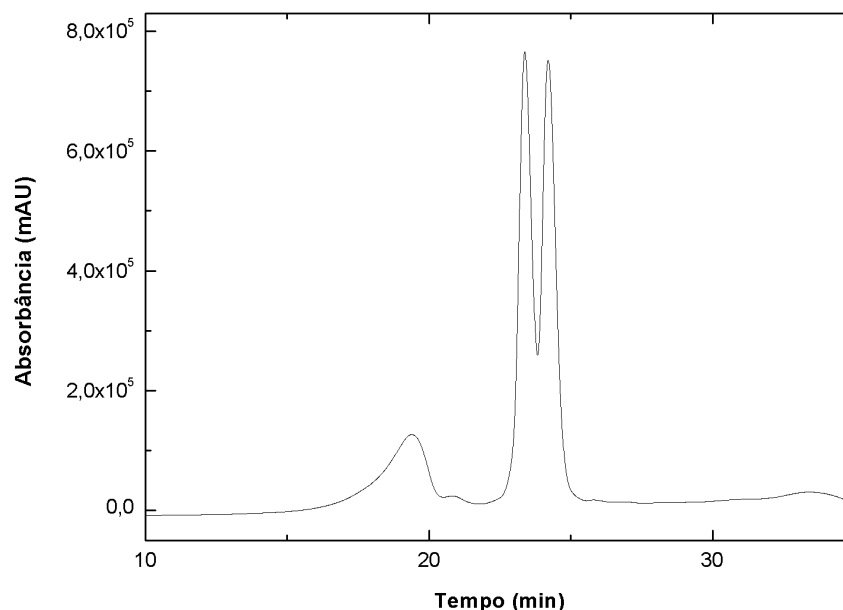


Figura 28 - Cromatograma do soro de leite. Coluna VP-ODS-C18 de 150 mm por 4,6 mm; Fase móvel: (A) 0,1 % de TFA em água, (B) 0,1 % de TFA em acetonitrila; 70 % A, 30 % B → 50 % A, 50 % B, de 0 → 35 min; 50 % A, 50 % B → 30 % A, 70 % B, de 35 → 37 min.

A **Figura 29** apresenta a quantificação das proteínas ALA e BLG antes e após o processo de coagulação. Como pode ser observado ocorreu aumento da concentração das proteínas no soro de leite. ALA e BLG são proteínas que permanecem dispersas na fase aquosa do leite durante a fabricação queijo (FOX, 2001; FOX et al., 2004; PESIC et al., 2014; RAIKOS, 2010; WIJAYANTI; BANSAL; DEETH, 2014). Como a massa de soro de leite é menor que a do leite antes da coagulação, ocorre aumento da concentração dessas proteínas. O balanço de massa revelou que cerca de 5 % (m/m) das proteínas ficaram retidas na massa do queijo. A baixa retenção da ALA e BLG na massa do queijo reforça que a interação entre essas proteínas e as outras moléculas presentes no leite, principalmente caseínas, foi baixa.

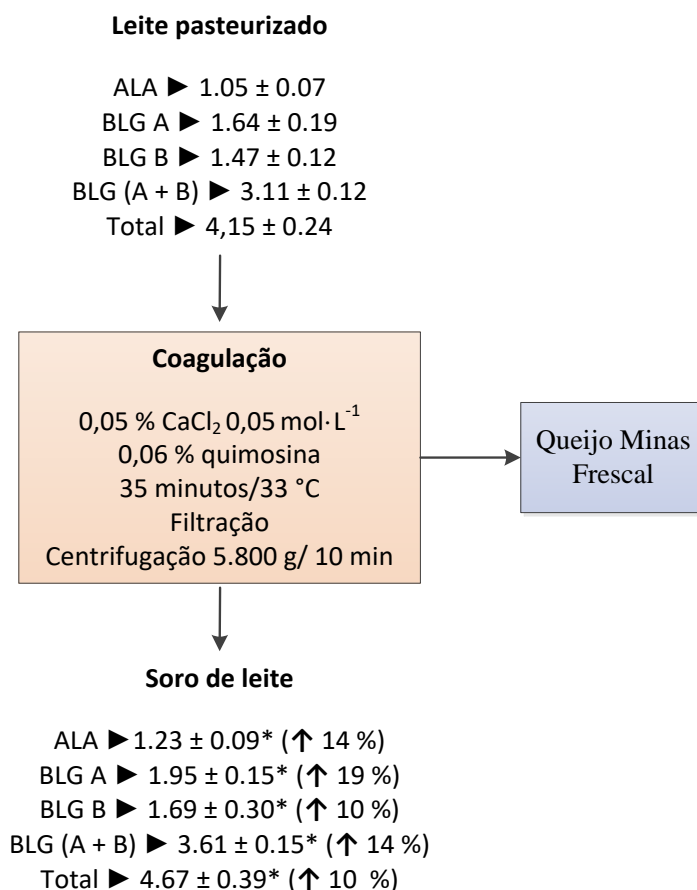


Figura 29 - Quantificação das proteínas ALA e BLG da obtenção do soro de leite. * → (p -valor < 0,05) em relação ao leite pasteurizado. (↑) aumento da concentração de proteína.

5.3.3. Precipitação seletiva

A precipitação seletiva foi empregada com a finalidade de separar as proteínas ALA e BLG presentes no soro de leite. Os testes iniciais seguiram rigorosamente o protocolo sugerido por Toro-sierra; tolkach; kulozik (2013) que utilizaram a concentração de $60 \text{ g} \cdot \text{L}$ de citrato de sódio no soro de leite e ácido cítrico $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ para reduzir o pH para 3,4. Porém, foi verificado que a quantidade de citrato empregada praticamente impedia completamente a adsorção das proteínas em HA. Portanto, realizou-se testes com uma concentração menor de citrato, $10 \text{ g} \cdot \text{L}$, no entanto, formou-se uma quantidade muito pequena de precipitado em comparação ao teste anterior. Assim, aumentou-se a concentração para $20 \text{ g} \cdot \text{L}$ e a quantidade de precipitado, aparentemente, foi semelhante à encontrada no primeiro teste.

Os cromatogramas da fase fluida e do precipitado após ressuspensão podem ser observados na **Figura 30**.

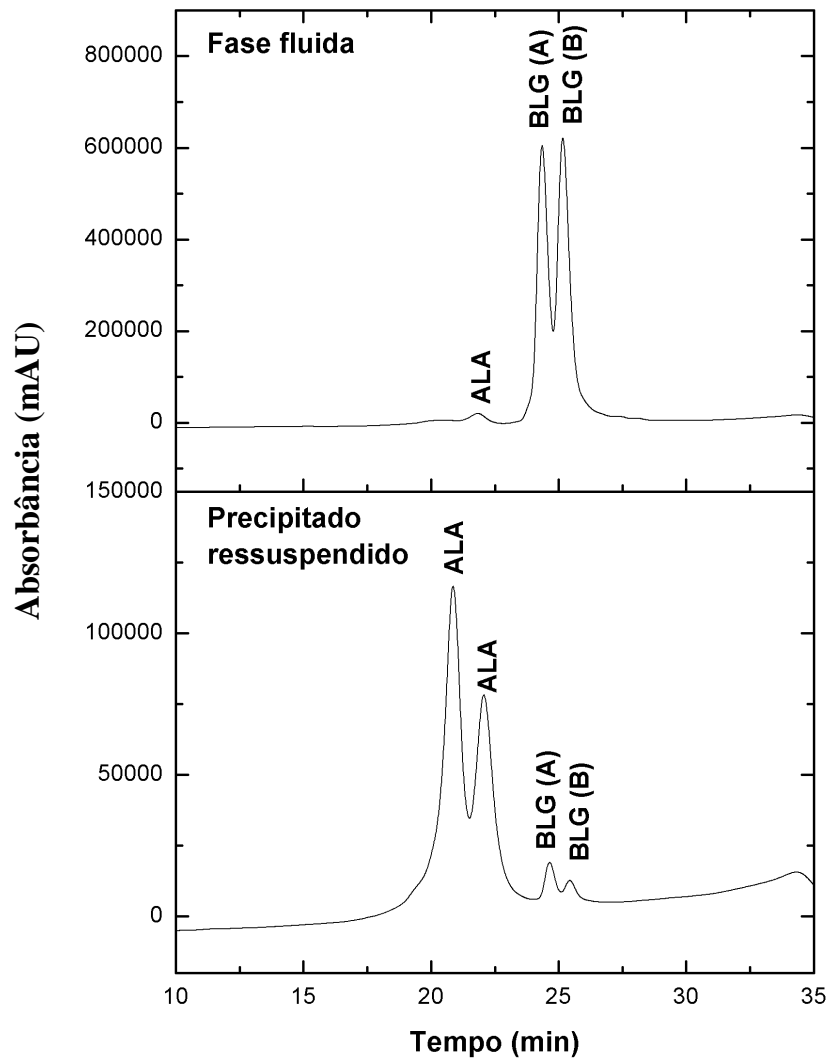


Figura 30 - Cromatograma da fase fluida e precipitado ressuspensionado. Coluna VP-ODS-C18 de 150 mm por 4,6 mm; Fase móvel: (A) 0,1 % de TFA em água, (B) 0,1 % de TFA em acetonitrila; 70 % A, 30 % B → 50 % A, 50 % B, de 0 → 35 min; 50 % A, 50 % B → 30 % A, 70 % B, de 35 → 37 min.

Assim, procedeu-se a quantificação das proteínas em HPLC-RP para a concentração de citrato de $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e os resultados podem ser observados na **Figura 31**. A diferença de concentração das proteínas ALA e BLG entre o soro e as fases obtidas após a precipitação foram significativas (p -valor $< 0,05$). Como pode se visto, a relação ALA/BLG aumentou de 0,34 no soro para 9,27 no precipitado ressuspensionado. Para a relação BLG/ALA, houve um aumento de 2,93 no soro para 22,6 na fase fluida. Em conjunto com os cromatogramas apresentados na **Figura 30**, estes resultados comprovam que ocorreu a separação das proteínas submetidas ao procedimento empregado. O rendimento é outro ponto a destacar, visto que foi possível uma recuperação acima de 80 % e 90 % ($\text{m}\cdot\text{v}^{-1}$) para ALA no precipitado ressuspensionado e para a BLG na fase fluida, respectivamente, em relação ao soro

de leite. Portanto, a concentração de citrato utilizada foi adequada ao processo de separação das proteínas.

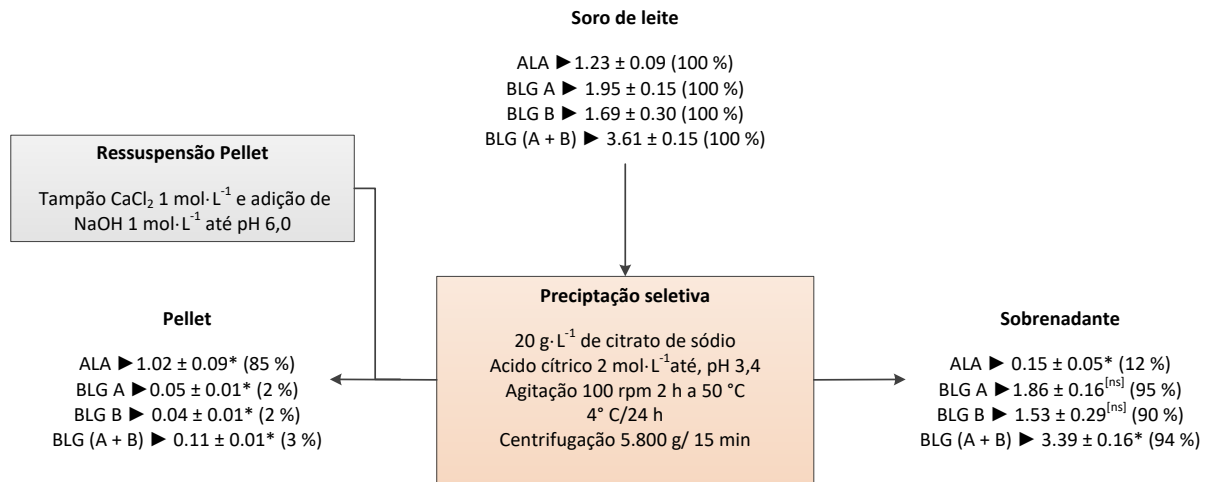


Figura 31 - Quantificação das proteínas ALA e BLG na precipitação seletiva. [ns] → (p-valor > 0,05) em relação ao soro de leite. * → (p-valor < 0,05) em relação ao soro de leite.

Apesar da redução da quantidade de citrato, em relação ao artigo do qual foi baseada a precipitação seletiva, os resultados obtidos foram semelhantes (TORO-SIERRA; TOLKACH; KULOZIK, 2013). Esse resultado deve-se ao fato dos autores terem utilizado isolado proteico de soro (WPI) a uma concentração de 15 % (m·v⁻¹). Nesse caso, a concentração das proteínas foi muito superior àquela utilizada neste experimento, em que, a separação das proteínas ocorreu a partir do soro de leite sem qualquer etapa de concentração precedente.

Em relação as variantes A e B da BLG, a menor concentração dessas proteínas em solução e o elevado desvio padrão, não permitiu observadas diferenças significativas (p-valor > 0,05) na concentração entre o soro de leite e a fase fluida após a precipitação com citrato. No entanto, verifica-se a tendência à redução do conteúdo dessas proteínas após a precipitação.

O efeito desnaturante do citrato sobre a ALA é devido à ação quelante sobre o íon cálcio, presente no interior da molécula. A ausência do íon promove uma alteração na conformação da proteína da sua forma nativa para outra estrutura que os autores denominam de *apo-ALA* (sem Ca²⁺), que tem baixa estabilidade térmica e possibilita a formação de agregados em temperaturas acima de 40 °C (EUGENIA LUCENA et al., 2007). O tamanho desses agregados pode atingir até 10 µm após 24 h a 4 °C (BRAMAUD; AIMAR; DAVEE, 1997; TORO-SIERRA; TOLKACH; KULOZIK, 2013).

No presente estudo a redução da estabilidade da ALA pôde ser evidenciada por meio da formação dos precipitados. Além disso, indícios de alteração na conformação da ALA,

mesmo após a ressuspensão, puderam ser observados devido à deformação e deslocamento da posição dos picos nos cromatogramas. Esses desvios ocorrem por alterações no tamanho e forma e pela desnaturação das proteínas (HOSSAIN; DO, 1992; PINTO; FREY, 2015). Nas condições estudadas não foi possível perceber perda de estabilidade ou indício de alteração na conformação da BLG. O mesmo comportamento foi observado por Bramaud; Aymar; Daufin, (1997) e Toro-Sierra; Tolkach; Kulozik, (2013).

5.3.4. Adsorção de BLG da fase fluida

Essa etapa teve como objetivo isolar a BLG dos compostos em solução como minerais, lactose e da ALA residual presente na fase fluida após a precipitação. Nos testes iniciais, ajustou-se o pH da solução de 3,4 para 6,0, condição em que os modelos isotérmicos obtiveram melhor ajuste, porém, a capacidade de adsorção (q) das HAs reduziu em mais de 90 % em relação aos resultados obtidos nas isotermas. Isso foi devido à excessiva quantidade de NaOH necessária para elevar o pH, o que, provavelmente, aumentou a força iônica do meio a um nível que prejudicou a adsorção. Assim, o pH foi mantido em 3,4 e a quantidade de adsorvente foi definida segundo parâmetros isotérmicos obtidos nessa condição.

As isotermas de Freundlich a 25 °C se ajustaram melhor aos dados e, portanto, os parâmetros obtidos por esse modelo foram utilizados para o cálculo da quantidade de adsorvente. Para a HA comercial, o valor da capacidade de adsorção máxima (q_m) obtida na isoterma para a BLG foi de 54,84 mg de ptn·g⁻¹ de HA, e para a HA sintetizada a q_m foi de 53,37 mg de ptn·g⁻¹ de HA. O volume de sobrenadante ficou definido em 10 mL. Como a concentração média de BLG foi de cerca de 3,5 mg·mL⁻¹, a massa calculada de adsorvente foi de 750 mg. O tempo de contato foi definido segundo os experimentos cinéticos em 1 h. A **Figura 32** apresenta os resultados obtidos na quantificação das proteínas.

Os resultados comprovaram que o modelo de Freundlich não é adequado para explicar a adsorção na condição de pH 3,4. O rendimento observado após a adsorção foi cerca de 50 % ($m \cdot m^{-1}$) abaixo do calculado pelas isotermas para os dois adsorventes. Assim, para aumentar o rendimento final, realizou-se duas adsorções (Adsorção 1 e 2). Após a Adsorção 1, 46 e 62 % ($m \cdot m^{-1}$) de ALA e BLG não foram adsorvidos pela HA comercial, enquanto, 40 e 56 % ($m \cdot m^{-1}$) não foram adsorvidos pela HA sintetizada, sendo a diferença de adsorção entre elas significativa (p -valor < 0,05). O resultado final, após a Adsorção 2, foi a adsorção total de ALA para as duas HAs e 85 % e 88 % ($m \cdot m^{-1}$) de adsorção de BLG para a HA comercial e sintetizada, respectivamente. Observando o processo como um todo (Adsorção 1 e 2) não houve diferença significativa (p -valor > 0,05) na recuperação de BLG entre as HAs.

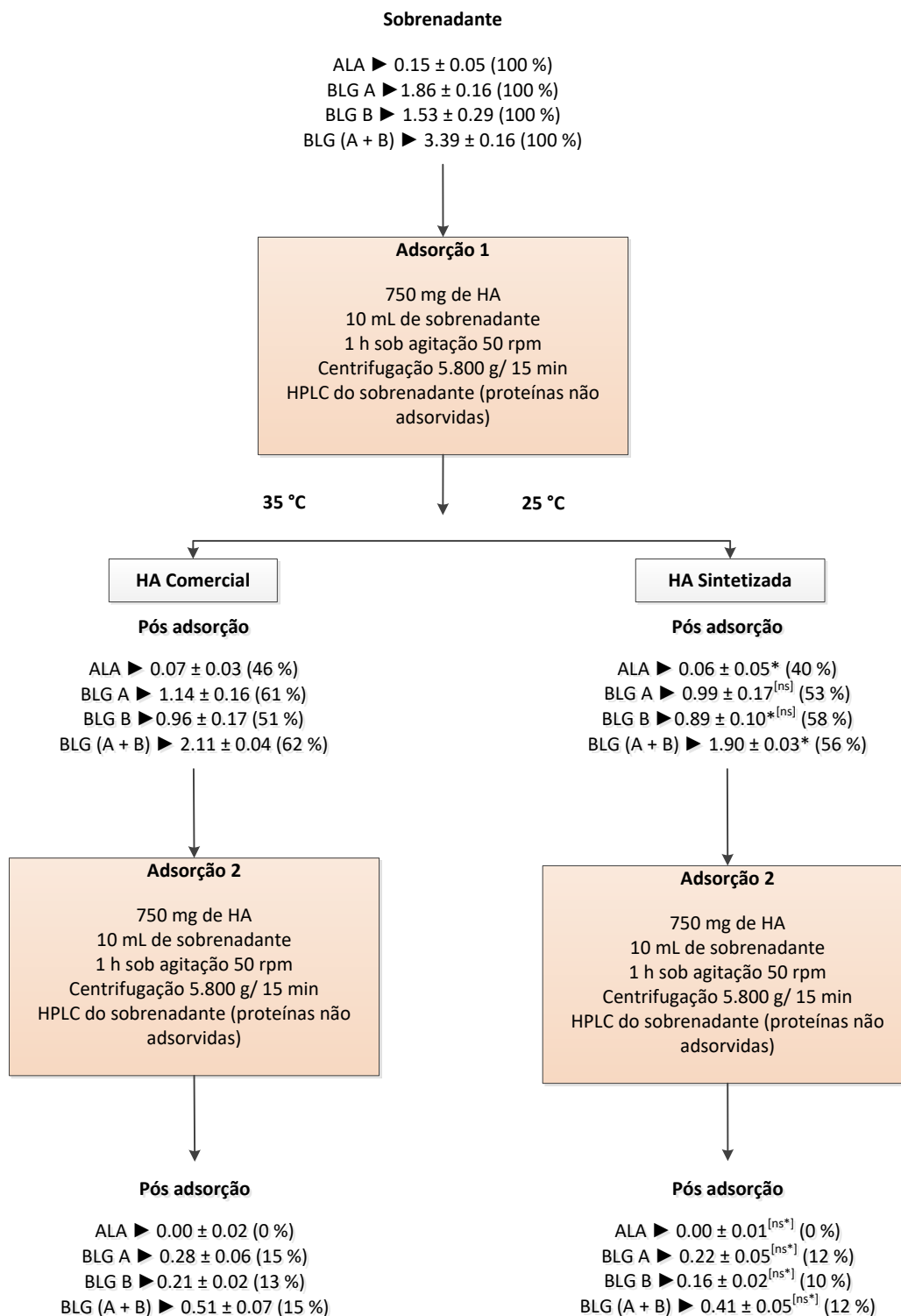


Figura 32 - Quantificação de ALA e BLG para o processo de adsorção em HAc com e HASint. * → (p-valor < 0,05) em relação ao sobrenadante da adsorção 1 de HAc com. ** → (p-valor < 0,05) em relação ao sobrenadante da adsorção 2 de HAc com. [ns] → (p-valor > 0,05) em relação ao sobrenadante da adsorção 1 de HAc com. [ns*] → (p-valor > 0,05) em relação ao sobrenadante da adsorção 1 de HAc com.

A diferença entre os resultados observados e o valor calculado por meio das isotermais, também, pode ser atribuída à presença dos compostos solúveis na fase fluida, principalmente,

lactose e minerais do soro de leite e do citrato adicionado durante a etapa de precipitação (BRAMAUD; AIMAR; DAUFIN, 1997; TORO-SIERRA; TOLKACH; KULOZIK, 2013). Provavelmente, estes componentes promovam uma competição e/ou interferência que é desfavorável à ligação da BLG aos sítios de adsorção da HA. Segundo Geankopolis (1993) sempre que a complexidade de um sistema adsortivo aumenta, a dinâmica global de equilíbrio do processo (transferência de moléculas entre as fases) se torna mais imprevisível.

5.3.5. Adsorção do precipitado ressuspenso

Juntamente com a ALA, outras proteínas (BSA, Igs, entre outras) também podem sofrer desestabilização e agregação nas condições empregadas durante a precipitação. Além disso, mesmo que em baixa concentração, foi possível verificar a presença de BLG no precipitado. Portanto, a etapa de adsorção do precipitado ressuspendido teve como finalidade isolar a ALA.

A ressuspensão do precipitado foi realizada em tampão CaCl_2 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e o pH ajustado para 6,0 com NaOH $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Tanto a concentração do tampão quanto da solução NaOH foram reduzidas pela metade quando comparados ao sugerido por Toro-Sierra; Tolkach; Kulozik, (2013). Os autores, como já mencionado acima, utilizaram uma dispersão com 15 % de WPI ($\text{m}\cdot\text{v}^{-1}$), portanto, obteve-se uma quantidade maior de precipitado de ALA, o que levou ao uso de um tampão com concentração mais elevada. A redução da concentração da solução de NaOH foi necessária porque o pH mudava bruscamente ao adicionar um pequeno volume de álcali. Após ajuste do pH, o material era mantido sob agitação (100 rpm) até a completa dispersão da proteína (cerca de 4 h), verificada por ausência de partículas proteicas em suspensão.

Os dois modelos isotérmicos ajustaram-se aos dados nessa condição de pH, no entanto, as isotermas de Freundlich foram mantidas como base para a definição da massa de adsorvente e da temperatura durante a adsorção. Neste caso, utilizou-se a temperatura de 45 °C. As capacidades de adsorção calculadas por meio das isotermas foram: para a HA comercial foi de $44,11 \text{ mg de ALA}\cdot\text{g}^{-1}$ de HA; e para a HA sintetizada foi de $37,29 \text{ mg de ALA}\cdot\text{g}^{-1}$ de HA. Assim, a massa de HA utilizada foi determinada em 300 mg e o volume da solução ressuspendida mantido em 10 mL. Apenas uma adsorção foi realizada nesta etapa. Os resultados podem ser observados na **Figura 33**.

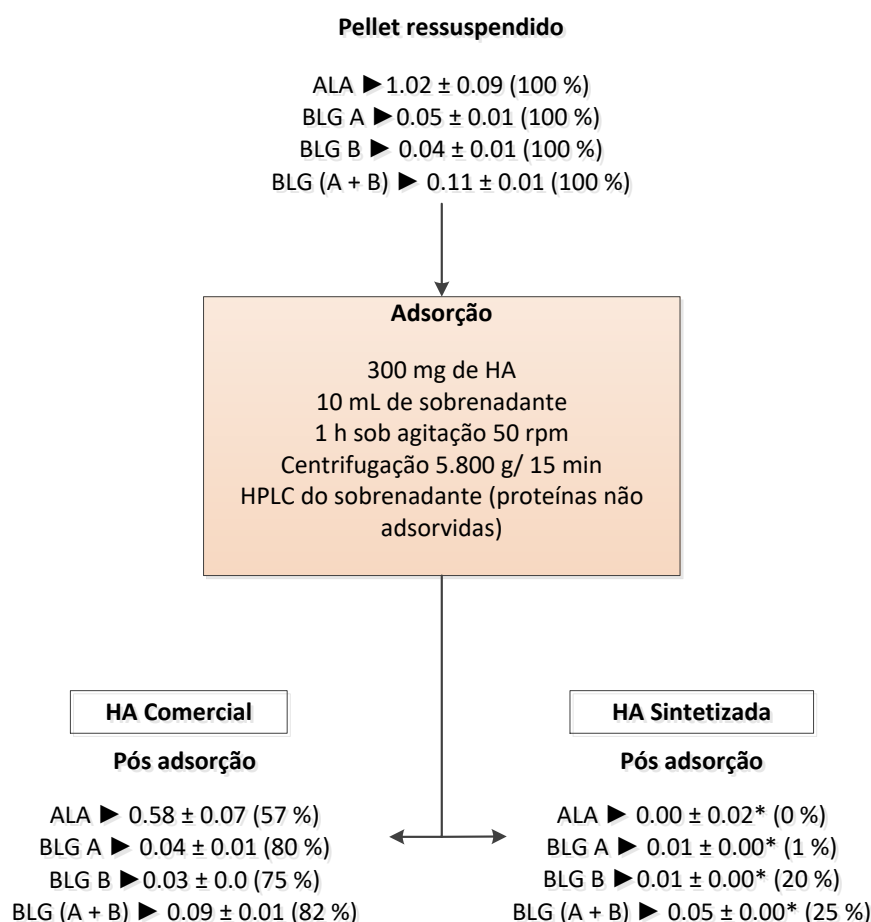


Figura 33 – Quantificação de ALA e BLG da adsorção em HA comercial e sintetizada (precipitado ressuspendido). * → (p -valor < 0,05) em relação ao sobrenadante após adsorção da HA comercial.

A HA sintetizada adsorveu toda a ALA do meio, enquanto, a HA comercial recuperou apenas 43 % ($m \cdot v^{-1}$) da proteína presente na dispersão ressuspendida. Provavelmente, a interação com o tampão utilizado para a ressuspensão do precipitado influenciou a adsorção na HA comercial. Uma hipótese está relacionada à maior cristalinidade da HA comercial em comparação à HA sintetizada. A organização das moléculas no cristal de HA expõe os grupos iônicos PO_4^{3-} (HENCH, 2013), responsáveis por grande parte da interação com proteínas (YANG; ZHANG, 2009). A interação destes íons Ca^{2+} presentes em excesso no tampão, pode ter levado à redução da adsorção da ALA. No entanto, o motivo real e/ou os mecanismos envolvidos não estão esclarecidos.

Os resultados observados mostram o potencial de aplicação da HA sintetizada para a recuperação das proteínas ALA e BLG no soro de leite.

5.3.6. Dessorção

A dessorção das proteínas que foram adsorvidas na etapa anterior será abordada em um único tópico, uma vez que, as condições analíticas foram semelhantes. A dessorção pode

ser definida como a liberação de uma substância adsorvida da interface para o solvente por meio da reversão/enfraquecimento dos mecanismos envolvidos na adsorção (YANG; ZHANG, 2009).

A princípio, a dessorção foi testada em ALA e BLG comerciais adsorvidas à HA comercial. A solução que levou ao melhor resultado de dessorção foi o tampão fosfato 0,4 mol·L⁻¹ pH 6,8 a 25 °C. Todavia, menos de 20 % das proteínas dessorveram. A literatura relata três mecanismos principais para reverter a adsorção: alterar o pH, a força iônica do meio e/ou a temperatura (YANG; ZHANG, 2009). Como era interessante obter as proteínas em pH próximo ao do soro, 6,8, este parâmetro foi inicialmente descartado. A força iônica já tinha sido testada para o tampão fosfato, sem que fosse observada melhora dos resultados. Assim, novos testes foram realizados utilizando o tampão fosfato elevando a temperatura de 30 até 50 °C e valores de dessorção acima de 90 % foi obtida para a temperatura mais elevadas. Assim, os testes de dessorção foram realizados utilizando tampão fosfato 0,4 mol·L⁻¹ em pH 6,8 sob agitação (50 rpm/1 h) a 50 °C.

As **Figuras 34 e 35** apresentam a comparação entre o perfil cromatográfico das soluções antes da adsorção e após a dessorção. Fica evidente que o processo de adsorção conseguiu isolar as proteínas ALA e BLG nas respectivas soluções em que se encontravam.

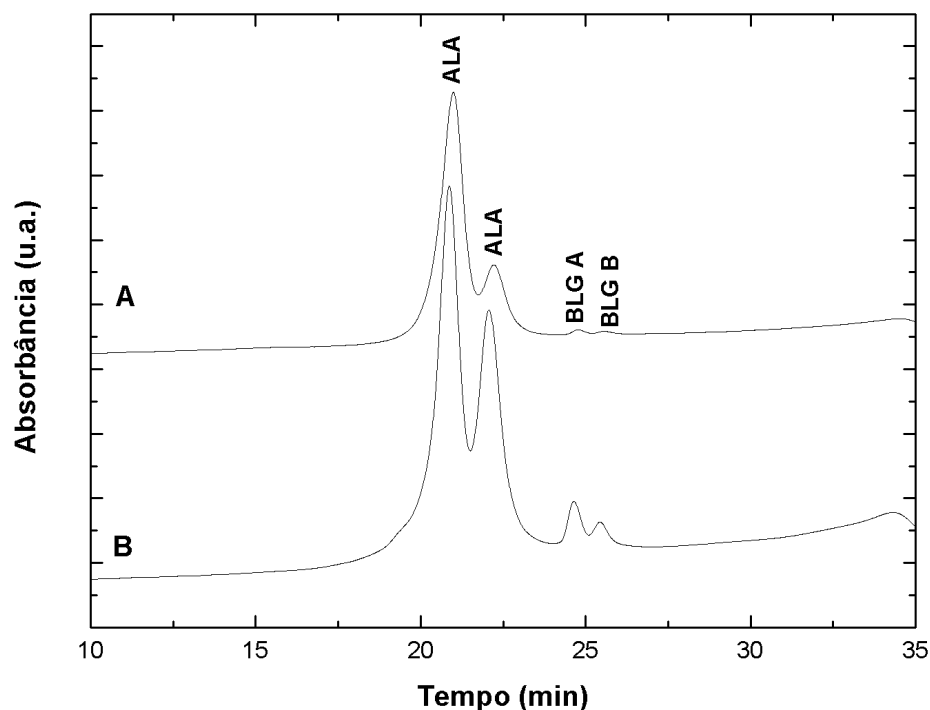


Figura 34 - Cromatogramas do precipitado ressuspensionado (B) e da solução contendo as proteínas ALA e BLG após a dessorção (A). Coluna VP-ODS-C18 de 150 mm por 4,6 mm; Fase móvel: (A) 0,1 % de TFA em água, (B) 0,1 % de TFA em acetonitrila; 70 % A, 30 % B → 50 % A, 50 % B, de 0 → 35 min; 50 % A, 50 % B → 30 % A, 70 % B, de 35 → 37 min.

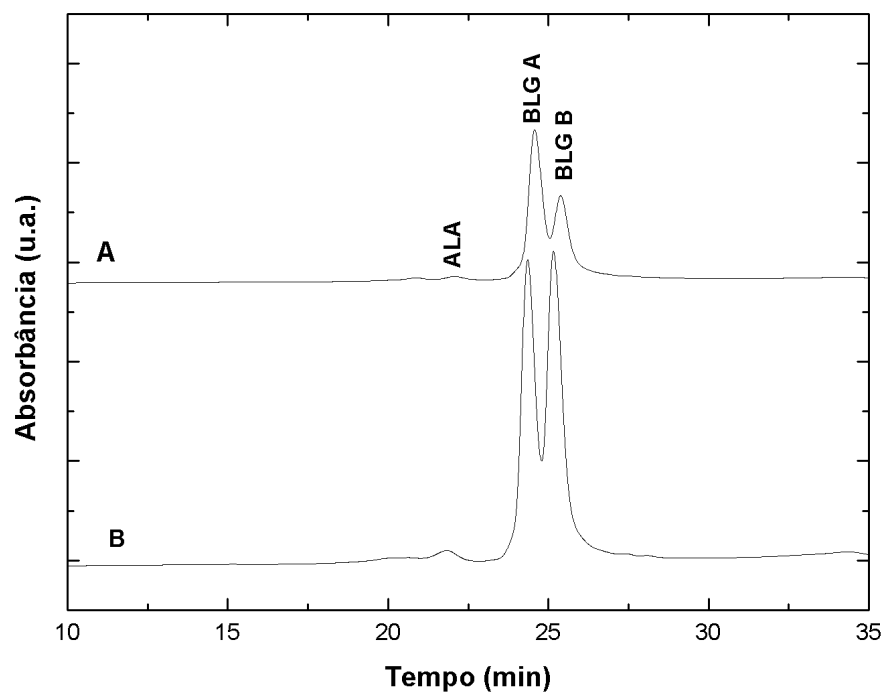


Figura 35 - Cromatogramas da fase fluida (B) e da solução contendo as proteínas ALA e BLG após a dessorção (A). Coluna VP-ODS-C18 de 150 mm por 4,6 mm; Fase móvel: (A) 0,1 % de TFA em água, (B) 0,1 % de TFA em acetonitrila; 70 % A, 30 % B → 50 % A, 50 % B, de 0 → 35 min; 50 % A, 50 % B → 30 % A, 70 % B, de 35 → 37 min.

Os resultados quantitativos para a dessorção das proteínas presentes no sobrenadante podem ser observados na **Figura 36**. Os valores de proteína adsorvida foram calculados por meio do balanço de massa entre a concentração de proteína presente no sobrenadante e a concentração de proteína que não adsorveu às HAs comercial e sintetizada. A dessorção da BLG A e da BLG total que estavam adsorvidas à HA comercial apresentaram redução significativa (p -valor < 0,05) na concentração das proteínas. Mesmo assim, a dessorção nas condições realizadas apresentou um rendimento superior a 80 % ($m \cdot v^{-1}$) para a BLG.

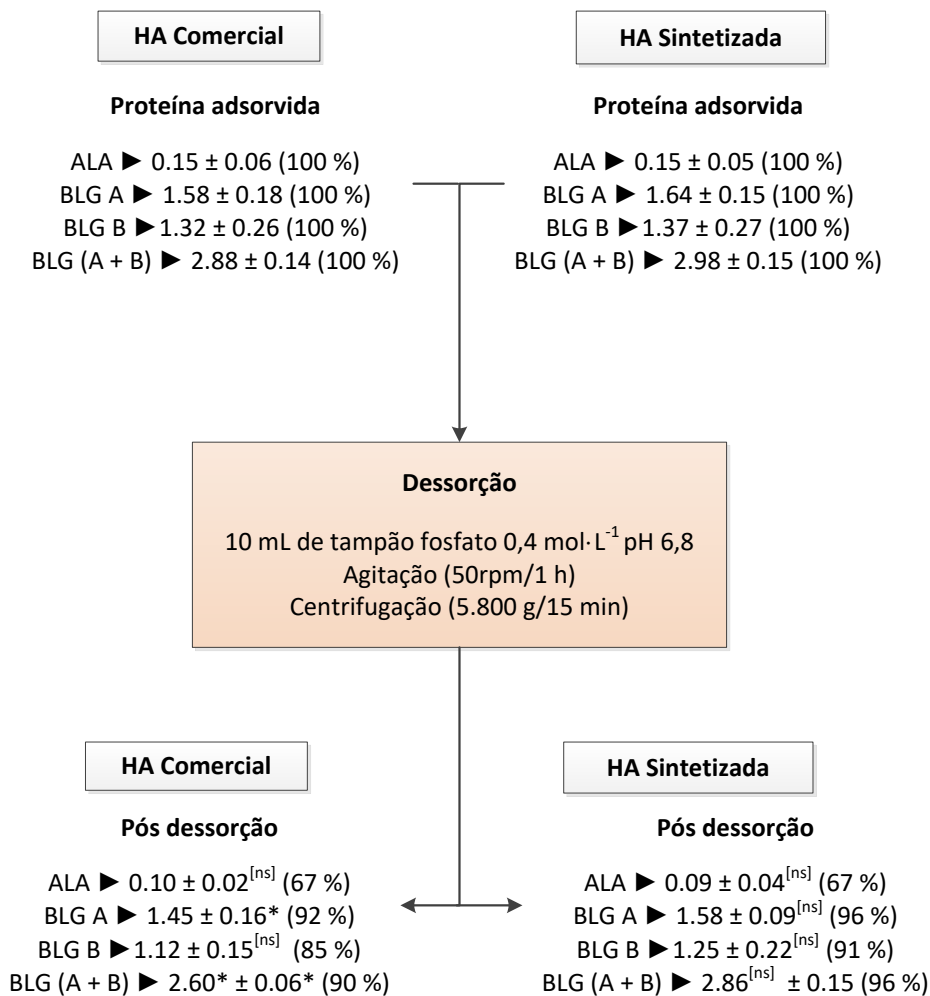


Figura 36 – Quantificação de ALA e BLG após a dessorção (fase fluida). [ns] → (p -valor > 0,05) em relação à concentração de proteína antes da dessorção. * → (p -valor < 0,05) em relação à concentração de proteína antes da dessorção.

Em relação à dessorção das proteínas da solução contidas no precipitado ressuspendido, todos os resultados não foram significativos (p -valor > 0,05) (**Figura 37**). Neste caso, o rendimento de dessorção foi superior a 90 % (m/v). Esse resultado reforça a elevada capacidade de dessorção das condições empregadas.

Poucos trabalhos na literatura tratam da dessorção de proteínas em HA. Kojima; Watanabe (2012) estudaram a liberação controlada de Citocromo C e insulina adsorvidos à HA e verificaram que em relação às proteínas, a dessorção foi influenciada pela forma, tamanho, solubilidade e carga. Monteiro (2008) cita condições como pH e força iônica como variáveis de processo a serem manipuladas para promover a dessorção. Esse autor utilizou tampão fosfato 0,4 mol·L⁻¹ como eluente em sistema cromatográfico para separar as proteínas ALA e BLG comerciais e obteve 70 % de rendimento na dessorção utilizando eluição em gradiente entre os valores de pH 6,0 e 7,0.

Yang; Zhang (2009) acrescenta, além de pH e força iônica, a temperatura como uma variável de processo para aumentar o rendimento da dessorção. Esse trabalho utilizou tampão fosfato $0,05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ em pH 6,0 e conseguiu dessorver 86 % de BSA adsorvida à HA. O autor sugere que ocorra uma substituição das proteínas pelo íon PO_4^{3-} do tampão fosfato nos sítios de adsorção da HA. Além disso, a afinidade do íon fosfato pela HA é maior que da BSA, sendo necessário a eluição de outra solução para removê-lo durante a regeneração do adsorvente.

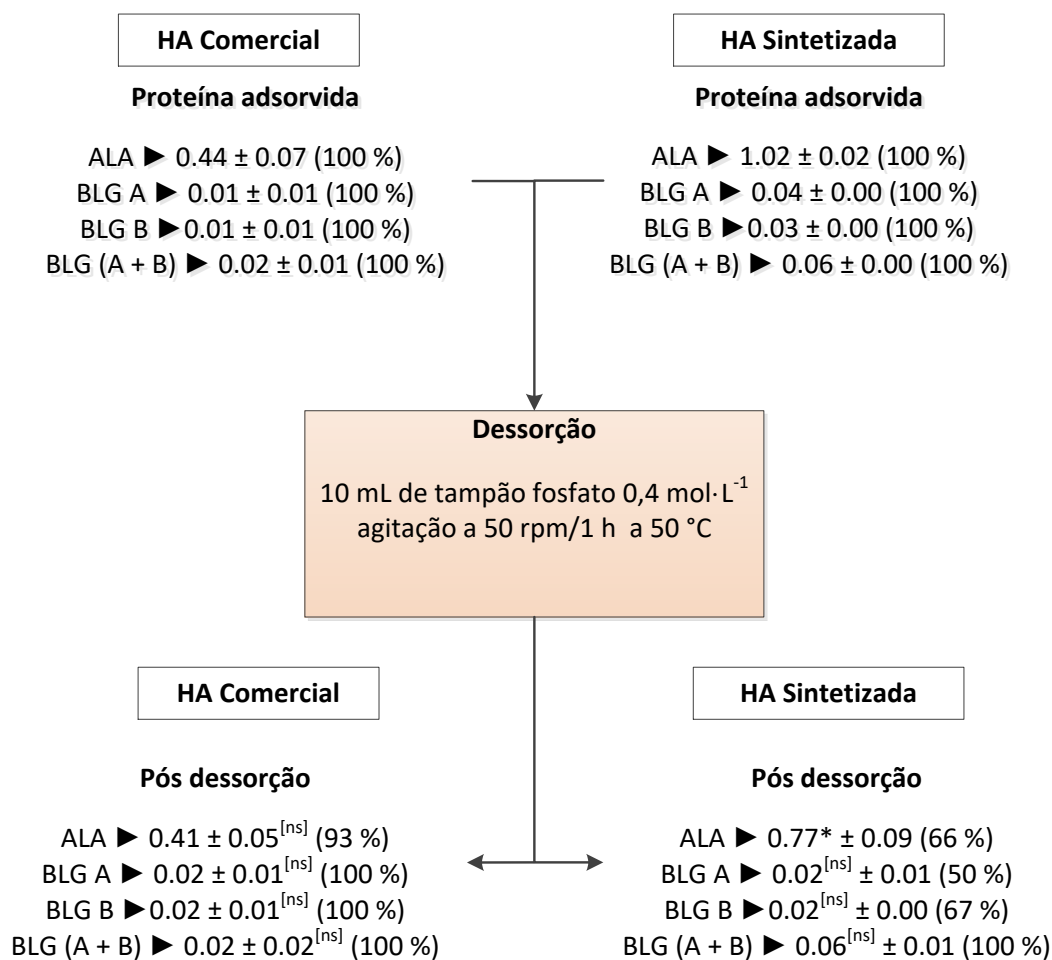


Figura 37 – Quantificação de ALA e BLG após a dessorção (solução ressuspensa). [ns] → (p -valor $> 0,05$) em relação à concentração de proteína antes da dessorção. * → (p -valor $< 0,05$) em relação à concentração de proteína antes da dessorção.

5.3.7. Cromatografia de exclusão molecular (CEM)

A CEM foi empregada para separar as proteínas dos íons presentes no tampão fosfato utilizado na etapa de dessorção. Testes iniciais foram realizados para definir o volume de tampão para a eluição da proteína. As proteínas foram identificadas por meio da interação com reagente de Bradford. Verificou-se que a proteína era eluída entre 3,5 e 6,5 mL de

eluente. Para avaliar a eluição dos íons que compõem o tampão fosfato de sódio, adicionou-se à solução que continha as proteínas dessorvidas duas gotas de NaCl 0,5 mol.L⁻¹ e a detecção dos sais ocorreu por meio da titulação com nitrato de prata (AgNO₃) na presença do indicador cromato de potássio (K₂CrO₄). A formação de precipitado marron foi verificada após 9 mL de eluído. O volume aplicado à coluna de separação de solução contendo as proteínas dessorvidas foi de 0,5 mL e, como foram coletados 3 mL de eluente, o procedimento promoveu uma redução de 6 (seis) vezes na concentração da proteína.

Os cromatogramas das proteínas após a CEM podem ser vistos nas **Figuras 38 e 39**. Não foi possível observar picos referentes à BLG para a solução que partiu do precipitado ressuspendido, tanto para a via que utilizou a HA comercial quanto para a que utilizou a HA sintetizada. Esse resultado mostra que foi possível purificar a ALA pelo processo proposto. Em relação à fase fluida, observa-se a presença de picos referente à ALA, portanto, a BLG foi isolada pelo processo proposto, pois ainda restaram alguns traços de ALA no produto final.

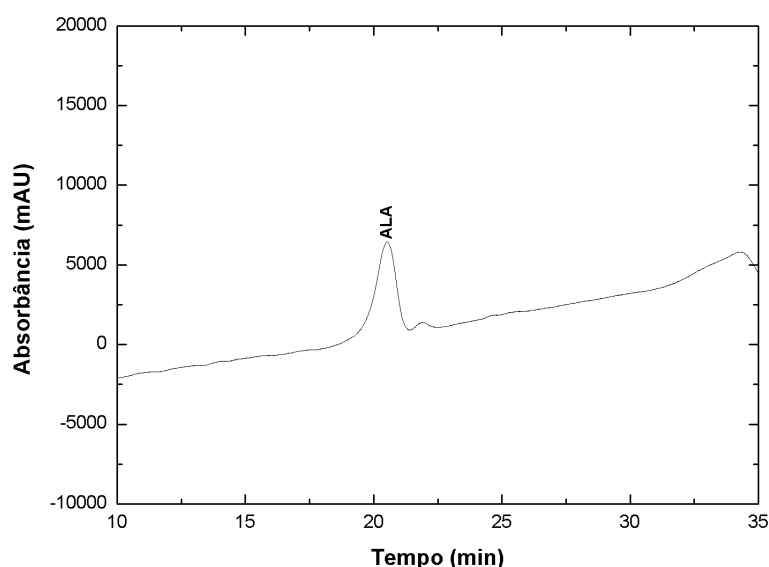


Figura 38 - Cromatograma após a CEM (solução ressuspendida). Coluna VP-ODS-C18 de 150 mm por 4,6 mm; Fase móvel: (A) 0,1 % de TFA em água, (B) 0,1 % de TFA em acetonitrila; 70 % A, 30 % B → 50 % A, 50 % B, de 0 → 35 min; 50 % A, 50 % B → 30 % A, 70 % B, de 35 → 37 min.

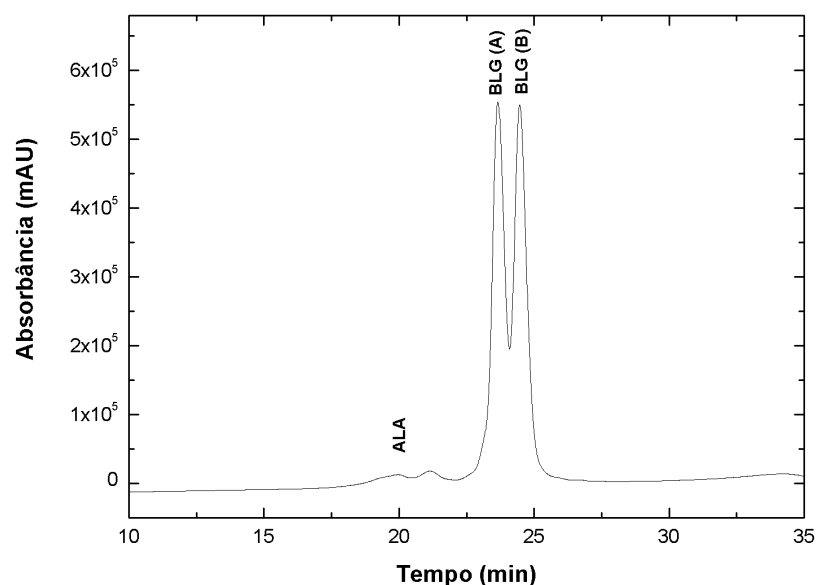


Figura 39 - Cromatograma após a CEM (fase fluida). Coluna VP-ODS-C18 de 150 mm por 4,6 mm; Fase móvel: (A) 0,1 % de TFA em água, (B) 0,1 % de TFA em acetonitrila; 70 % A, 30 % B → 50 % A, 50 % B, de 0 → 35 min; 50 % A, 50 % B → 30 % A, 70 % B, de 35 → 37 min.

Os resultados para a quantificação das proteínas presentes na fase fluida da precipitação seletiva podem ser observados na **Figura 40**. Observa-se que ocorreu uma redução significativa (p -valor < 0,05) da concentração após a eluição para todos os tratamentos. Porém, o rendimento foi superior a 85 % ($m \cdot v^{-1}$) para a recuperação de BLG total. Para as variantes BLG A e BLG B a recuperação foi de cerca de 80 % ($m \cdot v^{-1}$). Apenas na repetição que deu origem ao cromatograma apresentado na **Figura 38** foi possível observar e quantificar a proteína ALA, por isso, o resultado da média foi igual à zero, com certo desvio padrão.

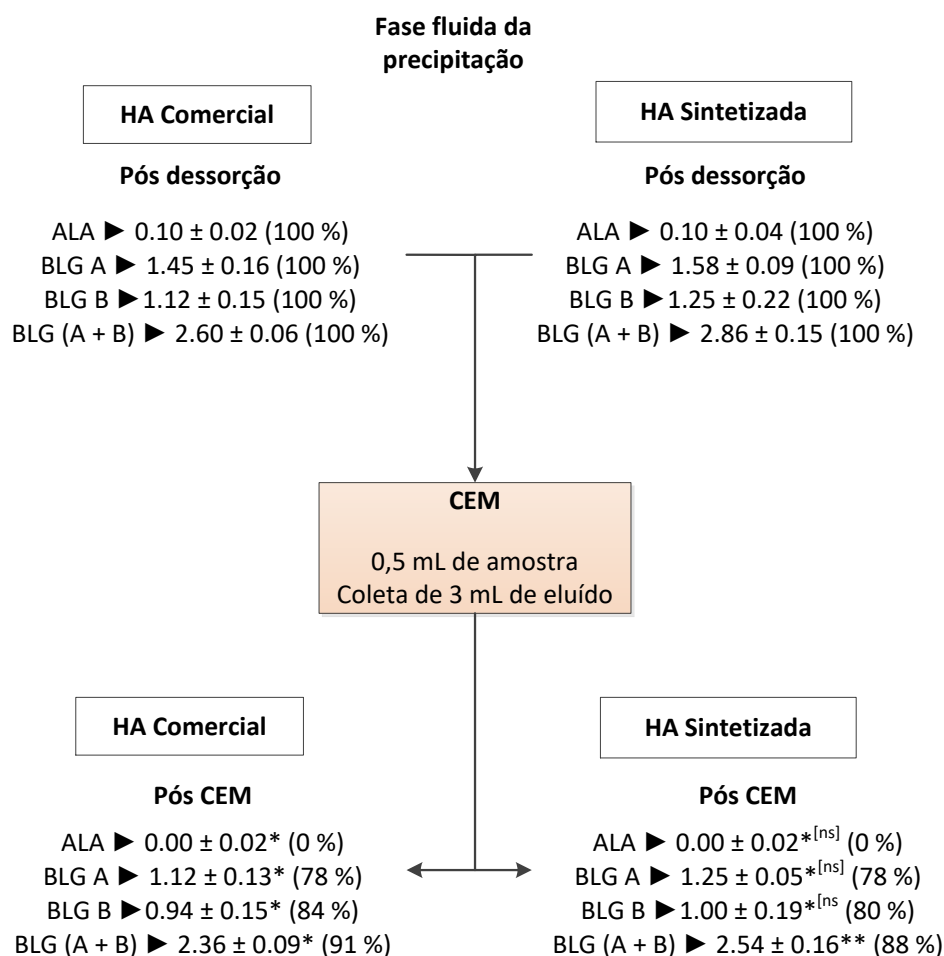


Figura 40 - Quantificação das proteínas ALA e BLG após a CEM (fase fluida). [ns] → (p -valor > 0,05) em relação à pós dessorção HA sintetizada. * → (p -valor < 0,05) em relação à pós dessorção HA comercial. ** → (p -valor < 0,05) em relação após CEM HA comercial.

Os resultados quantitativos para a CEM das proteínas presentes na solução ressuspensa após a precipitação seletiva são apresentados na **Figura 41**. Observa-se que houve redução significativa (p -valor < 0,05) para a ALA após a eluição da CEM, porém, o rendimento superou o valor de 75 % ($m \cdot v^{-1}$).

Ao final da CEM, apesar dos rendimentos elevados, a diluição de 6 (seis) vezes das proteínas, sinaliza para a necessidade de mais estudos em relação à essa etapa do processo. Possíveis alternativas seriam: diálise utilizando membranas semi-permeáveis, concentração e diálise em sistemas de ultrafiltração, eletroforese, entre outras.

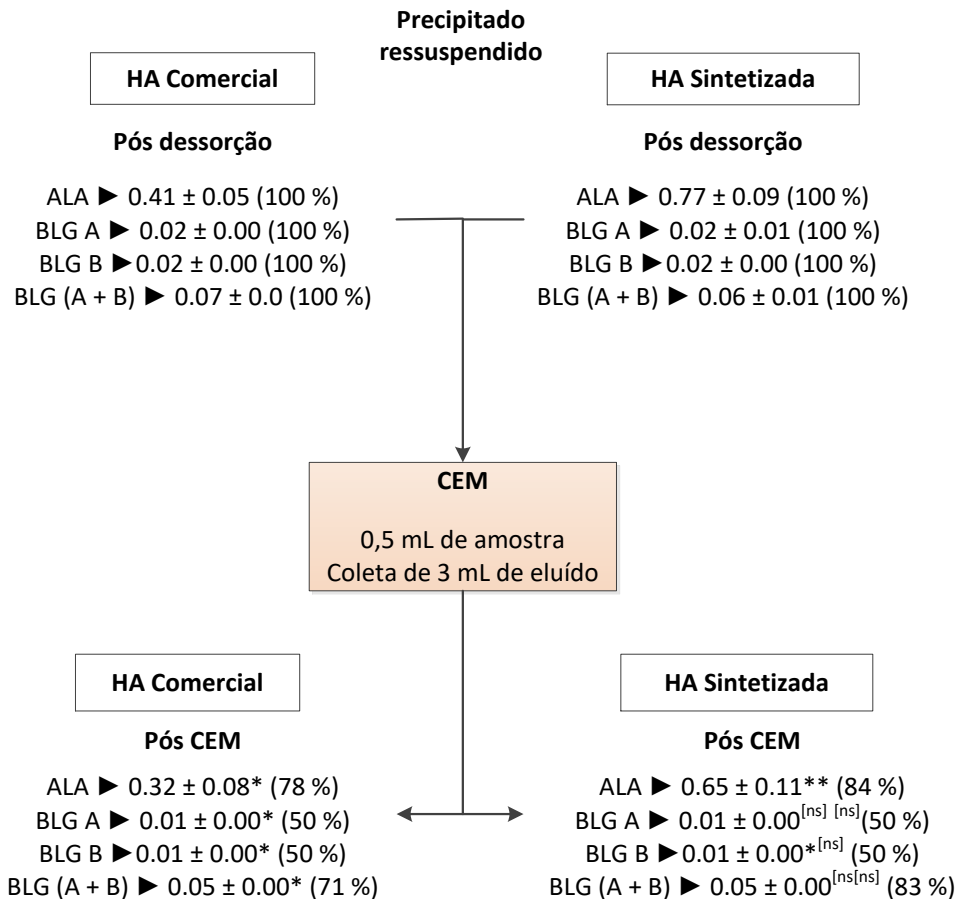


Figura 41 - Quantificação das proteínas ALA e BLG após CEM (solução ressuspendida). [ns] [ns] → (p-valor > 0,05) em relação à pós dessorção HA sintetizada e a pós CEM comercial. * [ns] → (p-valor < 0,05) em relação à pós dessorção HA sintetizada e (p-valor > 0,05) em relação à pós CEM HA comercial; * → (p-valor < 0,05) em relação à pós dessorção HA comercial. ** → (p-valor < 0,05) em relação após CEM HA comercial.

5.3.8. Resumo do processo de separação

A **Figura 42** apresenta o resumo do processo de separação das proteínas ALA e BLG do soro de leite. Ao final da separação foi possível recuperar 26 e 53 % ($m \cdot v^{-1}$) da ALA, em relação à concentração inicial das proteínas no soro, utilizando a adsorção à HA comercial e sintetizada, respectivamente. Em relação à BLG total, 65 e 70 % ($m \cdot v^{-1}$) das proteínas puderam ser recuperadas por meio da adsorção com HA comercial e sintetizada, respectivamente.

Os resultados apresentados mostram o potencial para a utilização da HA como adsorvente para obtenção de frações isoladas das proteínas ALA e BLG obtidas diretamente do soro de leite fluido. Destaque para a HA sintetizada que conseguiu recuperar 100 % a mais de ALA e 8 % a mais de BLG em comparação a HA comercial.

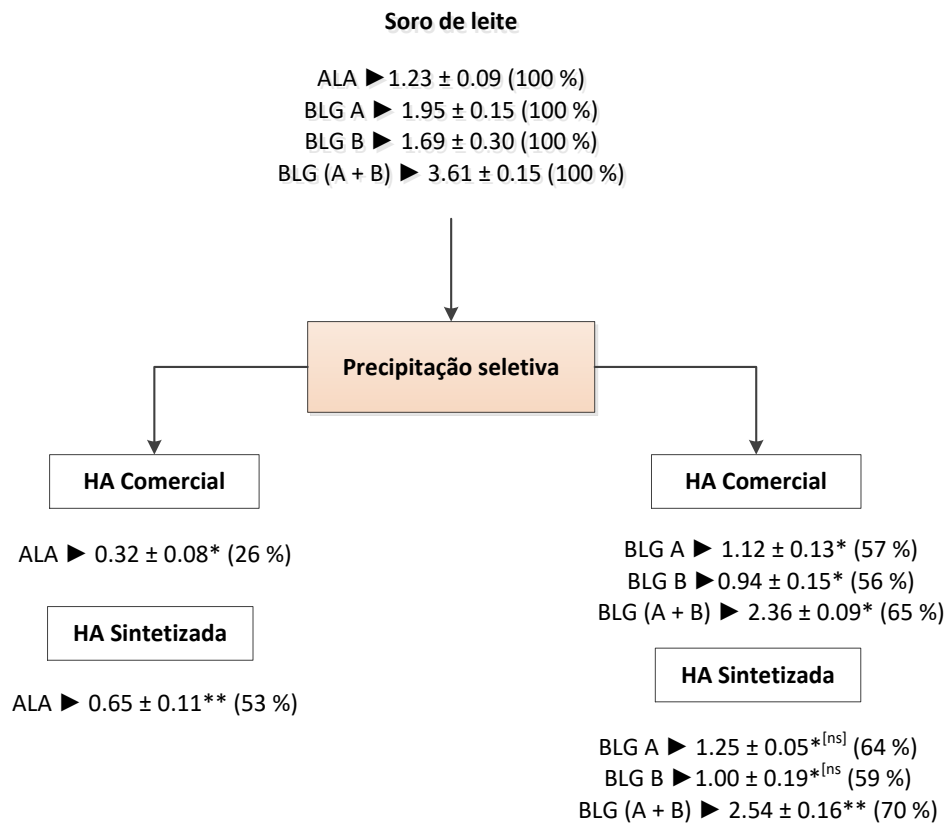


Figura 42 - Resumo do processo de separação das proteínas ALA e BLG a partir do soro de leite. * [ns] → (p-valor < 0,05) em relação ao soro de leite e (p-valor > 0,05) em relação à adsorção com HA comercial; * → (p-valor < 0,05) em relação ao soro de leite. ** → (p-valor < 0,05) em relação ao soro de leite e à adsorção com HA comercial.

6. Conclusão

HA foi sintetizada em meio aquoso via aplicação de ultrassom. O material foi caracterizado e testado para a adsorção das proteínas do soro de leite ALA e BLG. A partir dos resultados encontrados nas análises de caracterização morfológica, cristalográfica e de físico-química, dos dados obtidos nos experimentos cinéticos e de equilíbrio da adsorção e da aplicação da HA para a adsorção das proteínas ALA e BLG no soro de leite fluido, conclui-se que:

i) HA de elevado grau de pureza foi sintetizada em meio aquoso via aplicação de ultrassom;

ii) A síntese em meio aquoso permitiu a obtenção de material com reduzido grau de cristalinidade, em média 9 %, e tamanho médio de cristais de 27 nm;

iii) Não foi possível detectar a presença de picos característicos das proteínas ALA e BLG comerciais adsorvidas à HA por meio da análise de FT-IR e espectroscopia Raman;

iv) Análises de Potencial Zeta comprovaram a adsorção das proteínas ALA e BLG comerciais sobre a HA sintetizada;

v) O modelo de pseudo-segunda ordem foi o que melhor se ajustou aos dados cinéticos;

vi) Os modelos de Langmuir e Freundlich ajustaram-se aos dados obtidos nos experimentos de equilíbrio realizados em pH 6,0;

vii) Não se observou redução na concentração de ALA e BLG após a pasteurização do leite;

viii) A precipitação seletiva foi eficiente em separar as proteínas ALA e BLG: a concentração de citrato utilizada foi de $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e a relação ALA/BLG no precipitado aumentou de 0,34 para 9,27; na fase fluida, a relação BLG/ALA aumentou de 2,93 para 22,60;

ix) A adsorção de BLG diretamente do soro foi menor do que a calculada por meio dos parâmetros obtidos pela isoterma de Freundlich;

x) A HA sintetizada levou a resultados semelhantes a HA comercial para a adsorção de BLG no sobrenadante da precipitação seletiva;

xi) A HA sintetizada levou a resultados superiores em comparação com a HA comercial para a adsorção de ALA presente no precipitado ressuspendido;

xii) As condições determinadas para a dessorção foram: tampão fosfato $0,4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ em pH 6,8 a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1 h;

xiii) O percentual de recuperação de ALA no processo de separação foi de 23 e 53 % (m/m) para a rota que empregou a HA comercial e a sintetizada, respectivamente;

xiv) O percentual de recuperação de BLG no processo de separação foi de 65 e 70 % (m/m) para a rota que empregou a HA comercial e a sintetizada, respectivamente.

7. Perspectiva de trabalhos futuros

O trabalho realizado conseguiu avançar no aspecto de aplicação de conceitos teóricos em uma situação real, em que, técnicas de separação foram empregadas diretamente ao soro de leite em sua forma fluida com baixas concentrações de proteínas. Além disso, o adsorvente alternativo proposto mostrou grande potencial de aplicação frente ao produto comercialmente disponível. No entanto, certos desafios persistem. Alguns deles são:

i – Entender a dinâmica de cristalização da HA sintetizada em meio aquoso e o impacto das ondas ultrassônicas sobre a forma, tamanho, estabilidade e organização dos átomos no cristal de HA;

ii- Realizar o estudo termodinâmico do processo de adsorção da HA sintetizada e as proteínas ALA e BLG;

iii – Intensificar os estudos sobre as informações que podem ser extraídas a partir dos parâmetros obtidos nos modelos cinéticos e isotérmicos para buscar entender melhor o processo de adsorção;

iv – Dado à carência de dados na literatura, buscar entender os mecanismos envolvidos na dessorção das proteínas adsorvidas à HA;

v – Buscar alternativas à cromatografia de exclusão molecular, afim de evitar a diluição das proteínas;

vi – No trabalho foram utilizadas operações unitárias em batelada, assim, são necessários mais estudos para buscar alternativas tecnológicas para o desenvolvimento de um processamento com fluxo contínuo. Isso poderia aumentar a viabilidade econômica do processo.

8. Referências Bibliográficas

3A BUSINESS CONSULTING. **International Whey Market Overview** ADPI/ABPI Annual Conference. **Anais**. Berlin: 2009

AKRAM, M.; AHMED, R. Extracting hydroxyapatite and its precursors from natural resources. **Journal of Material Science**, v. 49, p. 1461–1475, 2014.

ALOMIRAH, H. F.; ALLI, I. Separation and characterization of b-lactoglobulin and a-lactalbumin from whey and whey protein preparations. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 5, p. 411–419, 2004.

ALVES, M. P.; MOREIRA, R. D. O.; CARLA, M.; MARTINS, D. F. Soro de Leite: Tecnologias para o Processamento de Coprodutos. **Revista Laticínio Cândido Tostes**, v. 69, n. 3, p. 212–226, 2014.

AMIRI, M. C.; VALSARAJ, K. T. Effect of gas transfer on separation of whey protein with aphyron flotation. **Separation and Purification Technology**, v. 35, n. 2, p. 161–167, 2004.

ANTUNES, A. J. **Funcionalidade de proteínas do soro de leite bovino**. 1st. ed. Sao Paulo: Manole, 2003.

APTEL, J. D.; VOEGEL, J. D.; SCHMITT, A. Adsorption Kinetics of Proteins onto Solid Surfaces in the Limit of the Interfacial Interaction Control. **Colloids and Surfaces**, v. 29, p. 359–371, 1988.

ARAKAWA, T.; TIMASHEFF, S. N. Theory of protein solubility. **Methods Enzymol**, v. 114, n. 49–77, 1985.

BALDASSO, C.; BARROS, T. C.; TESSARO, I. C. Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. **Desalination**, v. 278, p. 381–386, 2011.

BARBOSA, L. C. DE A. **Espectroscopia no Infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. 1. ed. Viçosa, Brasil: Ed. UFV, 2007.

BONNAILLIE, L. M.; TOMASULA, P. M. Kinetics, aggregation behavior and optimization of the fractionation of whey protein isolate with hydrochloric acid. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 4, p. 737–747, 2012.

BRAMAUD, C.; AIMAR, P.; DAUFIN, G. Optimisation of a whey protein fractionation process based on the selective precipitation of alpha-lactalbumin. **Lait**, v. 77, p. 411–423, 1997.

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

BUROVA, T. V.; CHOISET, Y.; TRAN, V.; HAERTLÉ, T. Role of free Cys121 in stabilization of bovine beta-lactoglobulin type B. **Protein engineering**, v. 11, n. 11, p. 1065–1073, 1998.

CAPITANI, C. D.; PACHECO, M. T. B.; GUMERATO, H. F.; VITALI, A.; SCHMIDT, F. L. Recuperação de proteínas do soro de leite por meio de coacervação com polissacarídeo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 11, p. 1123–1128, 2005.

CASAL, E.; MONTILLA, A.; MORENO, F. J.; OLANO, A.; CORZO, N. Use of chitosan for selective removal of β -lactoglobulin from whey. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 5, p. 1384–1389, 2006.

CAVALLIERI, A. L. F.; DA CUNHA, R. L. The effects of acidification rate, pH and ageing time on the acidic cold set gelation of whey proteins. **Food Hydrocolloids**, v. 22, n. 3, p. 439–448, 2008.

CETINKAYA, S.; AKKAYA, B. Selective and single step adsorption of α -lactalbumin from whole cow's milk on hydroxyapatite microbeads. **Materials Science and Engineering C**, v. 68, p. 573–578, 2016.

CHARTTERTON, 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.

CRISTINA, K.; SILVA, G.; AMARAL, T. N.; LEITE, D. O.; JUNQUEIRA, L. A.; RESENDE, J. V. DE. Adsorption of protein on activated carbon used in the filtration of mucilage derived from *Pereskia aculeata miller*. **South African Journal of Chemical Engineering**, v. 23, p. 42–49, 2017.

CUMMINGS, L. J.; SNYDER, M. A.; BRISACK, K. Chapter 24 - Protein chromatography on hydroxyapatite columns. **Methods in Enzymology**, v. 463, n. C, p. 387–404, 2009.

DEVRIES, M. C.; PHILLIPS, S. M. Supplemental protein in support of muscle mass and health: Advantage whey. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 1, p. 8–15, 2015.

DONG, X.; WANG, Q.; WU, T.; PAN, H. Understanding adsorption - desorption dynamics of BMP-2 on. **Biophysical Journal**, v. 93, n. 3, p. 750–759, 2007.

DUMITRAȘCU, L.; MOSCHOPOULOU, E.; APRODU, I.; STANCIU, S.; RÂPEANU, G.; STĂNCIUC, N. Assessing the heat induced changes in major cow and non-cow whey proteins conformation on kinetic and thermodynamic basis. **Small Ruminant Research**, v. 111, n. 1–3, p. 129–138, 2013.

ELLIOTT, J. C. **Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates**. Amsterdam - Holanda: Elsevier B.V., 1994.

ESTÉVEZ, N.; FUCIÑOS, P.; BARGIELA, V.; PASTRANA, L.; TOVAR, C. A.; LUISA RÚA, M. Structural and thermo - rheological analysis of solutions and gels of a β -lactoglobulin fraction isolated from bovine whey. **Food Chemistry**, v. 198, p. 45–53, 2016.

EUGENIA LUCENA, M.; ALVAREZ, S.; MENENDEZ, C.; RIERA, F. A.; ALVAREZ, R. Alpha-lactalbumin precipitation from commercial whey protein concentrates. **Separation and Purification Technology**, v. 52, n. 3, p. 446–453, 2007.

FEKETE, S.; BECK, A.; VEUTHEY, J.-L.; GUILLARME, D. Theory and practice of size exclusion chromatography for the analysis of protein aggregates. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 101, p. 161–73, 2014.

FENNEMA, O. R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. **Química de alimentos de fennema**. 4 ed ed. Porto Alegre - Brasil: ARTMED, 2008.

FERRAT, A. Como valorizar o subproduto das fábricas de queijos, o “Lacto Soro”. **Boletim do leite**, v. 618, p. 32–38, 1980.

FISCHER, L. **Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology an introduction to gel chromatography**. 1. ed. New York - EUA: Elsevier, 1974.

FOX, P. F. Milk proteins as food ingredients. **International Journal of Dairy Technology**, v. 54, n. 2, p. 41–55, 2001.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H.; COGA, T. M.; GUINEE, T. P. **Cheese: Chemistry, physics and microbiology**. 3th. ed. California - USA: Elsevier Academic Press, 2004.

FREITAG, R.; BREIER, J. Displacement chromatography in biotechnological downstream process. **Chromatography**, v. 691, p. 101–112, 1995.

FURTADO, M. M.; LOURENÇO NETO, J. P. DE M. **Tecnologia de queijos. Manual técnico para a produção industrial de queijos**. 1. ed. São Paulo - Brasil: Dipemar, 1994.

GEANKOPOLIS, C. J. **Transport Processes and Unit Operations**. 3th. ed. Rio do Janeiro - Brasil: Prentice-Hall do Brasil, Ltda, 1993.

GENARO, A. C. B.; E., T. R.; AZZONI, A. R.; BUENO, S. M. A.; MIRANDA, E. A. Recovery and purification of aprotinin from industrial insulin processing effluent by immobilized chymotrypsin and negative IMAC. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 1413–1420, 2002.

GERNIGON, G.; SCHUCK, P.; JEANTET, R. Processing of mozzarella cheese wheys and stretchwaters: a preliminary review. **Dairy Science and Technology**, v. 90, p. 27–49, 2010.

GIRALDO-ZUÑIGA, A. D.; COIMBRA, J. S. R.; GOMES, J. C.; MINIM, L. A.; ROJAS, E. E. G.; GADE, A. D. Tecnologias aplicadas ao processamento do soro de queijo. **Revista Laticínio Cândido Tostes**, v. 59, p. 53–66, 2004.

GRANADOS CORREA, F.; BONIFÁCIO MARTINEZ, J.; SERRANO GÓMEZ, J. Synthesis and characterization of calcium phosphate and its relation to Cr (VI) adsorption properties. **Rev. Int. Contam. Ambient.**, v. 26, n. 2, p. 129–134, 2010.

GUIMARÃES, P. M. R.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 375–384, 2010.

HANUŠOVÁ, J.; MIHULOVÁ, M.; DIBLÍKOVÁ, L.; CURDA, L. Influence of salts on selective coagulation of whey proteins and their application in the isolation of β -lactoglobulin. **Dairy Science and Technology**. v. 32, n. 1, p. 77–81, 2014.

HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. C.; DE PAULA, H. Proteínas do soro do leite : composição , propriedades nutricionais , aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana Whey protein : composition , nutritional properties. **Nutrição**, v. 19, n. 4, p. 479–488, 2006.

HENCH, L. L. **An Introduction to Bioceramics**. 2th. ed. London: Imperial College Press, 2013.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; RECIO, I.; AMIGO, L. β -Lactoglobulin as source of bioactive peptides. **Amino Acids**, v. 35, n. 2, p. 257–265, 2008.

HIDALGO, J.; HANSEN, P. M. T. Selective Precipitation of Whey Proteins with Carboxymethylcellulose. **Journal of Dairy Science**, v. 54, n. 9, p. 1270–1274, 1971.

HIRAOKA, Y.; SEGAWA, T.; KUWAJIMA, K.; SUGAI, S.; MURAI, N. alpha-Lactalbumin: A Calcium Metalloprotein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 95, n. 3, p. 1098–1104, 1980.

HO, Y. S. Review of second-order models for adsorption systems. **Journal of Hazardous Materials**, v. 136, n. 3, p. 681–689, 2006.

HO, Y. S.; MCKAY, G. Pseudo-second order model for sorption processes. **Process Biochemistry**, v. 34, n. 5, p. 451–465, 1999.

HOSSAIN, M. M.; DO, D. D. The effects of denaturation in the displacement behaviour of proteins chromatographic. **The Chemical Engineerng**, v. 49, p. B29–B39, 1992.

HUNTER, R. J. **Zeta Potencial in Colloid Science: Principles and applications**. 3th. ed. London: Academic Press Inc, 1981.

IBGE. **Indicadores IBGE**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 12 jun. 2016.

IBRAHIM, H. R.; KOBAYASHI, K.; KATO, A. Improvement of the Surface Functional-Properties of Beta-Lactoglobulin and Alpha-Lactalbumin by Heating in A Dry State. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 57, n. 9, p. 1549–1552, 1993.

JAKOPOVIĆ, K. L.; BARUKČIĆ, I.; BOŽANIĆ, R. Physiological significance, structure and

isolation of α -lactalbumin. **Journal of Mijekarstvo**, v. 66, n. 1, p. 3–11, 2016.

JANDERA, P.; CHUCÁČEK. **Gradient elution in column liquid chromatography**. v. 04, 1st. ed. Amsterdan - Holanda: Elsevier, 1985.

JOY, J. M.; LOWERY, R. P.; WILSON, J. M.; PURPURA, M.; DE SOUZA, E. O.; WILSON, S. M.; KALMAN, D. S.; DUDECK, J. E.; JÄGER, R. The effects of 8 weeks of whey or rice protein supplementation on body composition and exercise performance. **Nutrition Journal**, v. 12, n. 1, p. 86, 2013.

KAMAU, S. M.; CHEISON, S. C.; CHEN, W.; LIU, X. M.; LU, R. R. Alpha-lactalbumin: Its production technologies and bioactive peptides. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 2, p. 197–212, 2010.

KANDA, A.; NAKAYAMA, K.; FUKASAWA, T.; KOGA, J.; KANEGAE, M.; KAWANAKA, K.; HIGUCHI, M. Post-exercise whey protein hydrolysate supplementation induces a greater increase in muscle protein synthesis than its constituent amino acid content. **British Journal of Nutrition**, v. 10, n. 6, p. 981–987, 2013.

KANDORI, K.; HAMAZAKI, H.; MATSUZAWA, M.; TOGASHI, S. Selective adsorption of acidic protein of bovine serum albumin onto sheet-like calcium hydroxyapatite particles produced by microreactor. **Advanced Powder Technology**, v. 25, n. 1, p. 354–359, 2014.

KILARA, A.; VAGHELA, M. N. **Proteins in Food processing: Whey proteins**. 1st. ed. Cambridge - Inglaterra: Woodhead Limited Publishing, 2004.

KIM, H.; GRITTI, F.; GUIOCHON, G. Effect of the temperature on the isotherm parameters of phenol in reversed-phase liquid chromatography. v. 1049, p. 25–36, 2004.

KINSELLA, J. E. **Proteins in whey**. In **Advances in Food und Nutrition Research**. San Dieg - USA: Academic Press Inc, 1989.

KOJIMA, C.; WATANABE, K. Adsorption and Desorption of Bioactive Proteins on Hydroxyapatite for Protein Delivery Systems. v. 201, n. 677418, 2012.

LAFETÁ JUNIOR, J. A. DE Q. **Síntese e caracterização de hidroxiapatita para adsorção de lactoferrina**. Viçosa - Brasil: 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., 2014.

LAGRANGE, V.; WHITSETT, D.; BURRIS, C. Global market for dairy proteins. **Journal of Food Science**, v. 80, n. S1, p. A16–A22, 2015.

LAM, R. S. H.; NICKERSON, M. T. The effect of pH and temperature pre-treatments on the structure, surface characteristics and emulsifying properties of alpha-lactalbumin. **Food chemistry**, v. 173, p. 163–70, 2015.

LANDI, E.; TAMPIERE, A.; CELOTTI, G.; SPRIO, S. Densification behavior and mechanisms of synthetic hydroxyapatite. **Journal of Euro Ceramic**, v. 20, p. 2377–2388, 2000.

LEE, D. S. H.; PAI, Y.; CHANG, S. Effect of thermal treatment of the hydroxyapatite powders on the micropore and microstructure of porous biphasic calcium phosphate composite granules. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 13, n. 05, p. 114–118, 2013.

LOVEDAY, S. M.; SAWYER, L. **Reference Module in Food Science**. [s.l.] Elsevier, 2016.

LOVRIEN, R. E.; MATULIS, D. Selective precipitation of proteins. **Current Protocols in Protein Science**, v. 4.5, p. 1–36, 1997.

LOZANO, J. M.; GIRALDO, G. I.; ROMERO, C. M. An improved method for isolation of β -lactoglobulin. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 1, p. 55–63, 2008.

LUCEY, J. A.; MUNRO, P. A.; SINGH, H. Effects of heat treatment and whey protein addition on the rheological properties and structure of acid skim milk gels. **International Dairy Journal**, v. 9, n. 3–6, p. 275–279, mar. 1999.

MAGESTE, A. B. **Adsorção de proteínas do soro do leite e do glicomacropéptido (GMP) na interface hidrofóbica de nanotubos de carbono de paredes múltiplas**. Viçosa - Brasil: Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de Doctor., 2012.

MAHDI, S.; VAZIRI, A.; AKBAR, A.; HEYDARI, A.; ARDJMAND, M.; NADERI, F.; MOZAFARI, H. International Journal of Biological Macromolecules Protein adsorption using novel carboxymethyl-curdlan microspheres. **International Journal of Biological**

Macromolecules, v. 87, p. 603–610, 2016.

MALENA, R.; LIMA, F.; EM, D. Efeito da adsorção de amina no potencial zeta da hematita e do quartzo. **Escola Minas de Ouro**, v. 56, n. 1, p. 45–49, 2003.

MAPA, M. DA A. P. E A. **Regulamento técnicos de identidade e qualidade de queijo** Brasil. Portaria 146, de 07-03-1996, 1996.

MATSUDOMI, N. α -Lactalbumin Enhances the Gelation Properties of Bovine Serum Albumin. **Food Chemistry**, v. 41, p. 1053–1057, 1995.

MATTIASSON, R. H.-K. B. **Isolation and purification of proteins**. New York - USA. Marcel Dekker, 2005.

MAUBOIS, J. L.; FAUQUANT, J.; FAMELART, M. H.; CAUSSIN, F. Milk microfiltrate, a convenient starting material for fractionation of whey proteins and derivatives - The importance of whey and whey components in food and nutrition. **3rd International Whey conference**, p. 59–73, 2001.

MIR, M.; LIMA, F.; SÉRGIO, P.; HERRMANN, D. P.; LUIZ, F. XRD , AFM , IR and TGA Study of Nanostructured Hydroxyapatite. **Materials Research**, v. 15, n. 4, p. 622–627, 2012.

MONTEIRO, A. A. **Síntese de hidroxiapatita e sua aplicação na separação de β -lactoglobulina e de α - lactoalbumina do soro de leite**. Viçosa - Brasil. 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 Mestre, 2008.

MOREIRA, E. L.; PAULA, A.; MOREIRA, D. Análise estrutural de uma hidroxiapatita carbonatada por difração de raios x. **Revista Matéria**, v. 11, n. 3, p. 494–502, 2007.

MURPHY, R. W.; FARKAS, B. E.; JONES, O. G. Dynamic and viscoelastic interfacial behavior of β -lactoglobulin microgels of varying sizes at fluid interfaces. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 466, p. 12–19, 2016.

NAGASAKI, T.; NAGATA, F.; SAKURAI, M.; KATO, K. Effects of pore distribution of hydroxyapatite particles on their protein adsorption behavior. **Integrative Medicine Research**, p. 1–6, 2017.

NAKANISHI, K.; SAKIYAMA, T.; IMAMURA, K. On the Adsorption of Proteins on Solid Surfaces , a Common but Very Complicated Phenomenon. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 91, n. 3, p. 233–244, 2001.

NICOLAI, T. Formation and functionality of self-assembled whey protein microgels. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces: Biointerfaces**, v. 137, p. 32–38, 2016.

NICOLAI, T.; BRITTEN, M.; SCHMITT, C. b-Lactoglobulin and WPI aggregates: Formation, structure and applications. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 8, p. 1945–1962, 2011.

PAPIZ, M. Z.; SAWYER, L.; ELIOPOULOS, E. E.; NORTH, A. C. T.; FINDLAY, J. B. C.; SIVAPRASADARAO, R.; KRAULIS, P. J. ET. AL. The structure of b-lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein. **Nature**, v. 324, n. 6095, p. 383–385, 1986.

PARK, Y. J.; KIM, K. H.; LIM, D. W.; LEE, E. K. Effects of pH and protein conformation on in-solution complexation between bovine α -lactalbumin and oleic acid: Binding trend analysis by using SPR and ITC. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 9, p. 1379–1387, 2015.

PATEL, S. Functional food relevance of whey protein: A review of recent findings and scopes ahead. **Journal of Functional Foods**, v. 19, p. 308–319, 2015.

PEDERSEN, L.; MOLLERUP, J.; HANSEN, E.; JUNGBAUER, A. Whey proteins as a model system for chromatographic separation of proteins. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 790, n. 1–2, p. 161–173, 2003.

PERMYAKOV, E. A.; BERLINER, L. J. α -Lactalbumin: structure and function. **FEBS Letters**, v. 473, n. 3, p. 269–274, 2000.

PESIC, M. B.; BARAC, M. B.; STANOJEVIC, S. P.; VRVIC, M. M. Effect of pH on heat-induced casein-whey protein interactions : A comparison between caprine milk and bovine ... **International Dairy Journal**, v. 39, n. 1, p. 178–183, 2014.

PIKE, A C.; BREW, K.; ACHARYA, K. R. Crystal structures of guinea-pig, goat and bovine alpha-lactalbumin highlight the enhanced conformational flexibility of regions that are significant for its action in lactose synthase. **Structure (London, England : 1993)**, v. 4, n. 6, p. 691–703, 1996.

PINTO, N. D. S.; FREY, D. D. Displacement chromatography of proteins using a retained pH front in a hydrophobic charge induction chromatography column. **Journal of Chromatography A**, v. 1387, p. 53–59, 2015.

PORALAN JR, G. M.; GAMBE, J. E.; ALCÂNTARA, E. M.; VEQUIZO, R. X-ray diffraction and infrared spectroscopy analyses on the crystallinity of engineered biological hydroxyapatite for medical application. **Materials Science and Engineering**, v. 79, 2015.

PROTEIN DATA BANK, P. **Estrutura das Proteínas a-lactoalbuminae b-lactoglobulina**. Disponível em: <<http://www.rcsb.org/pdb/ngl/ngl.do?pdbid=1BEB&bionumber=1>>. Acesso em: 3 jul. 2017.

RABE, M.; VERDES, D.; SEEGER, S. Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 162, n. 1–2, p. 87–106, 2011.

RAIKOS, V. Food Hydrocolloids Effect of heat treatment on milk protein functionality at emulsion interfaces . A review. **Food hydrocolloids**, v. 24, n. 4, p. 259–265, 2010.

RIGO, E. C. DA SI.; GEHRKE, S. A.; CARBONARI, M. Síntese e caracterização de hidroxiapatita obtida pelo método da precipitação. **Rev. Dental Press Periodontia Implantol**, v. 1, n. 3, p. 39–50, 2007.

RODRIGUES, A. G.; GALZERANI, J. Infrared , Raman and photoluminescence spectroscopies : Potentialities and complementarities encia : potencialidades e complementaridades. **Revista Ensino de Física**, v. 34, n. 4, p. 4309, 2012.

RODRIGUES, J. A. **Raios X: difração e espectroscopia**. 1st. ed. São Carlos: Ed da Univ. de São Carlos, 2009.

ROJAS, E. E. G. **Separação e purificação de a -lactoalbumina e b-lactoglobulina pela cromatografia por exclusão molecular após a extração com sistemas aquosos bifásicos**. Viçosa, Brasil: Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de Magister Scientiae., 2001.

ROUQUEROL, F.; ROUQUEROL, J. SING, K. S. W.; LLEWELLYN, P.; MAURIN, G. **Adsorption by powders and porous solids**. 2. ed. Marseille-France: Elsevier, 2014.

SCHIMIDT, F. **Determinação de alguns metais em solos por espectroscopia de fluorescência de raios X de energia dispersiva**. Brazilian Conference on Neural Networks. **Anais**. São Paulo - Brasil, 2015

SEGAT, A.; MISRA, N. N.; FABBRO, A.; BUCHINI, F.; LIPPE, G.; CULLEN, P. J.; INNOCENTE, N. Effects of ozone processing on chemical, structural and functional properties of whey protein isolate. **Food Research International**, v. 66, p. 365–372, 2014.

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

SGS, G. **Difração de raio X (XRD)**. Disponível em: <<http://www.sgsgroup.com.br/X-Ray-Diffraction-XRD.aspx>>. Acesso em: 28 jun. 2017.

SHEIKH, F. A.; YONG, H. Extraction of pure natural hydroxyapatite from the bovine bones bio waste by three different methods. **Journal of Materials Processing**, v. 9, p. 3408–3415, 2008.

SHEN, J. W.; PAN, H.-H.; WANG, Q.; WU, T. Molecular simulation of protein adsorption and desorption on hydroxyapatite surfaces. **Biomaterials**, v. 29, p. 513–532, 2008.

SIGMA-ALDRICH, I. **Sigma Audrich**. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>>. Acesso em: 13 out. 2016.

SILVA, C. C.; THOMAZINI, D.; PINHEIRO, A. G.; LANCIOTTI JR, F.; SASAKI, J. M.; GÓES, J. C.; SOMBRA, A. S. B. Optical properties of hydroxyapatite obtained by mechanical alloying. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**, v. 63, n. 03, p. 1745–1757, 2002.

SINDAYIKENGERA, S.; XIA, W. Nutritional evaluation of caseins and whey proteins and their hydrolysates from Protamex. **Journal of Zhejiang University. Science.**, v. 7, n. 2, p. 90–98, 2006.

SINGH, H. Aspects of milk-protein-stabilised emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 8, p. 1938–1944, 2011.

SOUSA, R. DE C. S. DE; COIMBRA, J. S. DOS R.; AUGUSTO, L. DE L. X.; REIS, L. S. T. Adsorption of alpha-lactalbumin from milk whey on hydroxyapatite: effect of ph and

temperature and thermodynamic analysis. **Química Nova**, v. 37, n. 6, p. 950–955, 2014.

SWAIN, S. K.; SARKAR, D. Applied Surface Science Study of BSA protein adsorption / release on hydroxyapatite nanoparticles. **Applied Surface Science**, v. 286, p. 99–103, 2013.

TADINI, C. C.; TELIS, V. R. N.; MEIRELLES, A. J. A.; FILHO, P. A. P. **Operações unitárias na indústria de alimentos. Volume II**. 1ed. ed. Rio de Janeiro - Brasil. LTC, 2016.

TERCINIER, L.; YE, A.; ANEMA, S.; SINGH, A.; SINGH, H. Journal of Colloid and Interface Science Adsorption of milk proteins on to calcium phosphate particles. **Journal of Colloid And Interface Science**, v. 394, p. 458–466, 2013.

TERCINIER, L.; YE, A.; ANEMA, S.; SINGH, A.; SINGH, H. Characterisation of milk protein adsorption onto hydroxyapatite. **International Dairy Journal**, v. 66, p. 27–33, 2017.

THOMÄ, C.; KRAUSE, I.; KULOZIK, U. Precipitation behaviour of caseinomacropptides and their simultaneous determination with whey proteins by RP-HPLC. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 4, p. 285–293, 2006.

TONHI, E.; COLLINS, K. E.; JARDIM, I. C. S. F. Revisão. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 616–623, 2002.

TORO-SIERRA, J.; TOLKACH, A.; KULOZIK, U. Fractionation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin from whey protein isolate using selective thermal aggregation, an optimized membrane separation procedure and resolubilization techniques at pilot plant scale. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 4, p. 1032–1043, 2013.

TOSI, E.; CANNA, L.; LUCERO, H.; RE, E. Foaming properties of sweet whey solutions as modified by thermal treatment. **Food Chemistry**, v. 100, p. 794–799, 2007.

TÜRK, S.; ALTINSOY, İ.; ÇELEBIEFE, G.; IPEK, M.; ÖZACAR, M.; BINDAL, C. Microwave – assisted biomimetic synthesis of hydroxyapatite using different sources of calcium. **Materials Science and Engineering**, v. 76, p. 528–535, 2017.

USDA. **Production of Dairy products in the U.S.A.** Disponível em: <<https://www.fas.usda.gov/data/dairy-world-markets-and-trade>>. Acesso em: 3 ago. 2017.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy science and technology**. 2 nd

ed. New York: New York: Taylor & Francis Group, 2006.

WASTOWSKI, A. D.; ROSA, G. M.; CHERUBIM, M. R.; RIGON, J. P. G. Caracterização dos níveis de elementos químicos em solo, submetido a diferentes sistemas de uso e manejo, utilizando espectrometria de fluorescência de raios-x por energia dispersiva (EDXRF). **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1449–1452, 2010.

WIJAYANTI, H. B.; BANSAL, N.; DEETH, H. C. Stability of Whey Proteins during Thermal Processing: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, p. 1235–1251, 2014.

WILDE, S. C.; TREITZ, C.; KEPPLER, J. K.; KOUDELKA, T.; PALANI, K.; THOLEY, A.; RAWEL, H. M.; SCHWARZ, K. β -Lactoglobulin as nanotransporter – Part II: Characterization of the covalent protein modification by allicin and diallyl disulfide. **Food Chemistry**, v. 197, p. 1022–1029, 2016.

XIAO-YU, K.; JING, W.; YAN-JUN, T.; DAN-DAN, L.; NAN-NAN, Z.; JIN-DOU, J.; NING, L. ScienceDirect HPLC Analysis of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in Bovine Milk with C 4 and C 18 Column. **Journal of Northeast Agricultural University**, v. 19, n. 3, p. 76–82, 2012.

YADAV, J. S. S.; YAN, S.; PILLI, S.; KUMAR, L.; TYAGI, R. D.; SURAMPALLI, R. Y. Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 756–774, 2015.

YAMINI, D.; VENKATASUBBU, G. D.; KUMAR, J.; RAMAKRISHNAN, V. Raman scattering studies on PEG functionalized hydroxyapatite nanoparticles. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 117, p. 299–303, 2014.

YANG, Z.; ZHANG, C. Adsorption / desorption behavior of protein on nanosized hydroxyapatite coatings: A quartz crystal microbalance study. **Applied Surface Science journal**, v. 255, p. 4569–4574, 2009.

YIN, G.; LIU, Z.; ZHAN, J.; DING, F.; YUAN, N. Impacts of the surface charge property on protein adsorption on hydroxyapatite. **Chemical Engineering Journal**, v. 87, p. 181–186, 2002.

YVER, A. L.; BONNAILLIE, L. M.; YEE, W.; MCALOON, A.; TOMASULA, P. M. Fractionation of whey protein isolate with supercritical carbon dioxide-process modeling and cost estimation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 1, p. 240–259, 2012.

ZHAI, J.; HOFFMANN, S. V.; DAY, L.; LEE, T.-H.; AUGUSTIN, M. A.; AGUILAR, M.-I.; WOOSTER, T. J. Conformational changes of α -lactalbumin adsorbed at oil-water interfaces: interplay between protein structure and emulsion stability. **Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 28, n. 5, p. 2357–67, 2012.

ZINSLY, P. F.; SGARBIERI, V. C.; PEREIRA DIAS, N. F. G.; JACOBUCCI, H. B.; PACHECO, M. T. B.; BALDINI, V. L. S. Produção piloto de concentrados de proteínas de leite bovino: composição e valor nutritivo. **Brazil Journal Food Technology**, v. 4, p. 1–8, 2001.

ZUÑIGA, A. D. G. **Estratégia de purificação das proteínas a-lactoalbumina e b-lactoglobulina do soro de queijo**. Viçosa - Brasil: Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de Doutor Scientiae, 2003.

ANEXO 1

Tabela 11 - Especificações dos equipamentos a serem utilizados neste projeto

Equipamento	Laboratório	Marca	Modelo	País
Aagitador magnético	LOP	TECNAL	TE – 0851	Brasil
Balança analítica	LOP	Shimadzu	AUY220	Japão
Banho termostático	LOP	TECNAL	TE – 184	Brasil
Centrífuga	LOP	Eppendorf	5430	Alemanha
Cromatógrafo (HPLC)	LOP	Shimadzu	Purifier	Suécia
Difratômetro	FIS	Rigaku	D-Max	EUA
Espectrofotômetro UV – Visível	LOP	VARIAN	CARY 50	Austrália
Estufa secagem	LOP	Thoth	T5-50	Brasil
Infravermelho	DEQ	Varian	600-IR	EUA
Incubadora (B.O.D)	LOP	SPLABOR	SP500	Brasil
MEV	Embalagem	Hitachi	TM 3000	-
Misturador vortex	LOP	Vortex	AP56	Brasil
pHmetro	LOP	HANNA	P21	Brasil
Freezer	LOP	GE	FZGE320	Brasil
Zetasizer	Embalagem	Zetasizer	Nano ZS	Reino Unido
Ultrasson	LOP	Unique	SC - 1400	Brasil
Micro- Raman	FIS	Renishaw	-	-
Refrigerador	LOP	Consul	PRACTICE 410 Biplex	Brasil
Filtro para sistema de água Milli-Q	LOP	Millipore	DIRECT-Q	EUA

Tabela 12 - Especificações dos materiais reagentes a serem utilizados neste projeto.

Materiais	Quantidade	Descrição	Código	Fornecedor
Leite	5 L	Cru integral	-	Funarbe
Renina	20 mL	30.000 UI	-	C. Hansen
Acetonitrila	5 L	Pureza \geq 99,5 %	187-06	Vetec
Ácido cítrico	50 g	Pureza \geq 97 %	77-92-9	ISOFAR
Ácido clorídrico	50 mL	Pureza \geq 37%	154	Vetec
α -lactoalbumina	5 g	Pureza \geq 96 %	-	Davisco
β -lactoglobulina	5 g	Pureza \geq 93 %	-	Davisco
Béqueres, provetas, pipetas, tubos e outras vidrarias diversas	Diversos	-	-	-
Citrato de Sódio	150 g	Pureza \geq 99 %	1768	Vetec
Cloreto de cálcio dihidratado	500 g	Pureza \geq 99 %	199-09	Vetec
Cloreto de sódio	100 g	Pureza \geq 99 %	106-09	Vetec
Cloreto de magnésio	20 g	Pureza \geq 98 %	63063	Sigma
Coluna C18	1 unidade	ODS - 250 mm/4,6 mm 5 μ	-	-
Eppendorf	100 unidades	-	-	Sigma
Filtro 0,1 μ m	100 un	Ester de celulose	-	Millipore
Fosfato de sódio monobásico	500 kg	Pureza \geq 98 %	1164	Vetec
Fosfato de sódio dibásico	500 kg	Pureza \geq 98 %	317	Merck
Hidroxiapatita	200 g	Pureza \geq 90 %	21223	Sigma
Hidróxido de sódio	20 g	Pureza \geq 98 %	S5881	Sigma
Coluna P-10	un	G-25® médio (50- 150 μ m)	-	Shepadex