

JOSÉ OSCAR MURILLO VARGAS

**PARTIÇÃO DE CASEÍNA EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS
FORMADOS POR POLIETILENOGLICOL + SAIS DE SULFATO E
FOSFATO E POLIETILENOGLICOL + MALTODEXTRINA**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2005

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

T

V297p
2005

Vargas, José Oscar Murillo, 1979-

Partição de caseína em sistemas aquosos bifásicos formados por polietilenoglicol + sais de sulfato e fosfato e polietilenoglicol + maltodextrina / José Oscar Murillo Vargas. – Viçosa : UFV, 2005. x, 101f. : il. ; 29cm.

Inclui apêndice.

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

Inclui bibliografia.

1. Equilíbrio líquido-líquido. 2. Partição de fases. 3. Separação (Tecnologia). 4. Caseína. 5. Polietilenoglicol. 6. Eletroforese. 7. Cromatografia a líquido de alta eficiência. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 660.2992

JOSÉ OSCAR MURILLO VARGAS

**PARTIÇÃO DE CASEÍNA EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS
FORMADOS POR POLIETILENOGLICOL + SAIS DE SULFATO E
FOSFATO E POLIETILENOGLICOL + MALTODEXTRINA**

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

APROVADA: 25 de Novembro de 2005

Prof. Luis Antonio Minim
(Conselheiro)

Prof. Luis Henrique Mendes da Silva
(Conselheiro)

Prof^a Maria do Carmo Hespanhol da Silva

Dr. Edwin Elard García Rojas

Prof^a Jane Sélia dos Reis Coimbra
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Agradeço, antes de qualquer coisa, à minha família da qual recebi apoio o tempo todo, graças a minha mãe pelo carinho e pela confiança, graças a todos por estar aqui a pesar da distância.

Agradeço também, a todos que de forma direta ou indiretamente colaboraram para que esta tese se tornasse realidade. Graças aos meus amigos: Sabrina, Bia, Carmen, Flávia, Tarliane, Omar, Fabíola, Sergio, Edwin, Arthur, Rosana, Rita, César, Melissa, Regina, Claudia, Veridiana, Fabiana, Amada, Igor, em fim a todos aqueles dos quais recebi conselhos, palavras de apoio, boa companhia e bons momentos.

Agradeço de forma especial à profa. Jane, pela paciência e orientação, ao prof. Minim, Prof. Luis Henrique, profa. Maria do Carmo e ao Dr. Edwin, ou seja, à banca examinadora, pelas dicas valiosas, questionamentos e sugestões.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE SIGLAS.....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
OBJETIVO GERAL.....	3
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
CAPÍTULO 1.....	5
1.REVISÃO DE LITERATURA.....	5
1.1 As caseínas.....	5
1.2 Propriedades funcionais e nutricionais.....	8
1.3 Métodos de Obtenção	10
1.4 Sistemas aquosos bifásicos.....	11
1.4.1 Constituintes de fases.....	18
1.4.1.1 Polietilenoglicol.....	18
1.4.1.2 Sais.....	18
1.4.1.3 Açúcar	19
1.5 Cromatografia de exclusão molecular.....	20
2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	24
2.1 Materiais	24
2.1.1 Reagentes.....	24
2.1.2 Equipamentos.....	25

2.2 Métodos.....	25
2.2.1 Escolha dos sistemas de trabalho.....	25
2.2.2 Preparo dos sistemas aquosos bifásicos.....	25
2.2.3 Medida da densidade.....	26
2.2.4 Relação de volume das fases.....	27
2.2.5 Cálculo do coeficiente de partição	27
2.2.6 Condições operacionais para a purificação da proteína	28
2.2.7 Purificação e quantificação da proteína presente nas fases....	28
2.2.8 Eletroforese.....	29
2.3 BIBLIOGRAFIA.....	30
CAPÍTULO 2 . PARTIÇÃO DA CASEÍNA EM SISTEMAS AQUOSO BIFÁSICOS COMPOSTOS POR POLIETILENOGLICOL, SAIS DE SULFATO E FOSFATO E ÁGUA.....	
RESUMO	38
1. INTRODUÇÃO	40
2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	43
2.1 Materiais.....	43
2.2 Escolha dos sistemas de trabalho.....	43
2.3 Preparo dos sistemas aquosos bifásicos.....	44
2.4 Medida da densidade.....	44
2.5 Determinação do coeficiente de partição.....	45
2.6 Quantificação da proteína.....	45
2.7 Purificação e quantificação da proteína após extração com SAB.....	45
2.8 Cálculo do comprimento da linha de amarração	46
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
3.1 Determinação do coeficiente de partição da caseína.....	47
3.2 Efeito da massa molar do polímero sobre o coeficiente de partição.....	47
3.3 Efeito do tipo de sal sobre o coeficiente de partição.....	50
3.4 Efeito da temperatura sobre o coeficiente de partição	54
3.5 Dependência do coeficiente de partição da caseína com o comprimento da linha de amarração	57
3.6 Recuperação da proteína utilizando CEM.....	58
3.7 Densidade.....	59
4. CONCLUSÕES.....	61
5. BIBLIOGRAFIA.....	62

CAPÍTULO 3. PARTIÇÃO DE CASEÍNA EM SISTEMAS AQUOSO BIFÁSICOS COMPOSTOS POR PEG, MALTODEXTRINA E ÁGUA...	68
RESUMO.....	68
1. INTRODUÇÃO.....	69
2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	72
2.1 Materiais.....	72
2.2 Escolha dos sistemas de trabalho.....	72
2.3 Preparo dos sistemas aquosos bifásicos.....	73
2.4 Medida da densidade.....	74
2.5 Determinação do coeficiente de partição.....	74
2.6 Quantificação da proteína.....	75
2.7 Cálculo do comprimento da linha de amarração.....	75
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
3.1 Determinação do coeficiente de partição da caseína.....	76
3.2 Efeito da massa molar do PEG sobre o coeficiente de partição.....	77
3.3 Efeito da temperatura sobre o coeficiente de partição.....	78
3.4 Dependência do coeficiente de partição com o comprimento da linha de amarração.....	79
3.5 Densidade.....	81
4. CONCLUSÕES.....	83
5. BIBLIOGRAFIA	84
CONCLUSÕES FINAIS.....	88
APÊNDICE 1. TESTES PRELIMINARES.....	90
1.1 Determinação da concentração dos componentes de fases em SAB salinos.....	90
1.2 Determinação da quantidade de proteína adicionada aos sistemas.....	93
1.3 Bibliografia.....	94
APÊNDICE 2. VALORES DO COEFICIENTE DE PARTIÇÃO DA CASEÍNA.....	95
APÊNDICE 3. ELETROFORESE.....	97
3.1 Fundamento teórico.....	97
3.2 Eletroforese da caseína em SAB.....	100
3.3 Bibliografia	101

LISTA DE SIGLAS

SAB	Sistema aquoso bifásico
SABs	Sistemas aquosos bifásicos
CEM	Cromatografia de exclusão molecular
β -Ig	β -lactoglobulina
α -la	α -lactalbumina
IgG, IgM, IgA	Imunoglobulina
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CTI	Cromatografia de troca iônica
CE	Eletroforese capilar
MEKC	Cromatografia eletrocínética micelar
SDS	Dodecil sulfato de sódio
DTT	Ditiotreitol
PEG(s)	Polietilenoglicol
Dex	Dextrana
MM(s)	Massa(s) molar(es)
MD	Maltodextrina
K	Coeficiente de partição
BSA	Albumina de soro bovino
LEM	Limite de exclusão molecular

RESUMO

VARGAS, José Oscar Murillo, M.S., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2005. **Partição de caseína em sistemas aquosos bifásicos formados por polietilenoglicol + sais de sulfato e fosfato e polietilenoglicol + maltodextrina.** Orientadora: Jane Sélia dos Reis Coimbra. Conselheiros: Luis Antonio Minim e Luis Henrique Mendes da Silva.

Sistemas aquosos bifásicos foram empregados como uma técnica alternativa à separação da caseína. Para tanto foram utilizados sistemas modelos compostos tanto por polietilenoglicol, sal e água, quanto por polietilenoglicol, açúcar e água. As massas molares dos polietilenoglicóis testados foram de 1500, 4000, 6000 e 8000 g mol⁻¹. Os quatro tipos de sais avaliados foram o sulfato de amônio, sulfato de lítio, sulfato de zinco e fosfato de potássio. O açúcar usado foi a maltodextrina (DE-10,5). As temperaturas de trabalho foram de 5, 25 e 45 °C para os sistemas contendo sal e de 35 e 45 °C para os sistemas compostos por maltodextrina. Foram avaliados para os dois tipos de sistemas a influência da massa molar do polímero e da temperatura sobre o coeficiente de partição da caseína. Para o sistema salino, foi analisado também o efeito do tipo de sal sobre o valor do coeficiente de partição. Os sistemas que levaram a uma maior distribuição da caseína entre as fases foram aqueles formados por 25,0 % (m/m) PEG 1500 e 13,0 % (m/m) fosfato de potássio, a 25 °C; e, por 6,0 % (m/m) PEG 1500 e 25,0 % (m/m) maltodextrina, a 35 °C. Os valores do

coeficiente de partição para cada sistema foram de 10,8 e 0,12, respectivamente. A cromatografia de exclusão molecular foi usada para purificar a proteína das fases dos sistemas salinos. O índice de recuperação da caseína de ambas fases, polimérica e salina, foi de 99,0 %, aproximadamente. Neste trabalho também foi determinada a densidade das fases para os dois tipos de sistemas, nas diferentes condições de massa molar de polietilenoglicol e temperatura. A partição de caseína em sistemas aquosos bifásicos mostrou-se factível, levando a resultados com potencial de uso a nível industrial.

ABSTRACT

VARGAS, José Oscar Murillo, M.S., Universidade Federal de Viçosa, November 2005. **Partition of casein using aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol + salts of sulfate and phosphate and polyethylene glycol + maltodextrin.** Adviser: Jane Sélia dos Reis Coimbra. Committee members: Luis Antonio Minim and Luis Henrique Mendes da Silva.

Aqueous two-phase systems were used for casein separation. The model systems consisted of polyethylene glycol, salt and water, as well as polyethylene glycol, sugar and water. The polyethylene glycol molar masses were 1500, 4000, 6000 and 8000 g mol⁻¹. The salts were ammonium sulfate, lithium sulfate, zinc sulfate and potassium phosphate, and the sugar was maltodextrin (DE-10,5). The tested temperatures for the systems containing salts were 5, 25 and 45 °C, and 35 and 45 °C for the systems with maltodextrin. The influence of the polymer molar masses and the temperatures on the partition coefficient of the casein were available for both type of systems. For the saline systems, the effect of the type of salt on the value of partition coefficient was also analyzed. The aqueous two-phase systems that presented larger distribution of casein between phases were those consisted of 25.0 mass % PEG 1500 with 13.0 mass % potassium phosphate, at 25 °C; and 6.0 mass % PEG 1500 with 25.0 mass % maltodextrin, at 35 °C. The values of the partition coefficient for each system were 10.8 and 0.12, respectively. Size-exclusion chromatography was used

to purify the protein from the phases in the saline systems. The recovery index of casein from the polymer and saline phases was approximately 99.0 %. In this work it was also determined the density of the phases for both systems, at different conditions of polyethylene glycol molar masses and temperature.

INTRODUÇÃO GERAL

As proteínas do leite são uma fonte rica de nutrientes que pode ser usada em produtos com diversos requisitos alimentícios. Podem ser destinados ao consumo de diferentes segmentos populacionais, como atletas, crianças, idosos, convalescentes e pessoas com um estilo de vida ativo. Em outras palavras, pessoas que necessitam de alimentos com elevada funcionalidade e uma excelente qualidade nutritiva.

As caseínas apresentam potencial industrial, sendo utilizadas em várias formulações alimentícias por sua excelente solubilidade, estabilidade ao calor e por suas características emulsificantes, entre outras. A caseína tem ainda aplicações não alimentares como na indústria de papéis, de cola e adesivos, tintas e vernizes, têxtil e cortume (SGARBIERI, 1996).

As caseínas compreendem aproximadamente 80 a 85 % das proteínas do leite (cerca de 28 g L⁻¹), sendo que a fração caseínica consiste de quatro grupos principais de proteínas α -, β -, κ - e γ -caseína. A proporção entre os diversos tipos é determinada geneticamente, porém, geralmente, não se encontra grande variação no perfil de caseína do leite bovino de diferentes fontes (DALGLEISH, 1982; MUIR, 1998).

No fracionamento e isolamento dos diferentes grupos de caseínas têm sido empregados métodos químicos baseados na diferença de solubilidade (IGARASHI, 1999) ou técnicas cromatográficas (SWAISGOOD, 1992; SWAISGOOD, 1996). Mas, nos últimos anos, têm adquirido importância na biotecnologia a concentração e separação de proteínas

usando os sistemas aquosos bifásicos (SABs). Estes são formados ao misturar duas soluções aquosas de polímeros de cadeia flexível ou de um polímero e de um sal (como fosfato de potássio, sulfato de sódio, etc). O material a separar se distribui entre as duas fases aquosas do sistema e o grau de separação é quantificado por meio do coeficiente de partição (k). Este coeficiente é função de uma série de variáveis experimentais como: pH, temperatura, presença de sais, massa molar e concentração dos polímeros que formam as fases, bem como das características da proteína. Assim, por meio do controle dessas variáveis pode-se separar a proteína de interesse (ALBERTSSON, 1986; BOLOGNESE et al., 2005).

O emprego de SABs constitui-se em uma metodologia alternativa viável, pois apresenta vantagens como rapidez da separação, alta relação massa da proteína/volume total da solução, possibilidade de separação das fases em modo contínuo, assim como baixo custo e facilidade de aplicação em grande escala (BOLOGNESE et al., 2005)

Já na etapa de purificação de biomoléculas os processos cromatográficos destacam-se devido à sua eficiência na separação, ao seu elevado poder de resolução e, principalmente, por não ocorrer desnaturação dos biocompostos. Dentre as diferentes técnicas cromatográficas, a cromatografia de troca iônica e a cromatografia de exclusão molecular (CEM), ou filtração em gel, são os métodos de purificação de proteínas mais comumente empregados (NIVEN, 1995).

A CEM é empregada para o isolamento de macromoléculas desde 1959 e tem por fundamento a separação devido à diferença de tamanho das mesmas. É uma metodologia de fácil execução, com uso na determinação da massa molar de diferentes substâncias, para o fracionamento de compostos e para a separação de grupos de misturas multicomponentes, como, por exemplo, sais e proteínas (IRVINE, 1997).

Assim sendo, este trabalho visa avaliar a influência da massa molar do polímero, do tipo de sal e da temperatura sobre o coeficiente de partição da caseína em sistemas aquosos bifásicos formados por polietilenoglicol, sal e água e polietilenoglicol, açúcar e água.

OBJETIVO GERAL

Analisar a viabilidade técnica do uso da extração líquido-líquido, usando sistemas aquosos bifásicos, na partição da caseína e a eficiência da cromatografia de exclusão molecular, na purificação desta proteína após emprego de sistemas salinos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar o coeficiente de partição da caseína em sistemas aquosos bifásicos formados por polietilenoglicol + sal + água e por polietilenoglicol + açúcar + água.
2. Selecionar os sistemas aquosos bifásicos salinos com coeficientes de partição favoráveis à separação da caseína em função da massa molar do polímero (1500, 4000, 6000, 8000 g mol⁻¹), do tipo de sal (sulfato de amônio, sulfato de lítio, sulfato de zinco e fosfato de potássio) e da temperatura (5, 25 e 45 °C).
3. Selecionar os sistemas aquosos bifásicos poliméricos com coeficientes de partição mais favoráveis à separação da caseína, em função da massa molar do polímero (1500, 4000, 6000, 8000 g mol⁻¹) e da temperatura (35 e 45 °C).
4. Purificar a caseína após extração com sistemas aquosos bifásicos salinos usando a cromatografia de exclusão molecular.
5. Determinar as densidades das fases dos dois tipos de sistemas em função da massa molar do polímero e da temperatura.

CAPITULO 1

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 As caseínas

As proteínas do leite podem ser divididas em duas grandes classes, caseínas e proteínas do soro. Os dois grupos de proteínas diferem química e fisicamente e estão presentes no leite quase que em diferentes fases. A caseína é encontrada como um agregado coloidal, contendo várias moléculas de proteínas, enquanto que as proteínas do soro apresentam-se em solução (DALGLEISH, 1982). A Tabela 1 relaciona a distribuição destes grupos de proteínas no leite.

As caseínas representam aproximadamente 80 a 85% das proteínas do leite (28 g L⁻¹), sendo um grupo heterogêneo de fosfoproteínas presentes como complexos estáveis de cálcio e fosfato que precipitam em pH 4,6 (DALGLEISH, 1982). Cerca de 95 % das caseínas estão presentes em forma de micelas formadas por subunidades de caseínas conhecidas como submicelas, com tamanho uniforme e diâmetro entre 10 e 20 nm (SGARBIERI, 1996). As variações do tamanho, composição e massa molar da partícula das submicelas são determinadas por fatores, como concentração do tipo de caseína, pH e temperatura (WONG, 1989).

A fração caseínica consiste de quatro principais grupos de proteínas: α_{S1} -, α_{S2} -, β -, κ -caseína. As γ -caseínas embora sejam tratadas como um grupo à parte, são produzidas por proteólise, após secreção da β -caseína,

pela ação das proteases naturais do leite, como a plasmina (BADUI, 1989). A proporção entre os tipos de caseína encontrados no leite pode variar de região para região, mas de forma geral tem-se: α_{s1} -caseína: 38,0 %, α_{s2} -caseína: 10,0 %, β -caseína: 36,0 %, κ -caseína: 13,0 % e γ -caseína: 3,0 % (DALGLEISH, 1982; CHEFTEL, 1989). A Tabela 2 lista algumas características e propriedades dos diferentes tipos de caseínas.

Tabela 1. Distribuição das proteínas do leite.

Proteína	% de proteína	Ponto isoeletrico	Massa Molar (Dalton)	Variantes
Caseína	80-85			
α -caseína	40-45	4,1	23.500	A,B,C, D.
β -caseína	30-35	4,5	24.100	A ¹ , A ² , A ³ , B,C, D.
κ -caseína	12-15	4,1	19.000	A B.
γ -caseína	3-5	5,8	20.000	A ¹ , A ² , A ³ , B.
Proteína do soro	15-25			
β -lactoglobulina (β -lg)	7-12	5,3	18.000	A,B,C, D.
α -lactalbumina (α -la)	2-5	5,1	14.200	A B.
Albumina bovina	0,7-1,3	4,7	69.000	
IgG ₁	1-2	5,5-6,8	150.000	
IgG ₂	0,2-0,5	7,5-8,3	170.000	
IgM	0,1-0,2	4,5-5,1	1.000.000	
IgA	0,05-0,10		300.000	

(BADUI, 1989).

A estabilidade da micela de caseína em parte se deve às interações do conjunto de submicelas por ligações com o fosfato de cálcio coloidal, interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. As α_{s1} -, α_{s2} - e β -caseína, que são sensíveis ao cálcio, interagem hidrofobicamente formando o centro da submicela. Assim, as submicelas contêm uma mistura de α_{s1} -, α_{s2} -, β - e κ -caseína, com as regiões hidrofóbicas orientadas para dentro e as regiões hidrofílicas orientadas para a superfície. Portanto, o centro da micela é hidrofóbico e a superfície é hidrofílica, sendo que na superfície da submicela existem áreas ricas em κ -caseína e áreas ricas em fosfato. Estes grupos fosfato da superfície interagem com o cálcio para formar pontes de fosfato

de cálcio e, portanto, na presença de cálcio parte da superfície é disponível para interações hidrofóbicas (WONG, 1989; SGARBIERI, 1996; FOX e McSEENEY, 1997; MUIR, 1998).

Tabela 2. Características e propriedades dos tipos de caseínas.

Caseína	Localização	Características e propriedades
α_{s1} e α_{s2}	Micelas e no soro	199 aminoácidos, 9 fosfoserinas, alto conteúdo de prolina, sensível ao cálcio, não têm cistina, resistentes à desnaturação.
β	Micelas e no soro	209 aminoácidos, 5 fosfoserinas, alto conteúdo de prolina, sensível ao cálcio, não tem cistina, resistente à desnaturação.
κ	Micelas e no soro	169 aminoácidos, 1 fosfoserina, alto conteúdo de prolina, insensível ao cálcio, tem duas cisteínas, resistente á desnaturação, sensível à ação da renina.
γ	Micelas e no soro	180 aminoácidos, 1 fosfoserina.

(BADUI, 1989).

Também a estabilidade das caseínas se deve ao alto conteúdo de ácido aspártico e glutâmico, cujos grupos carboxilas livres estão orientados para o exterior da molécula gerando uma camada de cargas negativas em volta do colóide. Estas cargas geram forças de repulsão entre as moléculas de caseína, evitando assim a tendência de agregação e precipitação. Quando o pH do meio é modificado existe uma protonação das carboxilas livres e, como conseqüência, uma neutralização da carga negativa (BADUI, 1989). Na Figura 1, estão representadas as estruturas de uma submicela e de uma micela de caseína.

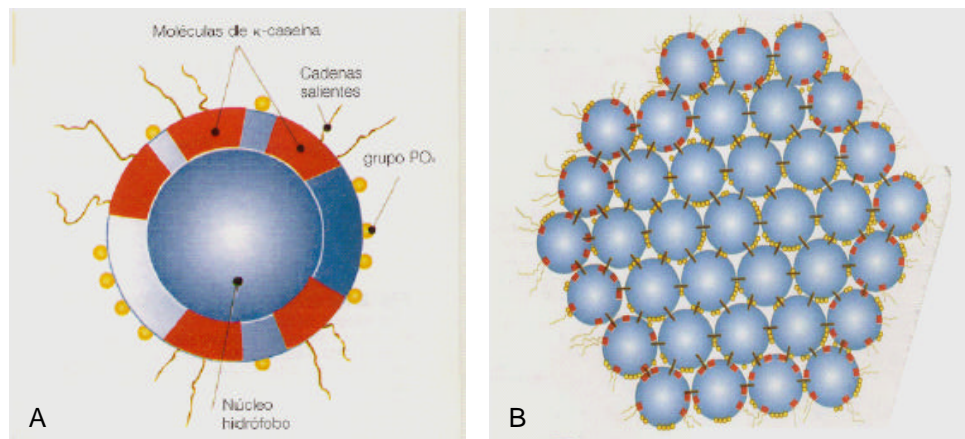


Figura 1. Estrutura de uma submicela (A). Estrutura de uma micela estabilizada (B)

A estabilidade das micelas pode ser alterada por uma série de fatores tais como:

- Temperatura: durante o armazenamento do leite sob refrigeração (4 a 7 °C), as micelas se dissociam parcialmente em submicelas e liberam cerca de 50,0 % da β-caseína em 24 horas (CHEFTEL, 1989).
- Modificações do pH: quando o pH do leite é reduzido ocorre a solubilização do fosfato de cálcio e uma progressiva desmineralização da estrutura micelar. A desestabilização da fase mineral da micela a torna insolúvel (MUIR, 1998).
- Adição de etanol: a presença de etanol diminui a repulsão eletrostática na região glicosada da κ-caseína, aumentando a atração entre as submicelas (WALASTRA, 1990).
- Ação de coagulantes: ocorre quando o leite é sometido a proteólise seletiva pela enzima renina, que é adicionada durante a fabricação de queijos, hidrolizando a κ-caseína. Os produtos dessa hidrólise são: a para-κ-caseína que é insolúvel e precipita, e o glicomacropéptido que é solúvel no soro (SGARBIERI, 1996; MUIR, 1998).

1.2 Propriedades funcionais e valor nutricional da caseína

O leite contribui para satisfazer em grande parte as necessidades do organismo em relação ao consumo de cálcio, fósforo, proteínas e vitaminas. As proteínas do leite têm grande importância na nutrição humana,

apresentando um valor nutricional protéico elevado, com proteínas de boa digestibilidade e aminoácidos disponíveis (GIESE, 1994). Possuem também aminoácidos essenciais nas proporções requeridas para o crescimento e manutenção do organismo humano (SOUTHWARD, 1986; MUIR, 1998). A Tabela 3 relaciona o valor protéico de alguns produtos da dieta humana.

As proteínas do leite, especificamente as caseínas, apresentam um grande potencial industrial, sendo utilizadas em diferentes formulações por apresentarem excelentes propriedades funcionais, como solubilidade, estabilidade da emulsão, retenção de água e adesão, entre outras. Outro atributo fundamental é a estabilidade térmica durante o processamento, que pode ser exemplificado pela resistência térmica da caseína do leite à pasteurização e ao tratamento UHT. São utilizadas também como agentes espumantes e gelificantes. Algumas aplicações de propriedades funcionais da caseína em alimentos são listadas na Tabela 4.

A caseína tem ainda uma série de outras aplicações não alimentares como nas indústrias de papéis, cola e adesivos, tintas e vernizes, têxtil e indústria de couros. Também é utilizada em dietas e produtos médicos específicos, como: alimentos infantis, alimentação intravenosa, formulações alimentares especiais, preparações de remédios, cosméticos, etc. (SGARBIERI, 1996; BRAMANTI et al., 2001).

Tabela 3. Valor nutricional de alguns alimentos expressos em PER, NPU e NPR

Proteína	PER*	NPU*	NPR*
Caseína	100	100	100
Farinha de peixe	109	100	103
Leite em pó	100	105	109
Soja	83	83	91
Óleo de algodão	76	94	94
Levedura	63	78	79
Amendoim	48	66	69
Glúten de trigo	19	64	71

(WALKER; 1982) PER*: Eficiência protéica, NPU*: Proteína líquida utilizada, NPR*: Coeficiente de proteína líquido.

Tabela 4. Propriedades funcionais da caseína e suas aplicações em alimentos.

Propriedade	Aplicação
Emulsificação	Pães, biscoitos, sobremesas, carnes.
Hidratação	Carnes, massas (pão, bolo), doces.
Viscosidade	Sopas, molhos, sobremesas.
Gel	Carnes, bolos, queijos.
Espuma	Sorvetes, produtos lácteos.
Coesão	Carnes, pastas.
Solubilidade	Bebidas

(BADUI, 1989; MUIR, 1998)

1.3 Métodos de obtenção da caseína

O conhecimento da composição, das propriedades e do comportamento das caseínas é muito importante por duas razões: primeiro, a composição da caseína afeta o tamanho, a estrutura e os processos de agregação da micela, bem como a ação da enzima proteolítica sobre a caseína na produção de queijo e deste modo o processamento do leite a nível industrial; segundo, uma identificação e quantificação do conteúdo de caseína oferece a possibilidade de estabelecer métodos para detectar a adulteração do leite com soro de queijo. Utiliza-se a caseína por ser uma das proteínas menos afetadas pelos tratamentos térmicos durante o processamento do leite, em comparação com outras proteínas do soro (SGARBIERI, 1996; BRAMANTI et al., 2003).

Segundo, LYNCH et al. (1998) as técnicas mais utilizadas para a determinação do conteúdo de caseína são:

- 1) Precipitação da caseína total em pH 4,6;
- 2) Quantificação do conteúdo total de nitrogênio no leite e no soro pelo método de Kjeldahl; e
- 3) Cálculo do conteúdo de caseínas por diferença entre a total de proteínas e as proteínas do soro.

Diferentes procedimentos têm sido propostos para a produção comercial em grande escala da caseína. Estes procedimentos podem ser agrupados nas seguintes categorias: (1) precipitação seletiva, induzida pelo ajuste das propriedades físicas da solução em estudo; (2) filtração, utilizando

membranas com base nas diferenças de tamanho e carga das partículas; (3) cromatografia; e (4) eletroforese (DOULTANI et al., 2004).

Os métodos cromatográficos e eletroforéticos representam boas ferramentas para separar as frações caseínicas. Assim, tem-se utilizado a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia de troca iônica (CTI), cromatografia por exclusão molecular (CEM). Recentemente, novos métodos têm sido desenvolvidos baseados em eletroforese capilar (CE) e cromatografia eletrocínética micelar (MEKC), que usam dodecil sulfato de sódio (SDS) e ditioneitol (DTT), com o objetivo de aumentar a solubilidade destas proteínas na água. Todos estes métodos exigem longo tempo de análise e são trabalhosos (BRAMANTI et al., 2001).

A problemática atual de obter proteínas com alto grau de pureza, especialmente na área farmacêutica e alimentar, tem alavancado o desenvolvimento de técnicas de separação, purificação e quantificação, que podem ser aplicadas em larga escala, com os requisitos de elevado rendimento, baixo custo e ao mesmo tempo permitindo a reciclagem dos reagentes utilizados no processo produtivo. Um método com potencial para estas aplicações é a extração líquido-líquido com sistemas aquosos bifásicos.

1.4 Sistemas aquosos bifásicos

Com o desenvolvimento da biotecnologia, há um crescente interesse em métodos eficientes para a separação e purificação em larga escala de produtos de fermentação, enzimas intracelulares e proteínas biologicamente ativas que se encontram misturadas com outros componentes celulares (HUSTED et al., 1985). Assim, nos últimos anos, os sistemas aquosos bifásicos (SABs) têm adquirido importância e crescente sucesso na área da biotecnologia de isolamento e separação de proteínas. SABs têm sido usados na separação de proteínas do soro (COIMBRA, 1995) e na concentração e purificação de outras biomoléculas (ALBERTSSON, 1986).

Dentre os diferentes SABs, o mais estudado e comumente empregado é aquele composto por polietilenoglicol (PEG), dextrana (Dex) e água. Separações de macromoléculas biológicas, como células e proteínas, realizadas com esses sistemas, geram uma fase superior, rica em PEG, e

outra inferior, rica em dextrana. As fases contêm entre 80 e 90 % de água, o que favorece a estabilidade de biomoléculas durante a separação, quando comparada com sistemas de extração orgânicos tradicionais (TJERNELD, 1992). Como exemplo, pode-se citar a separação de albumina de soro bovino e β -lactoglobulina, em que foram avaliados os diferentes parâmetros que afetam a partição destas nos SABs (DOUBLIER et al., 2000).

Os SABs são também utilizados na determinação de hidrofobicidade relativa e carga média da superfície de biocompostos. Várias propriedades e funções biológicas de biopolímeros, como estabilidade contra agentes desnaturantes, interações com ligantes, receptores, membranas biológicas, dentre outras, são discutidas em termos de hidrofobicidade polimérica (ZASLAVSKY, 1995).

Assim, os SABs apresentam as seguintes vantagens em relação a outros métodos de separação e purificação de biocompostos (ALBERTSSON, 1986; BOLOGNESE et al., 2005):

1. Facilidade e rapidez no preparo;
2. Curto tempo do processo;
3. Podem ser aplicáveis em processos contínuos;
4. A separação dos componentes é seletiva e rápida;

Os SABs são, então, sistemas formados por duas fases líquidas que se encontram em equilíbrio termodinâmico. As fases são regiões que possuem propriedades termodinâmicas intensivas diferentes, como densidade, índice de refração, pressão, temperatura e composição. Mas como as duas fases estão em equilíbrio, nenhuma propriedade termodinâmica está variando em uma dimensão temporal, ou ainda, não há troca resultante de matéria e energia entre as fases (ALBERTSSON, 1960); assim, pode-se obter SABs (ALBERTSSON, 1986; BOLOGNESE et al., 2005):

- a) Ao misturar, em meio aquoso, dois polímeros de cadeia flexível ou um polímero e um sal (fosfato de potássio, sulfato de sódio, etc.) acima de certa concentração, temperatura e pressão críticas. Neste caso, as duas fases são formadas espontaneamente, uma rica em um polímero e a outra rica no outro polímero ou no sal;

- b) Ao aquecer uma solução de um polímero acima de certa temperatura crítica. Aqui uma das fases é enriquecida com o polímero e a outra com o solvente.

A variação das propriedades termodinâmicas pode ser provocada por diferentes tipos de forças motrizes. Forças mecânicas tendem a causar a transferência de energia na forma de trabalho; diferenças de temperaturas tendem a provocar transferência de energia na forma de calor; diferentes potenciais químicos tendem a acarretar reações químicas ou transferência de substâncias de uma fase para a outra. Em um sistema em equilíbrio todas estas forças estão equilibradas (SMITH et al., 2000).

Quando um quarto composto é adicionado ao sistema, a condição de equilíbrio de fases é modificada de acordo com as propriedades físicas e químicas deste elemento. Assim, poderá ocorrer a transferência preferencial deste para uma das fases e o grau de partição pode ser quantificado por meio do coeficiente de partição (ALBERTSSON, 1960), k , definido como:

$$k = \frac{[M]_{\text{sup.}}}{[M]_{\text{inf.}}}$$

Em que $[M]_{\text{sup.}}$ e $[M]_{\text{inf.}}$ são as concentrações do soluto nas fases superior e inferior, respectivamente. O k depende tanto das características do composto que se distribui, como a massa molar, a carga, a hidrofobicidade superficial, etc., quanto da natureza do SAB usado. Conseqüentemente, a escolha das condições experimentais adequadas permitirá empregar os SABs para a extração das proteínas de uma mistura, fazendo com que a mesma se transfira preferencialmente para uma das fases e as impurezas para a outra fase.

Os SABs podem ser classificados em dois tipos principais: os compostos por diferentes polímeros e os que contêm apenas um polímero. A Tabela 5 lista alguns exemplos de SABs.

Tabela 5. Sistemas aquosos bifásicos típicos

Polímero	Polímero
Polietilenoglicol	Dextrana Ficoll Hidroxipropil-amino (HPS) Polivinil álcool (PVA) Polivinil pirrolidona (PVP) Maltodextrina (MD)
Polipropilenoglicol	Maltodextrina
Polímero	Sal
PEG-copolímeros	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $\text{NH}_2\text{CO}_2\text{NH}_4$ Na_2HPO_4 K_2CO_3 K_3PO_4 K_2HPO_4 , KH_2PO_4 Na_2SO_3 FeSO_4

(ROGERS, 1999; MACHADO, 1999 e SILVA, 2000).

Estudos empíricos com SABs mostraram que a distribuição de proteínas é função de diversas características do sistema, como:

1. *Massa molar (MM) do polímero*: a massa molar do polímero exerce influência sobre a partição, alterando o equilíbrio e o número de interações entre o polímero e a proteína. Em geral, o aumento da MM do polímero, que enriquece uma das fases, causará a migração do biocomposto para a outra fase. Entretanto, este efeito diminui com o aumento da cadeia polimérica. O efeito da alteração da MM do polímero é, por sua vez, dependente da MM da proteína a ser particionada. Proteínas de grande MM, são mais influenciadas por mudanças da MM do polímero do que as proteínas com baixa MM. Por exemplo, ALBERTSSON (1986), usando os sistemas formados por PEG 6000/Dex 40 e PEG 6000/Dex 500 para partição do citocromo C, observou que o coeficiente de partição da biomolécula foi pouco afetado (de 0,18 para 0,17) com a elevação da MM da dextrana. Já para a β -galactosidase, de maior MM que o citocromo C, o coeficiente de partição aumentou de 0,24 para 1,59 nas mesmas

condições. Polímeros com diferentes MMs podem ser usados para otimizar a separação de proteínas de tamanhos variados.

MACHADO (1999), utilizando um sistema composto por PEG e MD para partição de células microbianas, observou que, com o aumento da MM do PEG, as células migraram para a fase inferior, rica em MD, diminuindo o k . Um aumento da MM do PEG de 4000 para 8000 g mol⁻¹ provocou um decréscimo de 70 vezes no valor de k .

GIRALDO-ZUÑIGA et al. (2001), empregando SABs formados por PEG e fosfato de potássio (FFP) para a separação de proteínas do soro de queijo, observaram que os coeficientes de partição da α -la diminuíram com o aumento da MM do PEG. Para a β -lg foi verificada uma tendência inversa, isto é a elevação de k com o aumento da MM do PEG, exceto para PEG 8000.

2. *Concentração dos polímeros*: partículas como organelas e células fragmentadas são adsorvidas mais fortemente na interface de SAB com o aumento da concentração dos polímeros. A elevação na concentração dos polímeros pode provocar o deslocamento da curva binodal e do ponto crítico, além de alterar a composição das fases. Como resultado, substâncias solúveis, como proteínas, são distribuídas preferencialmente para uma das fases, modificando assim o coeficiente de partição (ALBERTSSON et al., 1990). Na avaliação da partição de células microbianas em SABs compostos por PEG 4000 e MD, MACHADO (1999) observou que o aumento da concentração de PEG diminuiu o k , ou seja, quanto maior foi a concentração de PEG maior número de células de *Lactobacillus acidophilus* migrou para a fase inferior, rica em maltodextrina.
3. *Potencial hidrogeniônico*: o valor do pH altera as cargas da superfície das proteínas e, conseqüentemente, o coeficiente de partição (LEHNINGER, 1976). Um exemplo clássico é a desnaturação de proteínas devido à redução do pH. A distribuição de proteínas desnaturadas em soluções líquidas é diferente daquela obtida em seu estado natural, por apresentarem área superficial significativamente maior que na forma nativa. SCHMIDT et al. (1994), constataram o aumento do k da α -amilase, de 0,7 para 20, com elevação do pH de 5,3 para 9,5.

4. *Sais*: a presença de sais em SABs compostos por polímero/polímero influencia a partição da maioria das espécies de moléculas e partículas celulares (ASENJO, 1990). No caso de células microbianas, para sistemas compostos por PEG 400 e MD, foi verificado que o k diminuiu com a adição de sal. Quando foi feita a adição de 0,9 % de NaCl, o k das células caiu drasticamente de 0,84 para 0,08 (MACHADO, 1999). HAN e LEE (1997) observaram, para um SAB constituído de PEG e Dex, que a incorporação de sais de fosfato ocasionou uma redução do k da albumina de soro bovino (BSA) cuja superfície é carregada negativamente. No entanto o k da lisozima, que é carregada positivamente, aumentou com a adição de fosfato.
5. *Carga dos polímeros*: polietilenoglicóis carregados ionicamente têm sido usados para direcionar a partição de proteínas. Os carregados positivamente, como na forma de trimetilamina-PEG, concentram compostos com carga negativa na fase superior, rica em PEG. Os compostos com carga positiva são então excluídos da fase rica em PEG. Polietilenoglicóis carregados negativamente apresentam uma tendência de atuação inversa (ALBERTSSON, 1986).
6. *Grupos hidrofóbicos*: quando são usadas baixas concentrações de PEG carregado com grupos hidrofóbicos (em torno de 1 mM), como por exemplo o palmitato, ocorre uma elevação da afinidade de proteínas com sítios hidrofóbicos pela fase superior (ALBERTSSON et al., 1990). BERGGREN et al. (1995) observaram que o k de algumas proteínas com baixa hidrofobicidade não foi significativamente afetado pela presença de polímeros hidrofóbicos e sais na constituição das fases. No entanto, o k de uma proteína com alta superfície hidrofóbica foi fortemente influenciado pelo aumento da hidrofobicidade do polímero constituinte do SAB.
7. *Temperatura*: a influência da temperatura sobre a partição de biomoléculas é percebida de maneira indireta. A temperatura pode levar a mudanças na viscosidade das fases ou na estrutura dos polímeros, alterando a forma da curva binodal no diagrama de fases (CARVALHO, 2004). Os sistemas com constituição próxima à composição do ponto crítico são mais afetados por mudanças de

temperatura, devido à instabilidade inerente à região do ponto crítico. Um deslocamento da curva binodal pode levar o sistema facilmente para a região monofásica. Para SABs formados por PEG e MD, foi observado um aumento na inclinação das linhas de amarração com a elevação da temperatura do sistema (MACHADO, 1999). O mesmo comportamento foi observado para sistemas PEG e sal (SILVA, 2000). Os autores observaram ainda que houve uma tendência de deslocamento da curva binodal para regiões mais concentradas de PEG e sal quando houve uma diminuição da temperatura.

Em princípio, todos os tipos de SABs podem ser empregados na separação de biomoléculas, embora para uso em escala industrial a dextrana apresente custo muito alto. Os sistemas PEG-sais apresentam custo reduzido e propriedades físicas favoráveis à operação em larga escala, como elevada seletividade e diferenças de densidade e viscosidade entre as fases, adequadas para o trabalho com equipamentos de extração disponíveis no mercado (SINHA et al., 1996). A separação de fases, por exemplo, é atingida mais rapidamente, o que facilita o uso de sistemas polímero-sal em aplicações industriais. Estes sistemas são formados à temperatura ambiente, sendo a fase superior rica em PEG e a fase inferior rica em sal (HUSTED, 1985; GIRALDO-ZUÑIGA, 2000). A purificação de proteínas, em grande escala, empregando SABs em uma das etapas do processo pode, então, ser considerada uma técnica alternativa e economicamente viável aos processos tradicionais de purificação de biomoléculas. Algumas aplicações de SABs são listadas na Tabela 6.

Tabela 6. Aplicações da extração de biomoléculas com SAB

Biomolécula	Sistema
Pululanase	PEG-Dx
Formaldeído desidrogenase	PEG-Dx
Fumarase	PEG-fosfato
β -galactosidase	PEG-fosfato
α -glucosidase	PEG-fosfato
Superóxido dismutase	PEG-fosfato
Lactato desidrogenase	PEG-aquafase

(COIMBRA et al. (2003)).

1.4.1 Constituintes das fases

1.4.1.1 Polietilenoglicol

O *polietilenoglicol*, $\text{HO}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{H}$, é um polímero sintético, hidrofílico, não iônico e juntamente com os outros polímeros sintéticos, constituem a base para as indústrias de plásticos, embalagens, fibras, adesivos, tintas e esmaltes (MURRAY e JENKINS, 1994). É obtido a partir da ligação de polímeros de oxietileno de massa molar menor que 40000 g mol^{-1} com metóxido de sódio ou hidróxido alcalino (HANS, 1984). Devido ao seu caráter não tóxico, pode também ser usado em cosméticos, alimentos e produtos farmacêuticos. Na indústria de alimentos é usado como veículo em adoçantes de mesa e suplementos vitamínicos e, ou, minerais (COIMBRA, 1995).

1.4.1.2 Sais: sulfato de amônio, sulfato de zinco, sulfato de lítio e fosfato de potássio (monobásico e dibásico)

Sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$): é um sal totalmente solúvel em água, cuja coloração varia do branco ou dourado ao marrom acinzentado; quimicamente, o sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ é um sal que contém 21,0 % de nitrogênio amoniacal ($\text{N}-\text{NH}_4^+$) e 24,0 % de enxofre na forma de sulfato ($\text{S}-\text{SO}_4$)₂. Essas características fazem do sulfato de amônio um adubo de ação rápida e eficiente. É importante destacar que a cor apresentada pelo produto não interfere na sua utilização (HONEYWELL, 2004).

Sulfato de zinco (Zn_2SO_4): também conhecido como sal de zinco, é totalmente solúvel em água. É um pó cristalino branco e utilizado na fabricação de *rayon*, como conservante para madeira, reagente químico e como suplemento dietético (DSSPMNJ; 2005).

Sulfato de lítio (Li_2SO_4): possui solubilidade de 35,64 g/100 mL, em água a 18 °C. É um componente de interesse tecnológico com aplicações na detecção de radiação a laser, como um elemento ótico de transmissão de imagens, na fabricação de cristais de alta resistência e na indústria farmacêutica. Em elevadas temperaturas, apresenta altos valores de

condutividade iônica, o que torna possível a sua aplicação na armazenagem de energia e em sistemas de conversão. O sulfato de lítio pode ser utilizado na recuperação de soluções com a adição de agentes precipitantes, como anti-solventes, em função da sua solubilidade invertida e da pequena variação da solubilidade com a temperatura. Esta técnica é uma alternativa para a recuperação deste sal visando substituir a precipitação por congelamento e evaporação (TABOADA, 2002).

Fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4): é branco, higroscópico, solúvel em água e ligeiramente solúvel em álcool. Pode ser convertido em pirofosfato por ignição. A solução aquosa formada com este sal é ligeiramente alcalina (pH entre 8,7 e 9,3 quando em solução de 50 g/L de água). Possui solubilidade em água igual a 160 g/100 mL, a 20 °C (SIGMA-ALDRICH, 2001).

Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4): também possui a cor branca e é granulado. Apresenta solubilidade em água igual a 22,2 g/100 mL, a 20°C. É insolúvel em álcool. Apresenta pH entre 4,4 e 4,7 quando em solução de 50 g/L de água (SIGMA-ALDRICH, 2001).

1.4.1.3 Açúcar

Maltodextrina ($(C_6H_{12}O_5)_n H_2O$): polímero sacarídeo nutritivo que consiste de unidades de D-glucose, unidas principalmente por ligações $\alpha(1-4)$ e que tem uma dextrose equivalente (DE) menor que 20. É preparada na forma de pó branco ou solução concentrada por hidrólise parcial de amido de milho com ácido e, ou, enzimas (Mc PHERSON e SEIBRA, 1997). A massa molar média da maltodextrina, aproximadamente 1800 g mol^{-1} para uma DE 10, mostra que o hidrolisado é composto de polímeros menores que o amido original (KENYON, 1995). Quanto maior a DE maior a solubilidade e menor a viscosidade da maltodextrina. A maltodextrina é solúvel em água a 90 °C, na concentração de 20,0 a 40,0 % (m/m), mas, sob resfriamento, forma um gel opaco que se desfaz de forma reversível de 60°C a 75°C (Mc PHERSON e SEIMBRA, 1997). A maltodextrina é biodegradável, de baixa higroscopicidade e sua cristalização pode ser controlada. É largamente usada no encapsulamento de aromas e aditivos, sendo empregada também como espessante de alimentos (APPL, 1991).

1.5 Cromatografia de exclusão molecular

Na separação de produtos biológicos podem ser utilizados, entre outros, os métodos cromatográficos tendo em vista sua elevada eficiência de separação. A Tabela 7 apresenta algumas operações cromatográficas usadas na purificação de proteínas em larga escala.

Tabela 7. Operações cromatográficas usadas na purificação de proteínas em grande escala.

Propriedades físicoquímicas	Operação	Características	Uso
Forças de Van der Waals, polaridade, momento dipolar.	Absorção	Alta resolução, boa capacidade e velocidade.	Sorção, fracionamento.
Carga	Troca iônica	Alta resolução, velocidade e capacidade.	Sorção, fracionamento.
Superfície hidrofóbica	Inter. hidrofóbica	Boa resolução, velocidade e capacidade.	Fracionamento Parcial
Afinidade biológica	Afinidade	Excelente resolução, alta capacidade e velocidade.	Fracionamento, adsorção.
Tamanho molecular	Exclusão molecular	Moderada resolução, baixa capacidade.	Dessalinização, troca de tampão, purificações.
Interação hidrofóbica	Fase reversa	Excelente resolução e capacidade intermédia	Fracionamento

(ASENJO, 1990)

Destes métodos, destaca-se a cromatografia por exclusão molecular (CEM). Esta técnica é empregada para o isolamento de macromoléculas desde 1959 (IRVINE, 1997), e tem por fundamento o tamanho molar das mesmas (GARCIA et al., 2000). Assim, compostos com massas molares

diferentes são separados em tempos de retenção diferentes. É uma metodologia de fácil execução empregada para a determinação da massa molar de substâncias, para o fracionamento de compostos e para a separação de grupos de misturas multicomponentes como, sais e proteínas (IRVINE, 1997; NIELSEN, 1998) .

A cromatografia de exclusão molecular é um método físico-químico do tipo líquido-líquido utilizado na separação dos componentes de uma mistura, com base nas suas dimensões moleculares usando, para tanto, um leito composto por partículas eletricamente descarregadas. Uma das fases permanece estacionária enquanto a outra se move através dela. Durante a passagem da fase móvel pela estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais desses componentes (LOUGH et al., 1996; COLLINS et al., 1997). Segundo FISCHER (1974), na CEM, as moléculas maiores migram com maior velocidade através do leito, enquanto que as menores são retardadas. Para determinados grupos de substâncias existe uma correlação muito íntima entre a massa molar e seu tempo de retenção.

Essa técnica pode ser aplicada em nível analítico ou preparativo e apresenta uma elevada resolução de picos de separação dos solutos durante a eluição. Na cromatografia líquida preparativa (escala comercial) procura-se não somente uma elevada resolução, mas também a economia global do processo. O método clássico para aumentar a produtividade é o de maximizar o uso da coluna utilizando maiores volumes da amostra (RAHMS, 1993).

Na prática, a CEM é normalmente utilizada no final do processo de purificação visando mudar a fase móvel por outra que possa ser volatilizada durante uma etapa posterior de liofilização ou de concentração, bem como para remover as moléculas contaminantes de baixa massa molar, como sais, polipropileno e detergentes não iônicos dentre outros (FALLOW, 1993). A remoção de compostos de baixa massa molar é denominada de dessalinização, mesmo que sais não estejam envolvidos no processo. A dessalinização é a aplicação da CEM mais difundida no processo de purificação de proteínas, sob condições que não desnaturem as proteínas (ROJAS, 2001).

De acordo com GARCIA et al. (2000), a característica peculiar da CEM em relação aos outros tipos de cromatografia de partição é que as partículas que formam a fase estacionária no leito cromatográfico são constituídas por um gel sem carga. Este gel apresenta turgescência no mesmo solvente que atua como fase móvel através do leito. As matrizes utilizadas na CEM são macromoléculas que tem grande afinidade pelo solvente empregado. Estas matrizes apresentam intercruzamentos formando uma rede tridimensional, tornando-as insolúveis. Ao entrarem em contato com o líquido absorvem grandes quantidades do solvente devido à porosidade exibida .

O gel é uma rede tridimensional, cuja estabilidade mecânica é devida às ligações cruzadas em sua estrutura. Muitas substâncias, tais como os polissacarídeos de frutas, raízes, proteínas, silicatos orgânicos e fosfatos, podem formar géis. A combinação adequada destes compostos com um agente de reticulação pode originar um gel em presença de solventes compatíveis (FISCHER, 1974). A microestrutura do gel pode ser homogênea ou heterogênea; a diferença entre estas se baseia na distribuição das partículas do gel dentro da coluna (YOST et al., 1980).

Os diferentes tipos de gel utilizados na CEM variam de acordo com o material, sua forma de fabricação e o limite de exclusão molecular (LEM). Dentre os principais tipos de géis, destacam-se os de dextrana (Shepadex®), os de poliacrilamida (Bio-gel®), os de agar e agarose (Sheparose®, Gelarose®, Bio-gele®, Sagarav®, Shepacril®, Sheparoce®) e os rígidos do tipo divinilbenzeno (Shodex®) (FISCHER, 1974; IRVINE, 1997).

Os géis de dextrana como Shepadex® apresentam elevado teor de hidroxilas, forte caráter hidrofílico, elevada turgescência em água ou em soluções aquosas, são estáveis entre pH 2 a 11 e o limite de exclusão de massa molar localiza-se entre 700 a 800000 Da (COLLINS et al., 1997).

O gel Shepadex® pode ser muito útil na dessalinização ou na remoção de compostos de baixa massa molar e soluções contendo proteínas. Estes tipos de géis, especificamente o Shepadex® G-25, também podem ser usados quando for necessário mudar o tampão inicial antes de uma etapa de concentração ou de liofilização para evitar problemas de

corrosão no equipamento ou eliminar substâncias estranhas à biomolécula (FISCHER, 1974; COLLINS et al., 1997, PHARMACIA BIOTECH, 1998).

Na CEM, a separação por grupos ocorre devido ao efeito estérico, já que existe uma diferenciação no acesso ao volume do poro do gel para moléculas de tamanhos variados. Os compostos de baixas massas molares, como um sal, penetrarão no poro e serão totalmente retidos, caso o seu tamanho seja muito pequeno se comparado com o do poro da resina de filtração. Se as substâncias têm dimensões intermediárias somente penetrarão uma parte do volume de poro, podendo reduzir a eficiência do processo. No caso em que o composto seja muito grande, como as proteínas, o mesmo será eluído através do volume intersticial da coluna (ROJAS, 2001).

Idealmente, uma pequena quantidade de uma solução de uma mistura multicomponente injetada em uma coluna cromatográfica seria totalmente separada se cada soluto fosse eluído em volumes de retenção diferentes para cada componente. A resolução pode ser aumentada de várias formas. Por exemplo, usando uma coluna de maior comprimento, um gel de melhor seletividade, um volume de amostra pequeno ou baixas vazões, dentre outras (LOUGH e WAINER, 1996).

Além de ser utilizada na separação, quantificação e, ou, recuperação de biocompostos a CEM é também aplicada na determinação da massa molar de proteínas nativas ou desnaturadas, em diferentes condições de pH, de temperatura e força iônica. Permite ainda a obtenção da massa molar de polímeros naturais ou sintéticos, essencial para o controle de qualidade destes mesmos polímeros (ROJAS, 2001).

2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

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

2.1 Materiais

2.1.1 Reagentes

- Polietilenoglicol 1500 g mol⁻¹ (SIGMA-ALDRICH ,Alemanha);
- Polietilenoglicol 4000 g mol⁻¹ (ISO FAR, Brasil);
- Polietilenoglicol 6000 g mol⁻¹ (ISO FAR, Brasil);
- Polietilenoglicol 8000 g mol⁻¹ (FLUKA, Alemanha);
- Fosfato de potássio (monobásico e dibásico, VETEC, Brasil);
- Sulfato de amônio (VETEC, Brasil);
- Sulfato de zinco (VETEC, Brasil);
- Sulfato de lítio (VETEC, Brasil);
- Maltodextrina (FLUKA, Alemanha);
- Gel de separação Sephadex® G-25 (SIGMA-ALDRICH, Alemanha);
- Caseína micelar (SYNTH, Brasil);

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.1.2 Equipamentos

- Cromatógrafo AKTA *purifier* (10/100, PHARMACIA BIOTECH, Suécia);
- Agitador magnético (FISATON, Brasil);
- Balança analítica (M-310, DENVER INSTRUMENT, USA);
- Sistema para eletroforese (Z35-280-2, SIGMA-ALDRICH, Alemanha);
- Centrífuga (5804, EPPENDORF, Alemanha);
- Banho termostático (TE-184, TECNAL, Brasil);
- Espectrofotômetro (CARY 50, Varian, Austrália);
- Vidrarias diversas.

2.2 Métodos

2.2.1 Escolha dos sistemas de trabalho

Os dados de equilíbrio para os sistemas aquosos bifásicos utilizados neste trabalho se basearam nos diagramas de fases de sistemas compostos por polietilenoglicol, sal e água obtidos por CARVALHO (2004) e por polietilenoglicol, maltodextrina e água obtidos por MACHADO (1999). As condições iniciais para CEM foram as mesmas definidas por ROJAS (2001) para a separação de α -lactalbumina e β -lactoglobulina das fases polimérica e salina de SABs formados por polietilenoglicol, fosfato de potássio e água.

2.2.2 Preparo dos sistemas aquosos bifásicos

Foram empregados sistemas contendo polietilenoglicol (PEG) com massas molares médias de 1500, 4000, 6000 e 8000 g mol⁻¹, diferentes sais (sulfato de amônio, sulfato de lítio, sulfato de zinco e fosfato de potássio), ou açúcar (maltodextrina, MD) e água.

Inicialmente foram preparadas soluções estoques de sal 40,0 % (m/m) e PEG 50,0 % (m/m) para obtenção dos sistemas PEG-sal-água. Os valores de pH das soluções salinas utilizadas (sulfato de amônio, sulfato de lítio e sulfato de zinco) foram próximos de 7, não necessitando de ajustes. Para as soluções aquosas de fosfato de potássio, o ajuste do pH em 7 foi obtido

adicionando fosfato de potássio monobásico e dibásico na proporção de 1:1,82, respectivamente.

Soluções estoques de PEG 60,0 % (m/m) e MD 40,0 % (m/m) foram preparadas para formação dos sistemas PEG-MD-água.

Uma vez preparadas as soluções estoques, os SABs foram obtidos adicionando quantidades adequadas destas soluções, caseína e água em tubos graduados de centrífuga, para alcançar uma massa total do sistema de 40 g. Por exemplo para obter o sistema 25,0 % (m/m) PEG 1500 + 13,0 % (m/m) fosfato de potássio, foram misturados 20 g de solução estoque de PEG, 13 g de solução estoque do sal, 1 g da solução da proteína e água até completar a massa de 40 g. A concentração da solução de caseína adicionada ao sistema foi de 1 mg mL⁻¹.

A mistura foi agitada manualmente por, aproximadamente, 5 minutos e então centrifugada a 2000 g por 20 minutos, objetivando acelerar a formação das fases. O sistema foi mantido em repouso durante 12 horas, em banho termostático, na temperatura desejada, para que o equilíbrio fosse atingido.

2.2.3 Medida da densidade

A densidade foi determinada de acordo com o método do picnômetro, utilizando um picnômetro de 10 mL. O picnômetro limpo e seco foi pesado em balança analítica. Em seguida, foi preenchido com água e pesado. O procedimento da pesagem foi repetido com o picnômetro contendo a fase coletada do sistema. A temperatura ambiente foi medida e a densidade da fase foi calculada pela equação :

$$\mathbf{r}_{am.} = \left[\frac{m_{pic+am} - m_{pic+ar}}{m_{pic+água} - m_{pic+ar}} \right] x (\mathbf{r}_{água} - \mathbf{r}_{ar}) + \mathbf{r}_{ar} \quad (1)$$

Em que \mathbf{r} é a densidade da fase, m_{pic+am} é a massa do picnômetro com a amostra, $m_{pic+água}$ é a massa do picnômetro com água, m_{pic+ar} é a massa do picnômetro vazio, $\mathbf{r}_{água}$, \mathbf{r}_{ar} e \mathbf{r}_{am} são, respectivamente, a

densidade da água, do ar e da amostra, à temperatura ambiente (25 ± 1)°C. A densidade foi expressa em g mL^{-1} .

2.2.4 Relação de fases

Para cada tubo foi obtida uma relação entre a massa de água e a altura da coluna de água atingida por esta massa. Partindo da densidade da água, na temperatura ambiente, e da relação $r = \frac{m}{V}$, uma correlação foi obtida em função do volume da água e da altura da mesma no tubo. Desta forma, antes de retirar as alíquotas de cada fase, media-se a altura da fase com régua e calculava-se o volume correspondente. Por exemplo, para o tubo 1 foi obtida a relação, $y = 5,154x - 3,9447$, em que x é a altura medida em cm e y é o volume correspondente em mL. A altura da fase inferior foi lida da base do tubo até a interface e a altura da fase superior foi calculada subtraindo a altura total (medida desde o fundo do tubo até a superfície da fase superior) da altura da fase inferior.

2.2.5 Cálculo do coeficiente de partição

Foram conduzidos estudos de partição, em função da massa molar do polímero (1500, 4000, 6000 e 8000 g mol^{-1}), do tipo de sal, da temperatura utilizada (5, 25 e 45°C) e das concentrações do polímero e do sal ou do açúcar. Em todos os casos foi empregada a proteína pura (caseína), sendo adicionado ao sistema 1 g de solução de caseína (1 mg mL^{-1}) após a mistura dos reagentes formadores das fases (polímero, sal ou açúcar e água).

Após ser atingido o equilíbrio, com duas fases límpidas sendo observadas, uma alíquota da fase superior foi coletada com o auxílio de seringa, até que restasse uma camada de aproximadamente 5 mm acima da interface. Alíquotas da fase inferior também foram coletadas com seringas. Para a coleta da fase inferior as seringas foram introduzidas na célula de equilíbrio e deixadas em repouso por uma hora, tempo suficiente para o restabelecimento do equilíbrio do sistema.

Alíquotas de cada fase foram separadas e diluídas (1:10, v/v), sendo então o conteúdo de caseína em cada fase determinado pelo método de Bradford a 595 nm (BRADFORD, 1976).

Foi construída uma curva analítica da caseína com antecedência. Em cada análise um sistema aquoso bifásico preparado com os mesmos componentes de fases, mas sem proteína, foi utilizado como branco.

Para o cálculo do coeficiente de partição da caseína em sistemas aquosos bifásicos compostos por PEG-sal-água e PEG-MD-água, utilizou-se a equação:

$$k = \frac{[M]_{\text{sup.}}}{[M]_{\text{inf.}}}$$

(2)

Em que $[M]_{\text{sup.}}$ e $[M]_{\text{inf.}}$ são as concentrações da caseína nas fases superior e inferior, respectivamente.

2.2.6 Condições operacionais para a purificação da proteína nas fases por cromatografia de exclusão molecular

As condições cromatográficas iniciais, como estabelecido por ROJAS (2001), partiram da injeção de 0,1 mL de amostra de fase superior, rica em PEG, em uma vazão de 4,0 mL min⁻¹. Para a fase inferior, rica em sal, também foi empregado 0,1 mL de amostra a uma vazão de 2,0 mL min⁻¹.

Foi usado o gel Shepadex® G-25 (médio) e uma coluna HR 10/10 (10 mm de diâmetro interno x 100 mm de comprimento, PHARMACIA BIOTECH, Suécia).

2.2.7 Purificação e quantificação das proteínas presentes nas fases

A purificação da proteína das fases salina e polimérica foi conduzida, em escala semipreparativa, em equipamento ÄKTA Purifier 10/100 (Pharmacia Biotech). O eluente foi monitorado por absorção de UV a 280 nm. Para a quantificação da proteína nas fases provenientes da CEM foi também utilizado o método de Bradford a 595 nm (BRADFORD, 1976).

2.2.8 Eletroforese

Foi utilizada eletroforese em gel de poliacrilamida e SDS, com o objetivo de acompanhar as etapas do processo de purificação da caseína. Foi utilizado o equipamento em sistema vertical de placas, de dimensões 140 mm altura e 160 mm de largura (SIGMA ALDRICH, USA).

3. BIBLIOGRAFIA

ALBERTSSON, P. A.; **Partition of cell and macromolecules**. Stockol:
Almquist & Wiksells, p.231; 1960.

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

ALBERTSSON, P.A.; JOHANSSON, G.; TJERNELD, F.; Aqueous Two-
Phase Separations. In: Juan Asenjo. **Separation Processes in
Biotechnology**. N.Y.; 287-327, 1990.

APPL, R.C.; Confectionery Ingredients from starch. **Food Technology**,
Março, 148-149, 1991.

ASENJO, J. A.; **Separation process in biotechnology**. NY: Marcell Decker,
p. 287, 1990.

BADUI, S.; **Química de los alimentos**; cap 12; 1989.

BERGGREN, K., JOHANSSON, H. O.; TJERNELD, F.; Effects of salts and
the surface hydrophobicity of proteins on partitioning in aqueous two
phase systems containing thermoseparating ethylene oxide-propylene
oxide copolymers. **Journal of Chromatography**, 718:67-79, 1995.

- BRAMANTI, E., FERRI, F., RASPI, G., LAMPUGNANI L., SPINETTI, M.C., MILLER, K.E.; SYNOVEC, R.E.; New method for separation and determination of denatured caseins by hydrophobic chromatography; **Talanta**; 54; 343-349; 2001.
- BRAMANTI, E.; SORTINO, C.; ONOR, M.; BENI, F.; RASPI, G.; Separation and determination of denatured α -, β -, κ -caseins by hydrophobic interaction chromatography in cow', ewes' and goats' milk, milk mistures and chesses; **Journal of chromatography A**; 994; 59-74; 2003.
- BRADFORD, M.M.; A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding; **Analytical Biochemistry**; 72; 248-254; 1976.
- BOLOGNESE, B.; NERLI, B.; PICÓ, G.; Application of tne ATPS of ethylene and propylene oxide copolymer-maltodextrin for ptotein purification; **Journal of chromatography B**; 814; 347-353; 2005.
- CARVALHO, C.; **Estudo de equilíbrio de fases para sistemas aquosos bifásicos compostos por polietilenoglicol, sais e água**.Dissertação de tese de Mestrado em Ciência e Tecnologia de alimentos; Viçosa; UFV; 2004.
- CHEFTEL, J.C.; CUA, J.L.; LORIENT, D.; **Proteínas alimentarias**. Zaragoza: Editorial Acribia, p. 345, 1989.
- COIMBRA, J.S.R.; **Desempenho de um Extrator tipo Graesser na Separação de Proteínas do Soro de Queijo Usando Sistemas Aquosos Bifásicos**, Tese de Doutorado, UNICAMP, Campinas, 129p, 1995.
- COIMBRA, J.S.; GIRALDO ZUÑIGA, A.D.; MINIM, L.A.; MEIRELLES, A.J.; **Uso de sistemas aquosos bifásicos na extração líquido-líquido**; Viçosa; UFV; 2003.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S.; **Introdução a Métodos Cromatográficos**. Editora UNICAMP, SP, 1997.

DALGLEISH, P.G.; **Milk proteins, chemistry and physics** In: FOX P.F.; CONDON, J.J.; (Ed) **Food Proteins** London; Applied science publisher; 1982.

DOUBLIER, J.L.; SIMONET, F.; GARNIER, C.; Partition of proteins in the aqueous guar/dextran two-phase system, **Food hydrocolloids**, v 14, p. 591-600, 2000.

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

DSSPMNJ; **Departamento de salud y servicios para personas mayores de New Jersey**, disponível em: www.state.nj.us/health/eoh/rtkweb/2044sp.pdf, julho, 2005.

FALLOW, A.; BOOTH, R.F.G.; BELL, L.D.; **Laboratory Techniques in Biochemistry and molecular biology-applications of HPLC in biochemistry**, Elsevier, Amsterdam; p.200; 1993.

FISCHER, L.; **Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology An introduction to Gel Chromatography**, Elsevier, NY, p.220, 1974.

FOX, P.F. e McSWEENY, P.L.H.; Rennets: their role in milk ripening. In: LAW, B.A. (Ed.) **Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk**. Second ed. London: Chapman and Hall; 1-59; 1997.

GARCIA, H.; PAVEL, O.P.; GARCIA, J.C.; **Curso Teórico Práctico Purificación de Biomoléculas**. Centro de Investigaciones Biomédicas (CIBIOMED), La Habana, 2000.

GIESE, J.; Proteins as ingredients: types, functions and applications, **Food Technology**; v. 48; 50-60; 1994.

GIRALDO ZUÑIGA A.D.; **Sistemas aquosos polietileno glicol-sal: Separação de α -lactoglobulina e β -lactoglobulina do soro de queijo e hidrodinâmica em um extrator Graesser.**Dissertação Mestrado em Ciência e Tecnologia de alimentos Universidade Federal de Viçosa; Viçosa; 2000.

GIRALDO ZUÑIGA, A. D.; COIMBRA, J. S. R.; MINIM, L. A.; Coeficientes de partição da α -Lactoalbumina e β -Lactoglobulina em sistemas aquosos bifásicos :influência da massa molar do polímero. **Ciência y Tecnología Alimentaria** v. 3, No. 3, p. 149-155, 2001.

HAN, J. H.; LEE, C.H.; Determining isoelectric points of model proteins and *Bacillus subtilis* neutral protease by the cross partitioning using poly(ethylene glycol)/dextran aqueous two phase systems. **Colloids and Surfaces**. 9: 131-137, 1997

HANS, G.E.; **Macromolecules 2: Synthesis, Material, and Technology**, 2. ed., New York: Plenus Press., 1984.

HONEYWELL, disponível em: www.sn-centro.com.br ; Julho, 2005.

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

IGARASHI, Y.; Separation of caseins by chemical procedures; **International Dairy Journal**; 9; 377-378; 1999.

IRVINE, G. B.;Size-exclusion high-performance liquid chromatography of peptides: a review. **Analytical Chimica Acta**, v.352, p. 387-397, 1997.

KENYON, M.M.; **Modified starch, maltodextrin, and corn syrup solids as wall materials for food encapsulation.** In: **Encapsulation and**

controlled release of food ingredients, RISH, S. J., REINECCIUS, G.A., ACS Symposium Series 590, Washington, DC: American Chemical Society, 1995.

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

LOUGH, W.J.; WAINER, I.W.; **Chromatography: Fundamental Principles and Practice**, London, p. 276, 1996.

LYNCH, H.J.M.; BARBANO, D.M.; FLEMING J.R.; Indirect and direct determination of the casein content of milk by Kjeldahl nitrogen analysis: collaborative study; **Journal AOAC International**; 81; 703-774; 1998.

MACHADO, F.L.C; **Equilíbrio de fases para sistemas aquosos bifásicos compostos de polietilenoglicol-maltodextrina-água**; Dissertação Mestrado; UFV, Viçosa, 1999.

Mc PHERSON, A. E.; SEIBRA, P.A.; Preparation and properties of wheat and corn starch maltodextrins with a low dextrose equivalent. **Cereal Chemistry**, v.47, n.4, p. 424-430, 1997.

MURRAY, J. N.; JENKINS, A. D.; **Properties of Liquids and Solutions**, 2.ed., New York: J. Wiley, p. 303, and 1994.

MUIR, D.D.; **Milk chemistry and nutritive value**, In: EARLY R. (Ed). The technology of dairy products; second edition; London; Blackie Academic and Professional; 1998.

NIELSEN, S.S.; (Ed) **Food Analysis**, Aspen publishers, Inc Maryland, p. 630, 1998.

NIVEN, G. W.; Separation processes for biotechnology in the food industry. In: **Food processing: recent developments**. Elsevier Science. N.Y, 1995, p. 143-195.

PHARMACIA BIOTECH. **Desalting and Buffer Exchange With Sephadex G-25**, Sweden, p.1-5, 1998.

RAHMS, I. L.; (Ed.), **Gel filtration, Principles and Methods**, Sweden, p.67, 1993.

ROGERS, P.P.; **Utilization of polyethylene glycol en industrial and environmentally important separation**; Tuscaloosa Department of Chemistry the University of Alabama; 1999.

ROJAS, E. E. G.; **Separação e Purificação de alfa-lactoalbumina e beta-lactoglobulina pela Cromatografia por Exclusão Molecular após a Extração com Sistemas Aquosos Bifásicos**. Dissertação de mestrado, UFV, Viçosa, 2001.

SGARBIERI, V.C.; **Proteínas em alimentos protéicos, propriedades, degradações e modificações**. São Paulo; Livraria Varela; 1996.

SCHMIDT, A. S.; VENTON, A. M.; ASENJO, J. A.; Partitioning and purification of α -amylase in aqueous two-phase systems, **Enzyme Microbial Technology**, 16, 131-142 1994

SIGMA-ALDRICH; Catálogo 2001.

SMITH, J.M.; VAN NESS, H.C.; ABBOTT, M.M.; **Introdução à termodinâmica da engenharia química**, 5 ed., Rio de Janeiro: LTC-livros técnicos e científicos, p. 697, 2000.

SINHA, R.; SINGH, S.P.; AHMED, S.; GARG, S.K; Partition of Bacillus alkaline protease in aqueous two-phase systems; **Bio-source Technology**; 55; 163-166; 1996.

SILVA, L.H.M; **Equilíbrio de fases em sistemas aquosos bifásicos: polímero/polímero e polímero/sal**. Tese Doutorado em Engenharia de

alimentos; Universidade Estadual de Campinas; Campinas S.P; UNICAMP, 2000.

SOUTHWARD, R.C.; Utilization of milk components: Casein. In: Robinson, R.K. (Ed); **Modern dairy technology- advances in milk processing**. London: Elsevier Applied Science Publishers; v. 1; cap. 7; 317-368; 1986.

SWAISGOOD, E.H.; **Characteristics of milk** In: FENNEMA O.R. (Ed); Food chemistry; third edition; New York; Marcel Decker; 1996.

SWAISGOOD, E.H.; **Chemistry of the caseins**. In P.F. Fox, Advanced Dairy Chemistry; v. 1; 63-110; London and New York: Elsevier Applied Science; 1992.

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

TJERNELD, F.; Aqueous two-phase partitioning on an industrial scale. In: HARRIS, J. (Ed.) **Polyethyleneglycol chemistry**: biotechnical and biomedical applications. Plenum Press, 423 p, 1992

WALASTRA, P.; On the stability of casein micelles; **Journal of Dairy Science**, v.73; 1965-1979; 1990.

WALKER, A.F.; **The estimation of protein quality**; In: Developments in food proteins ; v. 1; cap. 8; 293-323; 1982

WONG, N.P.; **Fundamentals of dairy chemistry**, 3 ed. New York; Van Nostrand Reinhold Company, p. 799, 1989.

YOST, R.W.; ETTRE, L.S.; CONLON, R.D.; **Introducción a la cromatografía líquida práctica**. Perkin Elmer, p.567, 1980.

ZASLASVSKY, B.Y.; **Aqueous two-phase Partitioning- Physical Chemistry and Bioanalytical Applications**. New York: Marcel Dekker, 1995.

CAPITULO 2
PARTIÇÃO DA CASEÍNA EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS
COMPOSTOS POR POLIETILENOGLICOL ESAIS DE SULFATO E
FOSFATO

RESUMO

Foram obtidos valores do coeficiente de partição da caseína em sistemas aquosos bifásicos contendo polietilenoglicóis de diferentes massas molares (1500, 4000, 6000 e 8000 g mol⁻¹), quatro tipos de sais (sulfato de amônio, sulfato de lítio, sulfato de zinco e fosfato de potássio) e água, nas temperaturas de 5, 25 e 45 °C. A composição dos sistemas foi de 25,0 % (m/m) de polietilenoglicol, 13,0 % (m/m) de sal e 62,0 % (m/m) de água.

A caseína apresentou, em todos os sistemas analisados, maior afinidade pela fase superior, rica em polímero. No sistema contendo sulfato de zinco, a proteína permaneceu, em sua totalidade, na fase polimérica. Para os outros tipos de sistemas salinos, o coeficiente de partição variou de 2,6, para o sistema PEG 8000/sulfato de amônio, a 5 °C, até 10,8 para o sistema PEG 1500/fosfato de potássio, a 25 °C.

Foram escolhidos os sistemas com os maiores valores de coeficiente de partição para recuperação da proteína utilizando cromatografia de exclusão molecular (CEM) obtendo-se uma percentagem de recuperação de

cerca de 99 %. As densidades das fases foram também determinadas em função da massa molar do polímero, do tipo de sal e da temperatura.

Palavras-chave: caseína, sistemas aquosos bifásicos, coeficiente de partição.

1. INTRODUÇÃO

As caseínas são as proteínas predominantes do leite de quase todas as espécies dos mamíferos. Constituem um grupo heterogêneo de glicofosfoproteínas presentes como complexos de cálcio-fosfato conhecidas como micelas, que são partículas esféricas com diâmetros de aproximadamente 100 nm a 200 nm. As micelas são compostas por quatro tipos de caseínas, α_{s1} -, α_{s2} -, β - e κ -caseína, encontradas em uma proporção de 4:1:4:1 (BRAMANTI et al., 2003; PANOUILLÉ et al., 2005).

No leite bovino as caseínas representam aproximadamente 80 a 85 % das proteínas totais e desempenham um papel fundamental na nutrição humana e em diversas aplicações na indústria. Desta maneira, são utilizadas na área de alimentos como aditivos, emulsificantes, adstringentes, proporcionadores de textura e consistência, entre outros. Possuem uma série de outras aplicações não alimentares como nas indústrias de papel, cola e adesivos, tintas e vernizes, têxtil e na indústria de couros. É usada também em dietas nutricionais e produtos medicinais específicos (SGARBIERI, 1996; BRAMANTI et al., 2001).

Os processos de purificação de proteínas são complexos pelo grande número de compostos envolvidos e pela possibilidade de redução da atividade biológica da biomolécula uma vez separada. Os métodos tradicionais para o isolamento e purificação de proteínas envolvem diferentes etapas como a precipitação seguida da cromatografia de afinidade

ou troca iônica, diálise e acabamento do produto, o que requer tempo e representa um custo elevado (CAPEZIO et al., 2005).

Diferentes métodos têm sido utilizados para a obtenção de caseínas, como:

1. Precipitação (AMUNDSON et al., 1982; PEARCE, 1983; OUTINEM et al., 1996; IGARASHI, 1999);
2. Filtração por membranas com base no tamanho e carga da molécula (ZYDNEY, 1998);
3. Diferentes tipos de cromatografia, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia de troca iônica (CTI), cromatografia de exclusão molecular (CEM), etc. (SWAISGOOD, 1992; SWAISGOOD, 1996; LYNCH et al., 1998; NOPPE et al., 1998; GURGEL et al., 2000; BRAMANTI et al., 2001);
4. Eletroforese capilar (MIRALLES et al., 2001).

Nos últimos anos os sistemas aquosos bifásicos (SABs) têm adquirido importância e um crescente sucesso na área da biotecnologia como uma técnica de extração aplicada para o isolamento e separação de proteínas. Existem os que se formam misturando duas soluções de polímeros de cadeia flexível ou um polímero e um sal. O uso de SABs no isolamento e purificação de proteínas apresenta vantagens como: rapidez e facilidade na preparação, baixo custo, possibilidade de serem aplicados em grande escala e de utilizar a extração contínua com a remoção de uma das fases (ALBERTSSON, 1986; COIMBRA et al., 2003). O material a ser separado se divide entre as duas fases aquosas, sendo o grau de separação quantificado usando o coeficiente de partição (k), definido como a razão entre a concentração da proteína na fase superior sobre a concentração na fase inferior (ALBERTSSON, 1986).

A partição de proteínas em SABs depende tanto das propriedades físico-químicas da proteína, quanto das características do sistema, como pH, massa molar do polímero utilizado, tipo do sal adicionado e a concentração destas soluções. Se todos os fatores estiverem sob controle, pode-se esperar uma partição seletiva e excelente separação da proteína (TUBIO et al., 2004). Deste modo, esta técnica é potencialmente atrativa para a obtenção de enzimas e proteínas, devido às diferentes vantagens que apresentam (SCHMIDT et al., 1994).

Diferentes autores utilizaram os SABs como meio de separação de moléculas. ALVES et al. (2000), trabalharam com SABs PEG-fosfato, PEG-citrato e PEG-maltodextrina para a separação de proteínas do soro (α -lactalbumina e β -lactoglobulina), albumina de soro bovino e insulina porcina. BOLOGNESE et al. (2005) e DOUBLIER et al. (2000) separaram a albumina de soro bovino e β -lactoglobulina, usando SABs compostos por óxido de propileno-maltodextrina e goma-dextrana, respectivamente.

SABs formados por PEG e sais de fosfato foram usados na separação de albumina de soro bovino (FARRUGGIA et al., 2003), xilose redutase de *Candida Moggi* (MAYERHOFF et al., 2004), proteínas do soro (ROJAS et al., 2004) e proteínas do leite (CAPEZIO et al., 2005).

Os SABs podem ser também utilizados como uma técnica de pré-purificação seguida de técnicas mais seletivas de purificação, assim como a cromatografia e a eletroforese (ROJAS et al., 2004). Entre as técnicas cromatográficas, pode-se citar a cromatografia de exclusão molecular (CEM), que é utilizada por preservar a estrutura da proteína e também por sua fácil aplicação na determinação de massa molar de compostos, o fracionamento de substâncias e a separação de sistemas multicomponentes (IRVINE, 1997; NIELSEN, 1997).

Os objetivos deste trabalho foram estudar a partição da caseína em sistemas aquosos bifásicos formados por PEG, sal e água, em função da massa molar do polímero, do tipo de sal, da concentração do sal e do polímero e da temperatura na qual foi alcançado o equilíbrio. Foram também conduzidos estudos de purificação da proteína por CEM, bem como foram determinados dados de densidade das fases dos sistemas avaliados.

2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.1 Materiais

Para o preparo dos SABs foram utilizados polietilenoglicóis de massas molares 1500 g mol^{-1} (SIGMA-ALDRICH, Alemanha), 4000 g mol^{-1} (ISO FAR, Brasil), 6000 g mol^{-1} (ISO FAR, Brasil) e 8000 g mol^{-1} (FLUKA, Alemanha); sulfato de amônio, sulfato de lítio, sulfato de zinco e fosfato de potássio (monobásico e dibásico) (VETEC, Brasil); caseína micelar (SYNTH, Brasil). Todos os reagentes possuíam grau analítico.

Para a CEM, utilizou-se gel Sephadex® G-25 (SIGMA-ALDRICH, Alemanha), uma coluna HR 10/10 (PHARMACIA BIOTECH, Suécia) e como fase móvel, água ultrapura obtida do sistema Milli-Q (MILLIPORE Inc.; USA).

2.2 Escolha dos sistemas de trabalho

O sistema aquoso bifásico formado por 25,0 % (m/m) PEG, 13,0 % (m/m) sal e 62,0 % de água, foi o sistema escolhido a partir de testes preliminares (Apêndice 1) para avaliar a influência das diferentes variáveis sobre o coeficiente de partição.

Para isso foram utilizados os diagramas de equilíbrio determinados por CARVALHO (2004).

2.3 Preparo dos sistemas aquosos bifásicos

Os sistemas aquosos bifásicos compostos por PEG-sal foram obtidos partindo-se da mistura de soluções estoques de PEG 50,0 % (m/m), sal 40,0 % (m/m) e água. As soluções estoques foram agitadas magneticamente por aproximadamente uma hora.

Uma vez preparadas as soluções estoques, os SABs foram obtidos adicionando quantidades adequadas de PEG, sal, proteína e água aos tubos, para alcançar uma massa total do sistema de 40 g. Por exemplo, para obter o sistema 25,0 % (m/m) PEG 1500 + 13,0 % (m/m) fosfato de potássio (FFP), foram misturados 20 g de solução estoque de PEG, 13 g de solução estoque do sal, 1 g da solução aquosa da proteína (1mg mL^{-1}) e água até completar a massa de 40 g. A mistura foi agitada manualmente por, aproximadamente, 5 minutos e então centrifugada ($2000\text{g} \times 20\text{ min}$; centrífuga 5804, EPPENDORF, Alemanha), objetivando acelerar a separação das fases. O sistema foi mantido em repouso durante 12 horas na temperatura desejada (banho termostático TE-184, TECNAL, Brasil), para que o equilíbrio fosse atingido. Um sistema com os mesmos componentes de fases sem proteína foi usado em cada caso como branco, para quantificação da proteína nas fases.

2.4 Medida da densidade

A densidade foi determinada de acordo com o método do picnômetro, utilizando um picnômetro de 10 mL. O picnômetro limpo e seco, foi pesado (balança analítica M-310, DENVER INSTRUMENT, USA). Em seguida, foi preenchido com água e novamente pesado. O procedimento da pesagem foi repetido com o picnômetro contendo a fase coletada do sistema. A temperatura ambiente foi medida e a densidade da fase foi calculada pela equação:

$$\mathbf{r}_{am.} = \left[\frac{m_{pic+am} - m_{pic+ar}}{m_{pic+água} - m_{pic+ar}} \right] x (\mathbf{r}_{água} - \mathbf{r}_{ar}) + \mathbf{r}_{ar}$$

(1)

Em que ρ é a densidade da fase, m_{pic+am} é a massa do picnômetro com a amostra, $m_{pic+agua}$ é a massa do picnômetro com água, m_{pic+ar} é a massa do picnômetro vazio, ρ_{agua} , ρ_{ar} e ρ_{am} são, respectivamente, a densidade da água, do ar e da amostra, à temperatura ambiente (25 ± 1 °C). A densidade foi expressa em $g\ mL^{-1}$.

2.5 Determinação do coeficiente de partição

O coeficiente de partição foi definido como:

$$k = \frac{[M]_{sup.}}{[M]_{inf.}}$$

(2)

Em que $[M]_{sup.}$ e $[M]_{inf.}$ são as concentrações da proteína nas fases superior e inferior, respectivamente.

2.6 Quantificação da proteína

Após o equilíbrio ter sido atingido, alíquotas de cada fase foram coletadas, diluídas (1:10, v/v) e o conteúdo de proteína de cada fase foi quantificado segundo o método de Bradford a 595 nm (BRADFORD, 1976) (Espectrômetro Cary 50). Uma curva analítica foi previamente construída usando a caseína pura.

2.7 Purificação da proteína após extração com sistemas aquosos bifásicos

A purificação da proteína presente nas fases (polimérica e salina) dos sistemas foi feita em escala preparativa utilizando o cromatógrafo ÄKTA Purifier 10/100 (PHARMACIA BIOTECH, Suécia).

As condições operacionais utilizadas para a purificação da caseína após a extração com SABs foram as estabelecidas por ROJAS (2001), como apresentado na Tabela 2. O gel utilizado foi o Shepadex® G-25 (médio), empacotado em uma coluna HR 10/10 (10 mm de diâmetro x 100 mm de comprimento, PHARMACIA BIOTECH, Suécia).

Para a quantificação da proteína coletada após a eluição das fases foi utilizado o método de Bradford a 595 nm (BRADFORD, 1976).

Tabela 2. Condições cromatográficas utilizadas

Condições	Vazão da fase móvel (mL/min)	Volume de amostra (mL)	Matriz (Shepadex® G- 25)	fase
C ₁	2,0	0,1	média	salina
C ₂	4,0	0,1	média	polimérica

2.8 Cálculo do comprimento da linha de amarração

A equação utilizada para o cálculo do comprimento da linha de amarração (TLL) foi aquela usada por MAYERHOFF et al. (2004), na partição de *Candida mogii* em SABs:

$$TLL = \sqrt{(P_s - P_l)^2 + (S_s - S_l)^2} \quad (3)$$

Em que P_s e P_l, são as concentrações do polímero nas fases superior e inferior, respectivamente, e S_s e S_l as concentrações do sal em cada uma das fases.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Determinação do coeficiente de partição da caseína

O coeficiente de partição foi calculado utilizando PEG de diferentes massas molares (1500, 4000, 6000 e 8000 g mol⁻¹), quatro tipos de sais (sulfato de amônio, sulfato de lítio, sulfato de zinco e fosfato de potássio) e água, em diferentes temperaturas (5, 25 e 45 °C).

O coeficiente de partição foi em todos os casos maior que a unidade, $k > 1$ (Apêndice 2, Tabela 1), o que mostra que a maior parte da proteína adicionada no sistema migrou para a fase rica em PEG. Este comportamento foi observado com os SABs compostos por PEG-fosfato de potássio, PEG-sulfato de lítio e PEG-sulfato de amônio, enquanto que para os sistemas formados por PEG-sulfato de zinco a proteína permaneceu em sua totalidade na fase superior.

A afinidade da caseína pela fase polimérica se deve, entre outros fatores, à facilidade da mesma em associar-se a compostos de elevada massa molar. Esta afinidade é devido, em parte, à composição de aminoácidos apolares da caseína que estão distribuídos de forma aleatória na cadeia peptídica e que proporcionam à molécula de caseína uma hidrofobicidade média. Em adição, este comportamento também pode ser atribuído ao elevado percentual de ácidos aspártico e glutâmico da caseína, que com os grupos carboxilas livres orientados para o exterior da micela, geram cargas negativas ao redor do colóide, ionizando-o o que faz que este

seja repellido pelos íons do sal (BADUI, 1989; CHEFTEL, 1989; DALGLEISH, 1997).

Assim, a afinidade da caseína pela fase superior pode ser atribuída tanto ao grau de hidrofobicidade da molécula quanto às cargas negativas que envolvem o coloide, provocando sua exclusão da fase salina.

3.2 Efeito da massa molar do polímero sobre o coeficiente de partição

A influência da variação da massa molar do PEG sobre o k é mostrada de forma gráfica nas Figuras 1 a 3, em função da temperatura e para cada tipo de sal. Em todos os casos tem-se o mesmo comportamento: redução de k com o aumento da massa molar do polímero utilizado, sendo que os maiores valores do k foram obtidos usando PEG 1500. Com o aumento da massa molar do PEG observa-se que a caseína migrou para a fase inferior, provavelmente, pela redução da disponibilidade de sítios onde estas se ligavam, provocando assim a expulsão das proteínas dessa região.

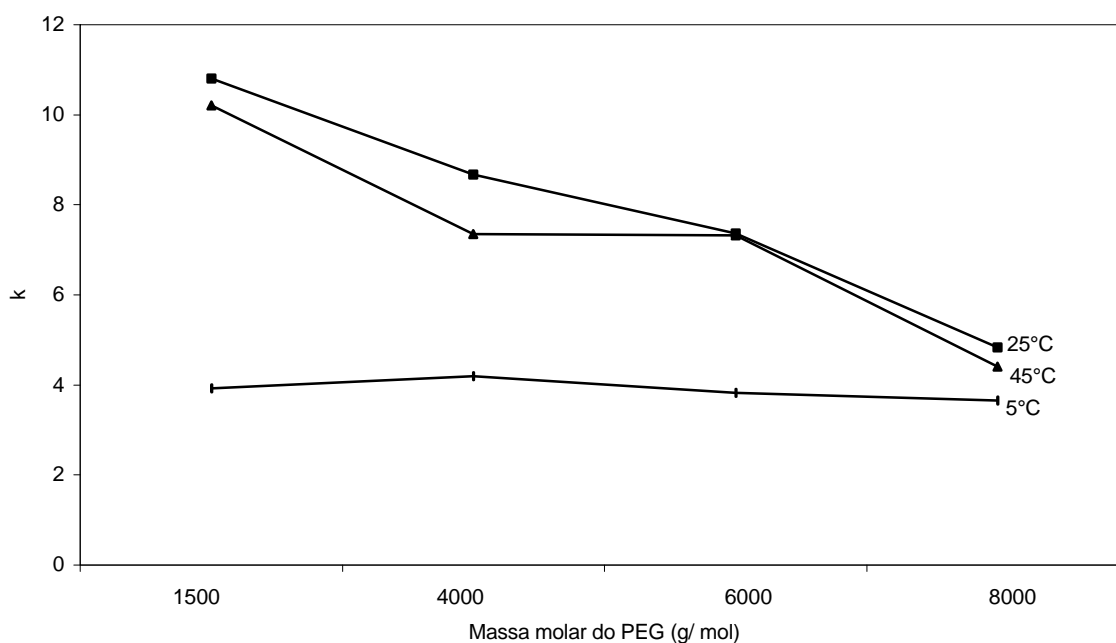


Figura 1. Influência da massa molar do PEG sobre o k , em função da temperatura, para SABs formados por PEG- fosfato de potássio.

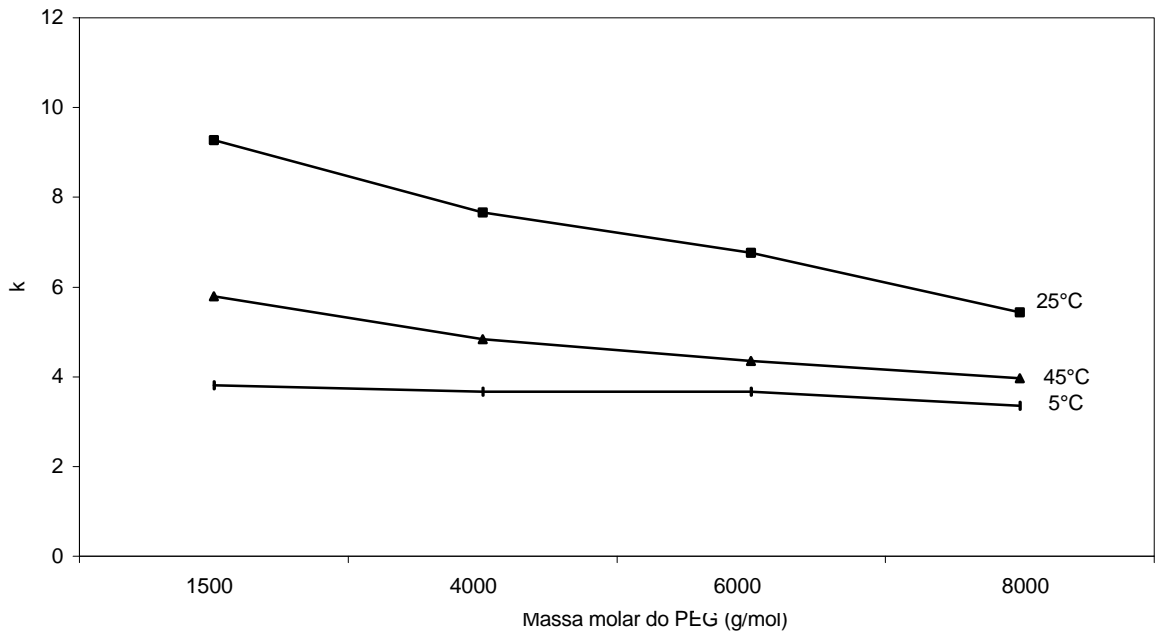


Figura 2. Influência da massa molar do PEG sobre o k , em função da temperatura, para SABS formados por PEG- sulfato de lítio.

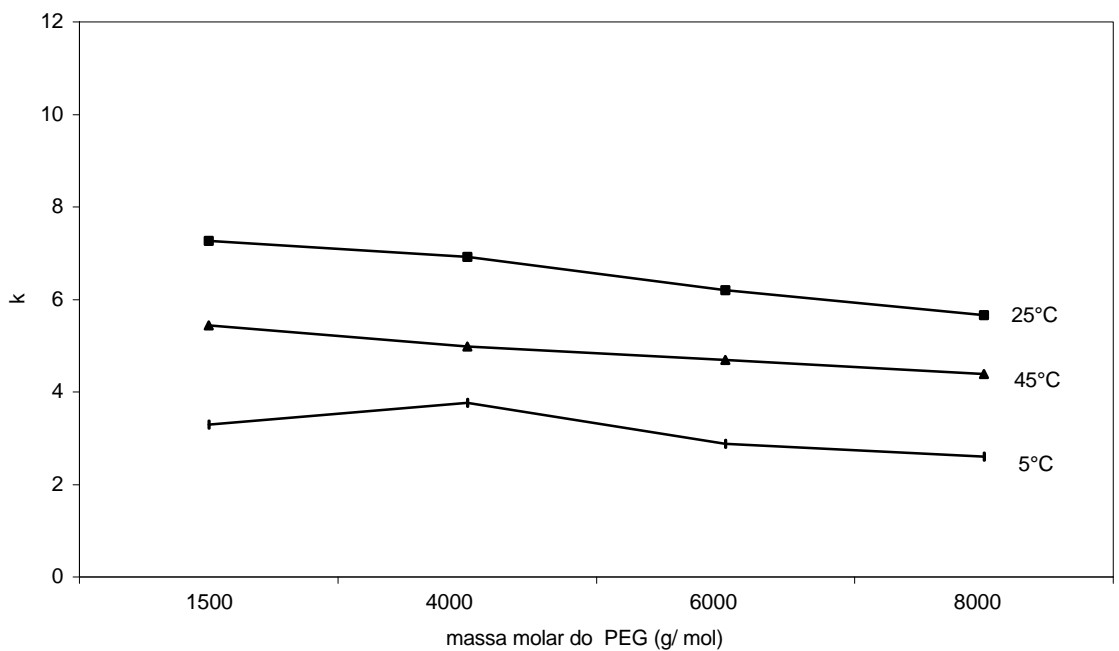


Figura 3. Influência da massa molar do PEG sobre o k , em função da temperatura, para SABS formados por PEG- sulfato de amônio.

Estudos conduzidos por ALBERTSSON (1986) mostraram que a massa molar do polímero influencia a partição, alterando o equilíbrio e o número de interações entre o polímero e a proteína. O aumento da cadeia

do polietilenoglicol reduz o grau de liberdade da molécula, diminuindo a entropia configuracional e conseqüentemente a entropia de mistura do sistema. Simultaneamente, o aumento do tamanho da molécula do polímero, ou da concentração da solução, provoca o enovelamento da cadeia da macromolécula, aumentando a entropia conformacional. Este processo de enovelamento resulta na diminuição do número de sítios disponíveis às interações, o que contribui para que a cadeia do polímero sature com menor quantidade do outro componente.

Resultados similares foram obtidos por CAPEZIO et al. (2005) ao estudarem a partição de albumina de soro bovino, α -lactoalbumina (α -la) e β -lactoglobulina (β -lg) em SABs formados por PEG-fosfato.

GIRALDO-ZUÑIGA et al. (2001), empregando SABs formados com PEG e fosfato de potássio (FFP) para a separação de proteínas do soro de queijo, observaram que os coeficientes de partição da α -la diminuíram com o aumento da massa molar do PEG. Para a β -lg foi verificada uma tendência inversa, isto é, o crescimento do k com a elevação da massa molar do PEG, exceto para PEG 8000. De igual forma FARRUGGIA et al. (2003) concluíram no seu estudo de partição de albumina de soro bovino utilizando SABs compostos por PEG e fosfato de potássio, que a partição da proteína estudada foi alterada ao aumentar a massa molar do polímero diminuindo os valores do k .

3.3 Efeito do tipo de sal sobre o coeficiente de partição

O efeito do tipo de sal sobre o coeficiente de partição também foi avaliado neste trabalho. Foram testados quatro tipos de sais: fosfato de potássio (monobásico e dibásico), sulfato de amônio, sulfato de lítio e sulfato de zinco, em três temperaturas (5, 25 e 45°C), para cada PEG de diferente massa molar utilizado (1500, 4000, 6000 e 8000 g mol⁻¹).

O comportamento dos diferentes tipos de sais analisados foi similar em todos os casos. Os maiores valores do coeficiente de partição foram obtidos com PEG 1500, a 25°C, utilizando como sal o fosfato de potássio, seguido do sulfato de lítio e do sulfato de amônio. Com o sulfato de zinco, os valores de partição não foram determinados, pois a proteína permaneceu em sua totalidade na fase superior do sistema. Comparando o efeito do sulfato

de lítio e do sulfato de amônio, os valores do coeficiente de partição obtidos não apresentaram diferença significativa.

Os gráficos 4 a 7 apresentam o comportamento do tipo de sal sobre o coeficiente de partição da caseína, em função da massa molar do PEG e da temperatura. O valor do coeficiente de partição para os sistemas formados por PEG-sulfato de zinco foi considerado como tendendo ao infinito, pois a caseína permaneceu completamente na fase superior.

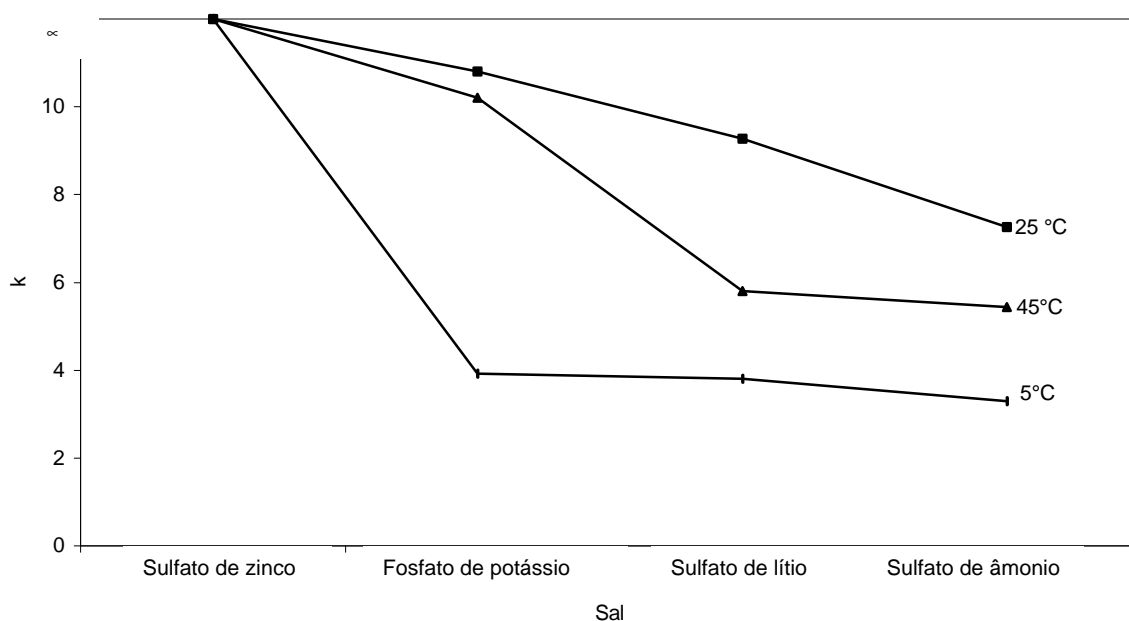


Figura 4. Efeito do tipo de sal sobre o k , em função da temperatura, para SABs formados por PEG-1500 e os diferentes tipos de sais.

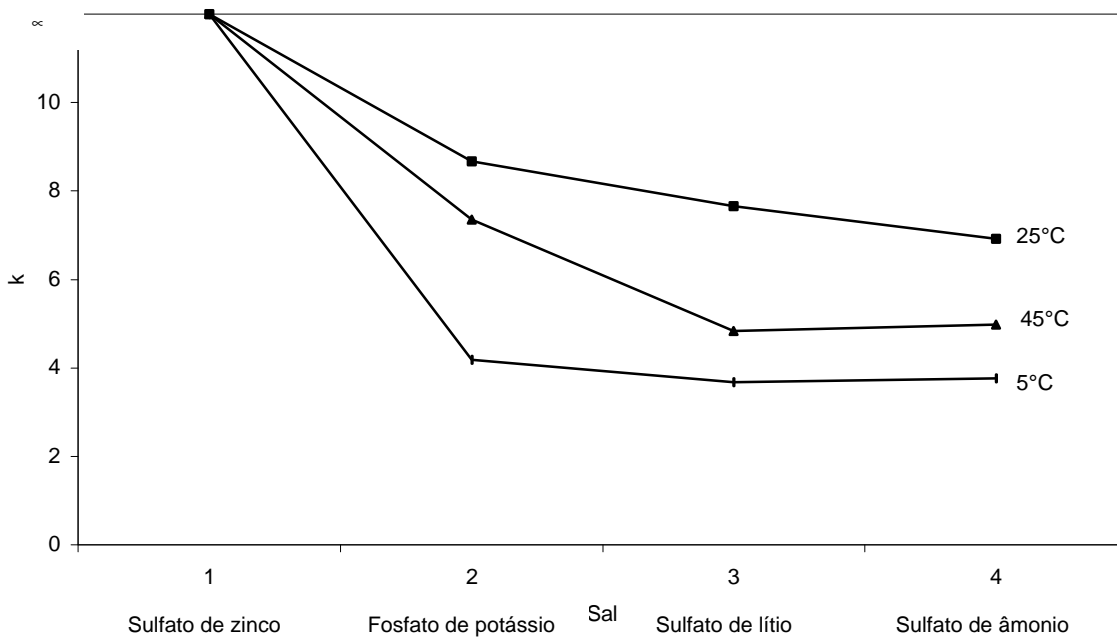


Figura 5. Efeito do tipo de sal sobre o k , em função da temperatura, para SABs formados por PEG-4000 e os diferentes tipos de sais.

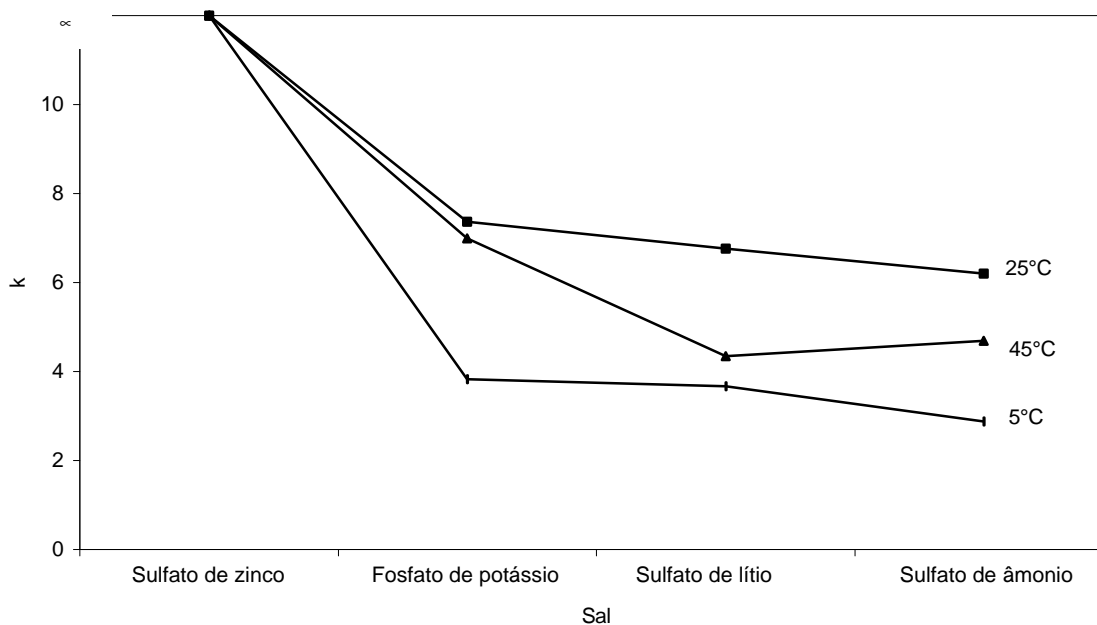


Figura 6. Efeito do tipo de sal sobre o k , em função da temperatura, para SABs formados por PEG-6000 e os diferentes tipos de sais.

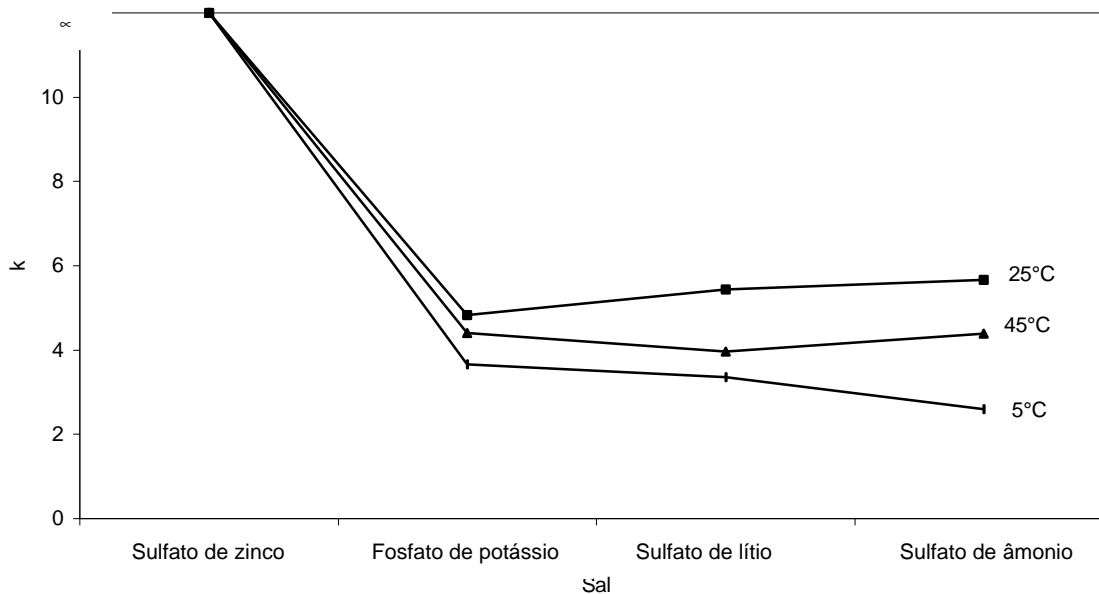


Figura 7. Efeito do tipo de sal sobre o k , em função da temperatura, para SABs formados por PEG-8000 e os diferentes tipos de sais.

A influência do tipo de sal sobre o coeficiente de partição, é dependente tanto da natureza do sal utilizado (capacidade de formação de fases) quanto das características das biomoléculas alvos.

Estudos realizados por ALBERTSSON (1986) mostraram que a separação de fases em misturas contendo polieletrólitos depende fortemente da força iônica e do tipo de íon presente no sistema. Mais especificamente, verificou que ao adicionar sais ao sistema PEG, sulfato de dextrana e água a concentração de PEG necessária à separação de fases no sistema dependia do tipo de sal usado. Considerando que a capacidade indutiva do fosfato de potássio à formação de fases é maior do que dos sulfatos, pode-se dizer que a capacidade de formação de SAB tanto do ânion fosfato quanto do cátion potássio (do fosfato de potássio) são maiores do que a do ânion sulfato e do cátion lítio (do sulfato de lítio) (ANANTHAPADMANABHAN e GODDARD 1987; CARVALHO, 2004).

Assim, para a saturação da cadeia polimérica será necessário usar uma menor quantidade de fosfato de potássio que dos sais de sulfato (sulfato de amônio e sulfato de lítio). Conseqüentemente ocorrerá a formação de fases em sistemas com concentração de fosfato de potássio inferiores às dos sais de sulfato. Foi verificado que os maiores valores do coeficiente de partição foram com sistemas PEG-fosfato de potássio, que

apresentaram maior número de sítios disponíveis na cadeia polimérica para serem ocupados pela proteína.

Avaliando a presença de proteína no sistema, segundo CHEFTEL et al. (1989) e DUARTE et al. (1998), a natureza e a concentração de íons exercem efeitos significativos sobre a absorção de água e a solubilidade da proteína. Assim, pequenas concentrações salinas podem elevar a solubilidade da proteína devido ao aumento da solvatação. Por outro lado, quando os níveis de sal são mais elevados, predominam as interações água-sal, em detrimento das interações água-proteína, contribuindo para reduzir a solubilidade protéica.

Esta redução das interações água-proteína e o aumento das interações água-sal, favorecem as interações PEG-proteína que dependem tanto da carga da proteína quanto da capacidade indutora do sal utilizado na formação das fases.

Em relação aos resultados obtidos com sulfato de zinco, não foram encontrados dados na literatura que levassem a uma discussão mais detalhada.

3.4 Efeito da temperatura sobre o coeficiente de partição

Neste trabalho o efeito da temperatura sobre o k , foi avaliado em três temperaturas, 5 , 25 e 45 °C. Nas Figuras 8, 9 e 10 mostram-se os resultados deste estudo em função da massa molar do PEG e para cada tipo de sal utilizado (exceto para o sulfato de zinco por razões anteriormente colocadas). Em todos os casos pode-se observar que os maiores valores do coeficiente de partição foram obtidos a 25 °C, seguido de uma redução na faixa de temperatura de 25 a 45 °C.

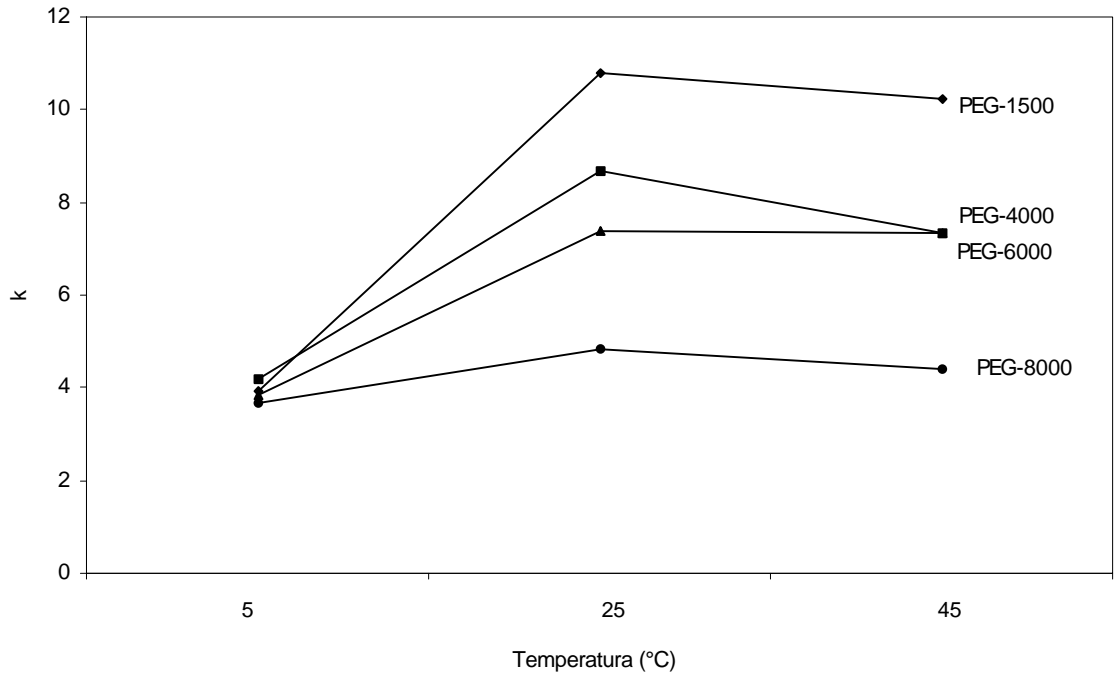


Figura 8. Efeito da temperatura sobre o k , em função da massa molar do polímero para fosfato de potássio

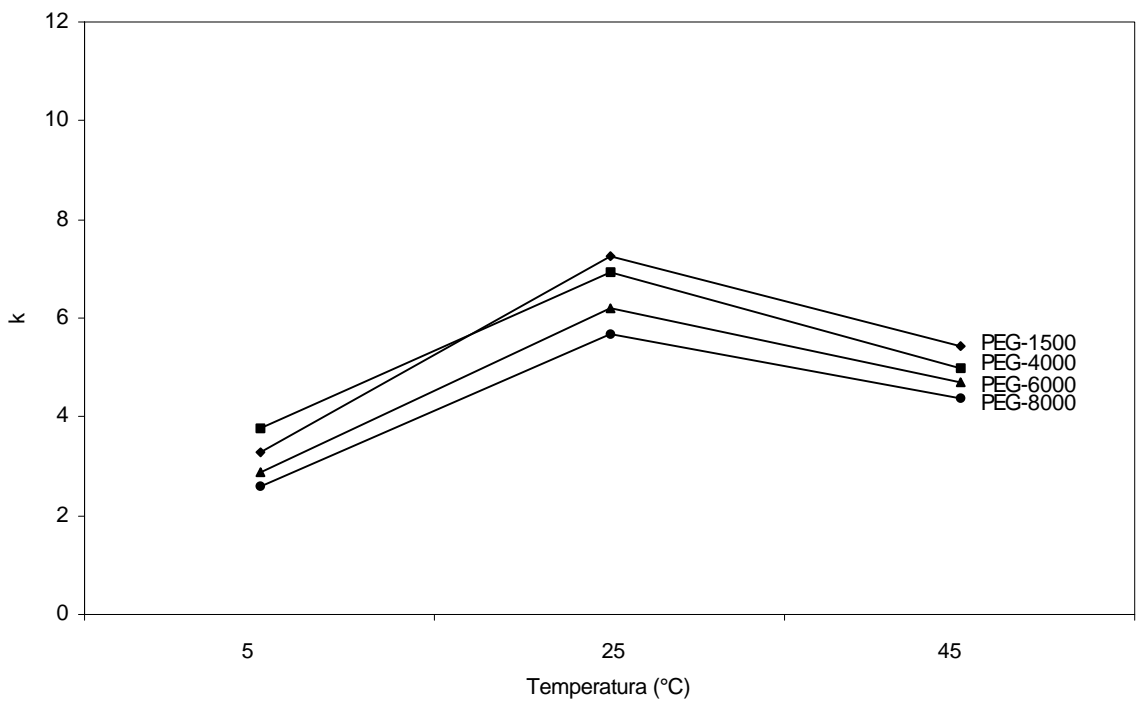


Figura 9. Efeito da temperatura sobre o k , em função da massa molar do polímero para sulfato de amônio

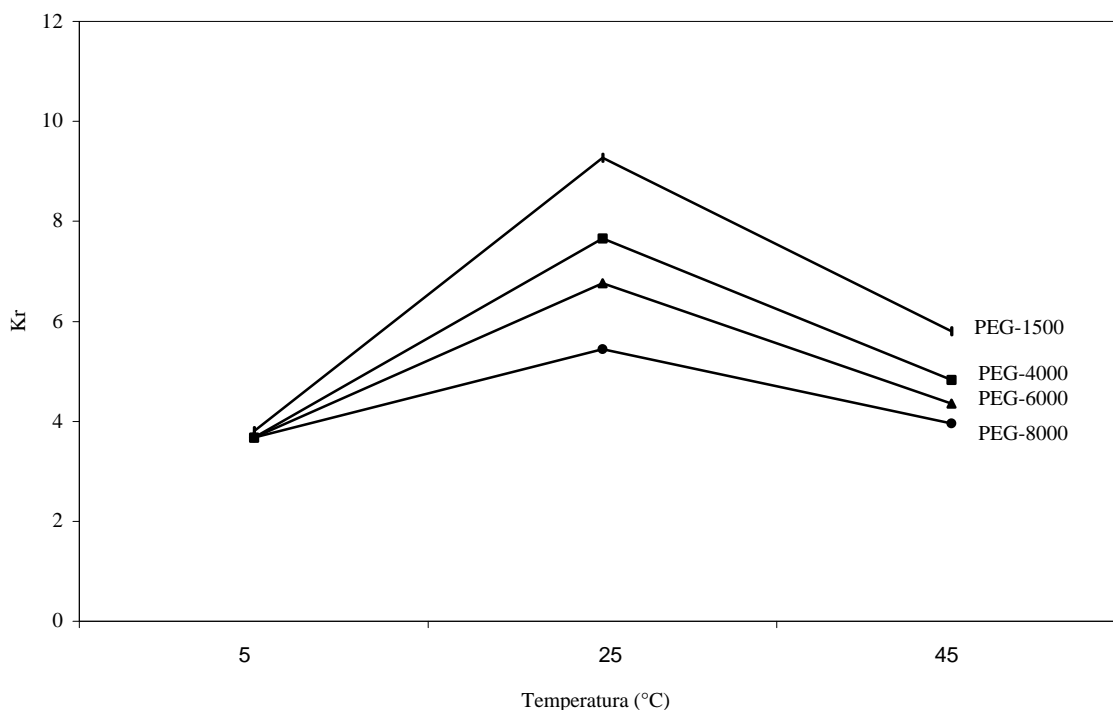


Figura 10. Efeito da temperatura sobre o k , em função da massa molar do polímero para sulfato de lítio.

A influência da temperatura sobre a partição de biomoléculas é percebida de maneira indireta, pois a temperatura pode levar a mudanças na viscosidade das fases ou na estrutura dos polímeros, alterando a forma da curva binodal no diagrama de fases (CARVALHO, 2004). Esta alteração na curva de equilíbrio pode ser notável de forma específica na linha de amarração pois com o aumento da temperatura há transferência de água da fase superior para a fase inferior, resultando na diminuição da concentração de sal na fase inferior (pois o conteúdo de água aumenta) e aumento da concentração de PEG na fase superior (pois o conteúdo de água diminui) (ALBERTSSON, 1986)

De forma geral, SILVA (2000) e ZAFARANI-MOATTAR et al. (2002) relatam que o aumento da temperatura provoca diminuição da solubilidade mútua, em outras palavras, aumento da região bifásica. Também pode ser dito que o aumento da temperatura em alguns casos pode induzir à formação de fases, pois a separação das fases é um processo endotérmico (CARVALHO, 2004).

Pelo exposto, um aumento na temperatura significaria a elevação do coeficiente de partição da proteína, pois há tendência à formação do SAB, este comportamento é observado na faixa de temperatura de 5 a 25 °C, já

na faixa de 25 a 45 °C, observa-se o comportamento oposto, um decréscimo no valor do coeficiente de partição.

Sendo que o efeito da temperatura sobre as curvas de equilíbrio para as diferentes massas molares de PEG avaliadas neste trabalho foi desprezível (CARVALHO, 2004), estes decréscimos dos valores do coeficiente de partição podem ser devidos às características da proteína, Segundo NELSON e GLATZ (1985), em temperaturas acima de 40 °C a caseína pode apresentar um fracionamento de aproximadamente 7 a 10 %, reduzindo o tamanho da molécula, o que favorece uma maior interação da mesma com outros componentes.

Assim sendo, pode-se dizer que a 45 °C as interações proteína-água e proteína-sal foram favorecidas em detrimento das interações PEG-proteína, diminuindo o valor de k .

3.5 Dependência do coeficiente de partição da caseína com o comprimento da linha de amarração

O comprimento da linha de amarração (“tie line length”, TLL) pode ser considerado uma medida de como as composições das fases variam com a modificação das propriedades do sistema. O valor da inclinação é calculado pela relação entre a variação da quantidade de polímero e a variação da quantidade de sal nas duas fases em equilíbrio ($\Delta P/\Delta S$).

Para a determinação do TLL foi utilizada a equação 3, partindo do sistema composto por PEG 1500 e fosfato de potássio, 25,0 % e 13,0 %, respectivamente, por ter apresentado as melhores condições para a separação de caseína. Na Figura 11 pode-se observar o comportamento do TLL em função do $\ln k$. Os resultados mostram que o coeficiente de partição da caseína aumenta com o incremento do TLL. ALBERTSSON (1986) observou a mesma tendência ao particionar albumina de soro bovino utilizando SABs compostos por PEG e Dex.

Este aumento no TLL deve-se à modificação do teor dos componentes das fases, que resulta no aumento da concentração do PEG na fase superior e diminuição da concentração do sal na fase inferior, gerado provavelmente, pela transferência de água da fase superior para a fase

inferior, que pode ser provocada tanto seja pelo aumento da temperatura quanto pela modificação do conteúdo de PEG ou sal nas fases do sistema.

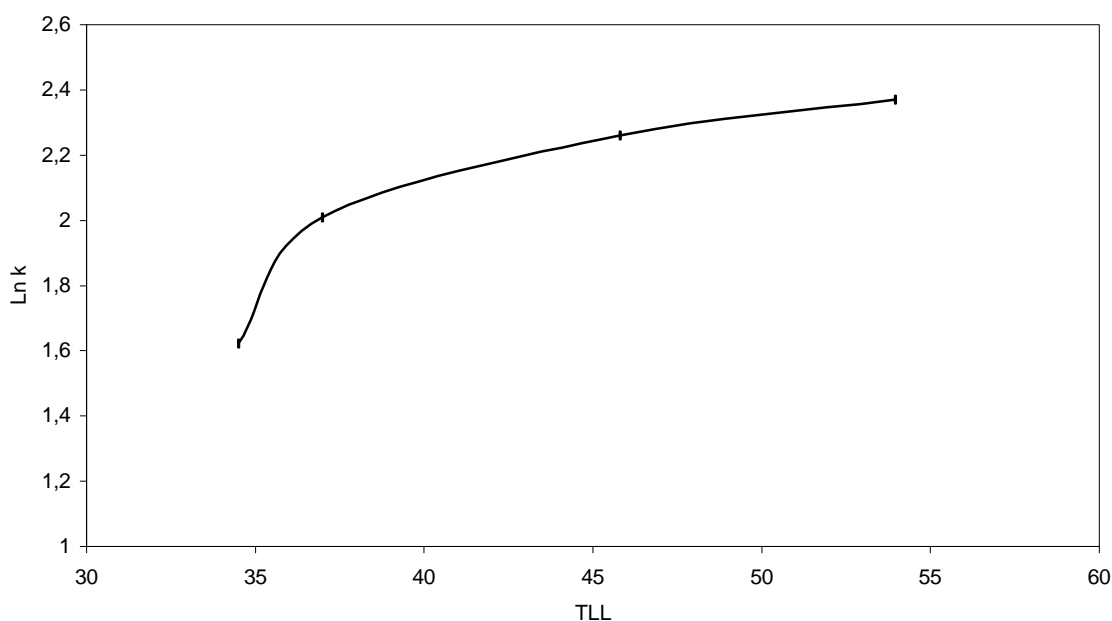


Figura 11. Relação do TLL em função do Ln k para SABs formados por PEG-1500 (25 %), fosfato de potássio (13 %) e água, a 25 °C.

3.6 Recuperação da proteína utilizando CEM

Como apresentado na Tabela 2, as condições cromatográficas usadas para a recuperação da caseína foram as mesmas estabelecidas por ROJAS (2001). Utilizou-se 0,1 mL de amostra em uma coluna empacotada com Sephadex® G-25 (média), com uma vazão de 2 mL min⁻¹ e 4 mL min⁻¹, para as fases salina e polimérica, respectivamente. Na Tabela 3 listam-se os resultados desta parte do processo.

Os tempos de retenção, em minutos, foram de: 4,66 para a fase polimérica, 3,26 para a proteína e de 3,11, 3,83, 3,85 e 3,99 para os sais de fosfato de potássio, sulfato de lítio, sulfato de zinco e sulfato de amônio, respectivamente. Em todos os casos obteve-se uma alta porcentagem de recuperação, atingindo cerca de 99% para as fases poliméricas (exceto para o sistema PEG 1500/sulfato de zinco). Para as fases salinas a porcentagem de recuperação ficou na faixa entre 88 e 99 %.

Tabela 3. Produtividade e recuperação da caseína por CEM após separação com SABs

Sistema testado	fase	% recuperação
PEG-1500	Superior	99,26
Fosfato de potássio 25°C	Inferior	99,29
PEG-1500	Superior	99,47
Fosfato de potássio 45°C	Inferior	96,32
PEG-1500	Superior	98,95
Sulfato de lítio 25°C	Inferior	89,52
PEG-1500	Superior	99,54
Sulfato de amônio 25°C	Inferior	88,18
PEG-1500	Superior	84,04
Sulfato de zinco 25°C	Inferior	***

3.7 Densidade

Polietilenoglicol de diferentes massas molares (1500, 4000, 6000 e 8000 g mol⁻¹) e quatro tipos de sais (sulfato de amônio, sulfato de lítio, sulfato de zinco e fosfato de potássio), em três temperaturas (5, 25 e 45°C), formaram os sistemas cujas fases tiveram as densidades medidas.

Para o cálculo da densidade das fases foi empregada a equação 1. Para tanto, a temperatura ambiente foi determinada (25 ± 1°C). Desta forma, valores para a densidade do ar e da água foram obtidos por interpolação de dados próximos a esta temperatura, consultados na literatura (WEAST, 1975).

Os resultados são apresentados na Tabela 4. Ao aumentar a massa molar do polímero, verifica-se uma tendência do aumento da densidade de ambas fases, para os diferentes sistemas usados. O aumento da temperatura levou a uma redução da densidade para a fase polimérica. O comportamento da densidade da fase inferior com o aumento da temperatura foi irregular, não sendo observado tendência predominante.

De forma específica, a variação de densidade em um material pode ser devida ao incremento ou decréscimo na temperatura ou à mudança na estrutura do material que está sendo utilizado. O conhecimento deste parâmetro pode ser de grande importância na manipulação do produto durante o processamento, sendo a densidade uma indicação de como a

matéria está disposta em um corpo (ZURITZ et al., 2005). Materiais com um arranjo molecular mais compacto têm densidade maior (SINGH e HELDMAN, 1997).

Tabela 4. Valores da densidade (g mL^{-1}) para as fases de SABs compostos por PEG e sal.

Sistema	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)					
	5		25		45	
	Fase superior	Fase inferior	Fase superior	Fase inferior	Fase superior	Fase inferior
PEG-1500/ Sulfato de amônio	1,0982	1,1362	1,0962	1,1341	1,0803	1,1500
PEG-4000/ Sulfato de amônio	1,0985	1,1399	1,0974	1,1373	1,0859	1,1578
PEG-6000/ Sulfato de amônio	1,0962	1,1401	1,0998	1,1451	1,0854	1,1593
PEG-8000/ Sulfato de amônio	1,1007	1,1429	1,1014	1,1469	1,0880	1,1602
PEG-1500/ Sulfato de lítio	1,0973	1,1851	1,0881	1,1731	1,0811	1,1619
PEG-4000/ Sulfato de lítio	1,0988	1,1864	1,0943	1,1773	1,0827	1,1624
PEG-6000/ Sulfato de lítio	1,1061	1,1869	1,0963	1,1789	1,0843	1,1639
PEG-8000/ Sulfato de lítio	1,1017	1,1877	1,0992	1,1824	1,0883	1,1664
PEG-1500/ Sulfato de zinco	1,0966	1,2677	1,0917	1,2588	1,0866	1,2703
PEG-4000/ Sulfato de zinco	1,0978	1,2688	1,0935	1,2576	1,0888	1,2726
PEG-6000/ Sulfato de zinco	1,0994	1,2693	1,0958	1,2542	1,0896	1,2754
PEG-8000/ Sulfato de zinco	1,1024	1,2704	1,0970	1,2551	1,0902	1,2761
PEG-1500/ Fosfato de potássio	1,0938	1,2509	1,0943	1,2533	1,0847	1,2607
PEG-4000/ Fosfato de potássio	1,0965	1,2572	1,0964	1,2556	1,0858	1,2634
PEG-6000/ Fosfato de potássio	1,0979	1,2594	1,0975	1,2582	1,0873	1,2645
PEG-8000/ Fosfato de potássio	1,0993	1,2609	1,0986	1,2594	1,0883	1,2663

4. CONCLUSÕES

Neste trabalho, a separação de caseína usando sistemas aquosos bifásicos foi avaliada por meio da influência da massa molar do polímero, do tipo de sal e da temperatura na qual foi alcançado o equilíbrio.

As concentrações dos componentes do sistema utilizados para a separação da caseína foram 25 % (m/m) de PEG e 13 % (m/m) de sal, sendo que os maiores valores do coeficiente de partição foram, 10,8 e 10,2, obtidos usando PEG 1500 e sais de fosfato de potássio. Ao utilizar a cromatografia de exclusão molecular como técnica de recuperação da proteína, foram obtidos os melhores resultados, na ordem de 99 %, para ambas fases nos sistemas formados por PEG-1500 e fosfato de potássio, a 25°C.

A extração de proteínas utilizando SABs mostrou assim ser uma técnica eficiente na separação da caseína, levando a resultados favoráveis e reprodutíveis. O mesmo é válido para a cromatografia de exclusão molecular, que é uma técnica viável para a purificação e, ou, recuperação da proteína nas fases polimérica e salina dos SABs.

5. BIBLIOGRAFIA

- ALBERTSSON, P. A.; **Partition of cell and macromolecules**. New York: John Wiley, p. 346; 1986.
- ALVES, G.L.F.; CHUMPITAZ, D.A.; Da SILVA, H.M.; FRANCO, T.T., MEIRELLES, J.A.; Partitining of whey proteins, bovine serum albumin and porcine insulin in aqueous two-phase systems; **Journal of Chromatography B**; 743; 235-239; 2000.
- AMUNDSON, C.H.; WATANAWANICHAKORN, S.; HILL C.G.; Production of enriched proteins fractionsof beta-lactoglobulin and alpha-lactalbumin from cheese whey; **Journal Food Process Preserve**; 6; 55-71; 1982
- ANANTHAPADMANABHAN, K.P.; GODDARD, E.D.; Aqueous biphasic formation in polyethylene oxide-inorganic salt systems. **Langmuir**, 3, 25-31; 1987.
- BADUI, S.; **Química de los alimentos**; cap 12; 1989.
- BOLOGNESE, B.; NERLI, B.; PICÓ, G.; Application of aqueous two-phase systems of ethylene and propylene oxide copolymer-maltodextrin for protein purification; **Journal of chromatography B**; 814; 347-353; 2005

- BRADFORD, M.M.; A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding; **Analytical Biochemistry**; 72; 248-254; 1976.
- BRAMANTI, E.; FERRI, F.; RASPI, G.; New method for separation and determination of denatured caseins by hydrophobic chromatography; **Talanta**; 54; 343-349; 2001.
- BRAMANTI, E.; SORTINO, C.; ONOR, M.; BENI, F.; RASPI, G.; Separation and determination of denatured α -, β -, κ -caseins by hydrophobic interaction chromatography in cow', ewes' and goats' milk, milk mistures and chesses; **Journal of chromatography A**; 994; 59-74; 2003.
- BROOKS, D.E.; SHARP, K.A.; **Theoretical aspects of partitioning**. In: Partitioning in aqueous two-phase systems; 2; 11-45;1985
- CAPEZIO, L.; ROMANINI, D.; PICÓ, G.; NERLI, B.; Partition of whey milk proteins in ATPS of PEG-phosphate as a starting point to isolate proteins expressed um transgenic milk; **Journal of chromatography B**; 2005.
- CARVALHO, C.; **Estudo de equilíbrio de fases para sistemas aquosos bifásicos compostos por polietilenoglicol, sais e água**. Dissertação de tese de Mestrado em Ciência Tecnologia de alimentos; Viçosa; UFV; 2004.
- CHEFTEL, J.C., CUA, J.L., LORIENT, D., **Proteínas alimentarias**. Zaragoza: Editorial Acribia, p. 345, 1989.
- COIMBRA J.S; GIRALDO ZUÑIGA A.D; MINIM L.A.; MEIRELLES A.J; **Uso de sistemas aquosos bifásicos na extração líquido-líquido**; Viçosa; UFV; 2003.
- DALGLEISH, P.G.; **Milk proteins, chemistry and physics** In: FOX P.F.; CONDON, J.J.; (Ed) Food Proteins London; Applied science publisher; 1997.

- DOUBLIER, J.L., SIMONET, F., GARNIER, C., Partition of proteins in the aqueous guar/dextran two-phase system, **Food hydrocolloids**, v 14, p. 591-600, 2000.
- DUARTE, J.A.; CARREIRA, L.R.; JUNQUEIRA, G.R.; COELHO, J.V.; SILVESTRE, C.P.M.; Propriedades emulsionantes e solubilidade da caseína bovina; 18; n° 3; **SciELO Brasil**; 1998.
- FARRUGGIA, B.; NERLI, B.; PICÓ, G.; Study of the serum albumin-polyethyleneglycol interaction to predict the protein partitioning in aqueous two-phase systems; **Journal of Chromatography B**; 798; 25-33; 2003
- GIRALDO ZUÑIGA, A. D.; COIMBRA, J. S. R.; MINIM, L. A. Coeficientes de partição da α -Lactoalbumina e β -Lactoglobulina em sistemas aquosos bifásicos influência da massa molar do polímero. **Ciência y Tecnología Alimentaria**; 3, n° 3, 149-155, 2001.
- GURGEL, P.V.; CARBONELL, R.G.; SWAISGOOD, H.E.; Fractionation of whey proteins with a hexapeptide ligand affinity resin; **Bioseparation**; 9; 385-392; 2000
- IGARASHI, Y.; Separation of caseins by chemical procedures; **International Dairy Journal**; 9; 377-378; 1999.
- IRVINE, G. B. Size-exclusion high-performance liquid chromatography of peptides: a review. **Analytical Chimica Acta**, v.352, p. 387-397, 1997.
- LYNCH, J.M.; BARBANO, D.M.; FLEMING, J.R.; Indirect and direct determination of the casein content of milk by Kjeldahl nitrogen analysis: Collaborative study; **Journal AOAC International**; 81; 763-774; 1998.

- MAYERHOFF, D.V.L.; ROBERTO, I.C.; FRANCO, T.T.; Purification of xilose reductase from *Candida mogii* in aqueous two-phase systems; **Biochemical Engineering Journal**; 18, 217-223, 2004.
- MIRALLES, B.; ROTHBAUER,V.; MANSO, M.A.; AMIGO, L.; KRAUSE, I.; RAMOS, M.; Improved method for the simultaneous determination of whey proteins, caseins and para-k-casein in milk and dairy products by capillary electrophoresis; **Journal of chromatography A**; 915; 225-230; 2001.
- NELSON, C.D.; GLATZ, G.M.; Primary particle formation in protein precipitation; **Biotechnology Bioengineering.**; 27; 1435; 1987.
- NIELSEN, S.S., (Ed) **Food Analysis, Aspen publishers**, Inc Maryland, p. 630, 1997.
- NOPPE, W.; HAEZEBROUCK, P.; HANSSENS, I.; De CUYPER, M.; A simplified purification procedure of alpha-lactalbumin from milk using Ca-dependent adsorption in hydrophobic expanded bed chromatography. **Bioseparation**; 8; 153-158; 1998.
- OUTINEN, M.; TOSSAVAINEN, O.; TUPASELA, T.; KOSKELA, P.; KOSKINEN, H.; RANTAMÄKI, P.; Fractionation of proteins from whey with different scale processes, **Lebens-Wiss u-Technol**; 29; 411-417; 1996.
- PANOUILLE, M.; DURAND, D.; NICOLAI, T.; LARQUET, E.; BOISSET, N.; Aggregation and gelation of micellar casein particles; **Colloid and interface Science**; 2005.
- PEARCE, R.J.; Thermal separation of β -lactoglobulin and α -lactalbumin in bovine cheddar cheese whey; **Australian Journal Dairy Technology**; 38; 144-149; 1983.

- ROJAS, E. E. G. **Separação e Purificação de alfa-lactoalbumina e beta-lactoglobulina pela Cromatografia por Exclusão Molecular após a Extração com Sistemas Aquosos Bifásicos**. Dissertação de mestrado, UFV, Viçosa, 82p., 2001.
- ROJAS, E.E.G.; COIMBRA, J.S.; MINIM, L.A.; GIRALDO ZUNIGA, A.D.; SARAIVA, S.H. e MINIM, V.P.R.; Size-exclusion chromatography applied to the purification of whey proteins from the polymeric and saline phases of aqueous two-phase systems; **Process Biochemistry**; 39; 1751-1759; 2004.
- SCHMIDT, A. S., VENTON, A. M., ASENJO, J. A. Partitioning and purification of α -amylase in aqueous two-phase systems. **Enzyme Microbial Technology**; 16: 131-142, 1994.
- SGARBIERI, V.C; **Proteínas em alimentos protéicos, propriedades, degradações e modificações**. São Paulo; Livraria Varela; 1996.
- SINGH, R.D.; HELDMAN, D.R.; **Introduction to Food Engineering**, 2 ed.; California ; Academic Press, 1997.
- SILVA, L. H. M. **Equilíbrio de fases em sistemas aquosos bifásicos: polímero/polímero e polímero/sal**. Tese Doutorado, UNICAMP, Campinas, 2000.
- SWAISGOOD, E.H.; **Characteristics of milk** In: FENNEMA O.R. (Ed); Food chemistry; third edition; New York; Marcel Decker; 1996.
- SWAISGOOD, E.H.; **Chemistry of the caseins**. In P.F. Fox, Advanced Dairy Chemistry; v. 1; 63-110; London and New York: Elsevier Applied Science; 1992.
- TUBIO,G.; NERLI, B.; PICÓ, G.; Relationship between the protein in surface hydrophobicity and its partitioning behavior in aqueous two-phase systems of polyethylene glycol and dextran; **Journal of Chromatography B**; 779; 293-301; 2004.

WEAST, R.C.; **Handbook of chemistry and physics**; 56th ed.;1975.

ZAFARANI-MOATTAR, M.T. e GASEMI, J.; Liquid-liquid phase equilibria of an aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol and ammonium dihydrogen phosphate or diammonium hydrogen phosphate: experiment and correlation; **Fluid Phase Equilibria**; 198; 281-291; 2002.

ZURITZ, C.A.; MUÑEZ PUNTES, E.; MATHEY, H.H.; PÉREZ E.H.; GASCÓN, A.; RUBIO, L.A.; CARULLO, C.A.; CHERNIKOFF, R.E.; CABEZA, M.S.; Density, viscosity and coefficient of thermal expansion of clear grape juice at different soluble solid concentrations and temperatures; **Journal of Food Engineering**; 71; 143-149; 2005.

ZYDNEY, A.L.; Protein separation using membrane filtration; new opportunities for whey fractionation; **International Dairy Journal**; 8; 243-250; 1998.

CAPITULO 3

PARTIÇÃO DA CASEÍNA EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS COMPOSTOS POR POLIETILENOGLICOL, MALTODEXTRINA E ÁGUA

RESUMO

Sistemas aquosos bifásicos compostos por polietilenoglicol (PEG), maltodextrina (MD) e água foram empregados na partição da caseína.

Foram avaliadas a influência da massa molar do PEG (1500, 4000, 6000 e 8000 g mol⁻¹) e da temperatura (35 e 45 °C) sobre o valor do coeficiente de partição da caseína.

Os resultados mostraram a afinidade da caseína pela fase inferior rica em MD. Os menores valores de k foram obtidos usando PEG 1500, a 35 °C. Os valores do coeficiente de partição variaram de 0,128 (SAB 6 % (m/m) PEG e 25 % (m/m) MD) a 0,131 (SAB 8 % (m/m) PEG e 28 % (m/m) MD) .

Palavras-chave: Caseína, sistemas aquosos bifásicos, partição.

1. INTRODUÇÃO

Os sistemas aquosos bifásicos constituem uma técnica de extração líquido-líquido e se formam pela mistura de dois polímeros ou um polímero e um sal inorgânico. Estes são aplicados na separação e purificação de enzimas, proteínas, ácidos nucleicos e outras substâncias de ordem biológica (ALBERTSSON, 1986).

Algumas das vantagens dos SABs aplicados na separação de diversos compostos são (GÜNDÜZ, 2004):

- a. Facilidade e rapidez no preparo;
- b. O equilíbrio é alcançado rapidamente, o que reduz o tempo do processo;
- c. Podem ser aplicáveis em processos contínuos;
- d. A separação dos componentes é seletiva e rápida;
- e. É uma técnica de separação de baixo custo.

Os sistemas aquosos bifásicos (SABs) mais utilizados para a separação de biomoléculas são os formados por polietilenoglicol (PEG)/dextrana ou PEG/sal, embora outros sistemas venham sendo testados com o objetivo de reduzir custos ou desnaturação de proteínas. Entre estes SABs podem-se citar os formados por maltodextrinas (SZLAG et al., 1988; SILVA e MEIRELLES, 2000; e SILVA e MEIRELLES, 2001a),

hidroxipropil e seus derivados (LING et. al., 1989) e arabinogalactase (CHRISTIAN et al., 1998).

A maltodextrina é uma alternativa de baixo custo em comparação à dextrana, é comercialmente disponível e apresenta características próximas à da dextrana. É um polissacarídeo obtido pela hidrólise do amido (SILVA e MEIRELLES, 2000). É solúvel em água a 90 °C, na concentração de 20 a 40 % (m/m), mas, sob resfriamento, forma um gel opaco que se desfaz de forma reversível a temperaturas entre 60 e 75 °C (Mc PHERSON e SEIMBRA, 1997). É biodegradável, de baixa higroscopicidade e sua cristalização pode ser controlada. É largamente usada no encapsulamento de aromas e aditivos, sendo empregada também como espessante de alimentos (APPL, 1991).

Sendo a maltodextrina utilizada na indústria de alimentos, esta pode ser empregada na separação de proteínas, especificamente nos processos de produção de queijo, cremes e derivados lácteos. Facilita também a produção de novas formulações, por exemplo, aquelas destinadas a gerar alimentos funcionais, além de promover maior conhecimento sobre o comportamento e interações das proteínas em determinados sistemas (SILVA e MEIRELLES, 2001b; GUO et al., 2003).

No leite, as caseínas existem na forma de partículas coloidais conhecidas como micelas, com um diâmetro de 100 nm a 200 nm, aproximadamente. A proporção entre os tipos de caseínas encontrados no leite pode variar de região para região, mas de forma geral encontra-se: α_{s1} -caseína: 38 %, α_{s2} -caseína: 10 %, β -caseína: 36 %, κ -caseína: 13 % e γ -caseína: 3 % (DALGLEISH, 1982; CHEFTEL, 1989).

As proteínas do leite, especificamente as caseínas, apresentam potencial industrial, sendo utilizadas em formulações de vários tipos de produtos por suas excelentes propriedades funcionais, como solubilidade, estabilidade da emulsão, retenção de água, adesão entre outras (KINSELLA, 1982). A caseína possui ainda uma série de outras aplicações não alimentares como nas indústrias de papéis, cola e adesivos, tintas e vernizes, têxtil e indústria de couros (SGARBIERI, 1996; BRAMANTI et al., 2001).

MACHADO (1999), utilizou um sistema PEG e MD para partição de células microbianas. SILVA e MEIRELLES (2001b) usaram

polipropilenoglicol e MD para particionar albumina de soro bovino, α -lactalbumina e β -lactoglobulina e BOLOGNESE et al. (2005), com SABs compostos por um copolímero e MD, separaram albumina de soro bovino, tripsina e lisozima.

Os objetivos deste trabalho foram estudar o comportamento do coeficiente de partição da caseína em sistemas aquosos bifásicos compostos por polietilenoglicol, maltodextrina e água, em função da massa molar do PEG e da temperatura, assim como determinar os valores da densidade das fases destes sistemas.

2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.1 Materiais

Para o preparo dos SABs foram utilizados polietilenoglicóis de massas molares 1500 g mol^{-1} (SIGMA-ALDRICH, Alemanha), 4000 g mol^{-1} (ISO FAR, Brasil), 6000 g mol^{-1} (ISO FAR, Brasil) e 8000 g mol^{-1} (FLUKA, Alemanha); maltodextrina (MD-DE10,5; FLUKA, Alemanha) e caseína pura (SYNTH, Brasil). Todos os reagentes foram de grau analítico.

2.2 Escolha dos sistemas de trabalho

Os sistemas PEG-MD avaliados neste trabalho tiveram seus dados de equilíbrio determinados por MACHADO (1999). A Tabela 1 relaciona a composição global e as temperaturas dos sistemas utilizados.

Tabela 1. Composição dos sistemas aquosos bifásicos formados por PEG, MD e água, utilizados na separação de caseína.

MM PEG	MD	% PEG	% MD	Temperatura
1500	DE-10,5	6	25	35°C
		7	27	
		8	28	
4000	DE-10,5	6	25	35°C
		7,5	27	
		8	28	
6000	DE-10,5	6	25	35°C
		8	28	
		9	30	
8000	DE-10,5	6	25	35°C
		9	26	
		9,5	28	
1500	DE-10,5	6	25	45°C
		7	27	
		8	28	
4000	DE-10,5	6	25	45°C
		7	27	
		8	28	
6000	DE-10,5	6	25	45°C
		7	26	
		8	28	
8000	DE-10,5	6	25	45°C
		8	27	
		9	28	

2.3 Preparo dos sistemas aquosos bifásicos

Para o preparo dos SABs foram usadas soluções estoque de PEG 60,0 % (m/m) e de maltodextrina 40,0 % (m/m) e água.

Após a pesagem (balança analítica M-310, DENVER INSTRUMENT, USA) das soluções estoque em tubos graduados de centrífuga, se adicionou 1 g de solução aquosa de caseína (1 mg mL⁻¹) e água, até completar uma massa total de 40 g. O sistema foi agitado durante 5 minutos por inversão, centrifugado (2000g x 20 min; centrífuga 5804, EPPENDORF,

Alemanha) para acelerar a separação das fases e foi mantido em repouso durante 12 h na temperatura desejada (35 ou 45 °C) (banho termostático TE-184, TECNAL, Brasil), para atingir o equilíbrio.

Alíquotas de cada fase foram separadas para quantificação do teor protéico. Um sistema com os mesmos componentes das fases, mas isento de proteína, foi usado em cada caso como branco, na quantificação do conteúdo de caseína nas fases.

2.4 Medida da densidade

A densidade foi determinada de acordo com o método do picnômetro, utilizando um picnômetro de 10 mL. O picnômetro, limpo e seco, foi pesado (balança analítica M-310, DENVER INSTRUMENT, USA) e, em seguida, preenchido com água e pesado. O procedimento da pesagem foi repetido com o picnômetro contendo a fase coletada do sistema. A temperatura ambiente foi medida e a densidade da fase foi calculada pela equação:

$$r_{am.} = \left[\frac{m_{pic+am} - m_{pic+ar}}{m_{pic+água} - m_{pic+ar}} \right] x (r_{água} - r_{ar}) + r_{ar}$$

(1)

Em que r é a densidade da fase, m_{pic+am} é a massa do picnômetro com a amostra, $m_{pic+água}$ é a massa do picnômetro com água, m_{pic+ar} é a massa do picnômetro vazio, $r_{água}$, r_{ar} e r_{am} são, respectivamente, a densidade da água, do ar e da amostra, à temperatura ambiente (25 ± 1 °C). A densidade foi expressa em $g\ mL^{-1}$.

2.5 Determinação do coeficiente de partição

O coeficiente de partição foi definido como a razão entre as concentrações da proteína em estudo na fase superior, rica em PEG, e a fase inferior, rica em MD:

$$k = \frac{[M]_{\text{sup.}}}{[M]_{\text{inf.}}} \quad (2)$$

Em que $[M]_{\text{sup.}}$ e $[M]_{\text{inf.}}$ são as concentrações da proteína na fase superior e inferior, respectivamente.

2.6 Quantificação da proteína

Após os sistemas atingirem o equilíbrio, alíquotas de cada fase foram coletadas, diluídas (1:10, v/v) e o conteúdo protéico foi quantificado de acordo com o método de Bradford (BRADFORD, 1976) a 595 nm (Espectrofotômetro UV, Cary 50).

2.7 Cálculo do comprimento da linha de amarração

A equação utilizada para o cálculo do comprimento da linha de amarração (TLL) foi a usada por MAYERHOFF et al. (2004), na partição de *Candida mogii* em SABs:

$$TLL = \sqrt{(P_s - P_i)^2 + (S_s - S_i)^2} \quad (3)$$

Em que P_s e P_i , são as concentrações do polímero nas fases superior e inferior, respectivamente, e S_s e S_i as concentrações do sal em cada uma das fases.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Determinação do coeficiente de partição da caseína

Para todos os sistemas testados foram obtidos coeficientes de partição menores que a unidade ($k < 1$), o que indica maior afinidade da caseína pela fase inferior, rica em MD, ao contrário do comportamento observado para SABs compostos por PEG, sal e água. Os valores do coeficiente de partição para SABs compostos por PEG, maltodextrina e água são apresentados na Tabela 2 (Apêndice 2).

Neste caso, em comparação com os sistemas PEG-sal, a quantidade de polietilenoglicol é baixa (na faixa de 6 a 9 %) sendo também baixo, o número de sítios disponíveis para que ocorram as interações. Estes sítios são ocupados pela maltodextrina para a formação do SAB enquanto que a caseína migra para a fase inferior estabelecendo ligações com a MD. A afinidade da caseína pela fase inferior pode ser atribuída ao fato de que, ao ter poucos sítios disponíveis na cadeia de PEG, e sendo estes sítios ocupados pelas interações PEG-MD, a caseína migrou da fase superior para a inferior. Esta afinidade da caseína pela água se explica pelo caráter hidrofílico da caseína originado no conteúdo de aminoácidos polares que estão presentes na β -caseína, localizados na cadeia N-terminal (CHEFTEL, 1989).

BOLOGNESE et al. (2005), avaliando a separação de albumina de soro bovino, tripsina e lisozima em SABs compostos por um copolímero,

maltodextrina e água observaram a maior afinidade das proteínas pela fase inferior dos sistemas, rica em MD. SILVA e MEIRELLES (2000) verificaram um comportamento oposto na separação de albumina de soro bovino em SABs compostos por PEG e MD.

MACHADO (1999) ao utilizar SABs formados por PEG, MD e água na separação de *Lactobacillus acidophilus* observou que as células apresentaram preferência pela fase superior rica em PEG, em sistemas contendo de 7 a 10 % de PEG-6000 e 15 a 20 % de maltodextrina. Mas uma alteração do meio pelo aumento da concentração do polímero ou pela adição de 0,9 % de NaCl levou ao aumento da população das células na fase inferior, diminuindo o coeficiente de partição.

3.2 Efeito da massa molar do PEG sobre o coeficiente de partição

A Figura 1 apresenta o efeito da massa molar do PEG sobre o coeficiente de partição da caseína, em função da temperatura.

Os resultados indicam a tendência do aumento de k com a elevação da massa molar do polímero utilizado, para ambas as temperaturas testadas. Os menores valores de k foram obtidos usando PEG 1500.

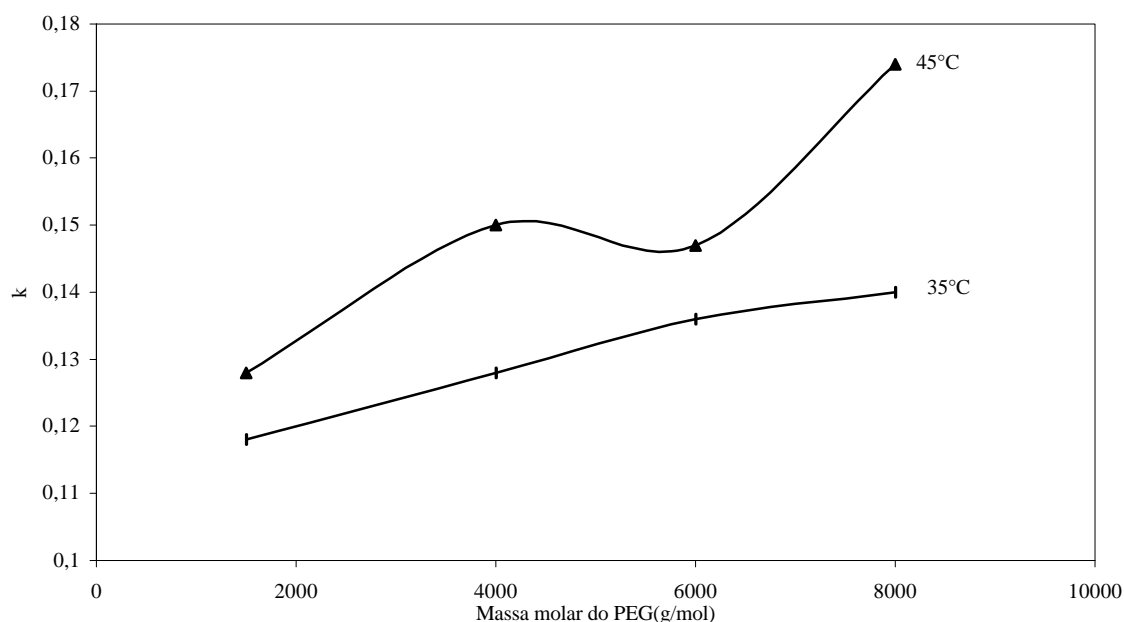


Figura 1. Influência da massa molar do PEG e da temperatura sobre o k . Sistemas compostos por 6 % (m/m) PEG e 25 % (m/m) MD.

Observa-se o aumento do coeficiente de partição da caseína com a elevação da massa molar do PEG. Comportamento semelhante também foi relatado por BASKIR et al. (1989), ao avaliarem a partição de soroalbumina em sistemas poliméricos. Assim a massa molar dos polímeros influencia a partição, alterando tanto o equilíbrio, ou seja, a composição das fases, quanto o número de interações polímero-biocomposto.

SILVA e MEIRELLES (2000) avaliaram o efeito da massa molar sobre o k de proteínas em SABs compostos por PEG e MD, concluindo que para α -lactoalbumina e albumina de soro bovino o coeficiente de partição decresce com o aumento da massa molar do PEG. Resultados similares, para as mesmas proteínas, foram obtidos por ALBERTSSON (1986) e JOHANSSON (1985) com SABs formados por PEG e dextrana.

MACHADO (1999), ao utilizar SABs formados por PEG, MD e água na separação de *Lactobacillus acidophilus*, concluiu que com o aumento da massa molar do PEG, as células migraram para a fase inferior, rica em MD.

3.3 Efeito da temperatura sobre o coeficiente de partição

Na Figura 1 também pode ser observada a influência da temperatura sobre o k da caseína, verificando-se que a elevação da temperatura aumentou o coeficiente de partição para as diferentes massas molares de PEG utilizados.

Quando energia na forma de calor é fornecida ao sistema e sua temperatura aumenta, a energia interna aumenta, elevando a energia cinética média das moléculas dos componentes de fase. Deste modo, as moléculas estão livres para se movimentarem na solução, aumentando a sua entropia configuracional. Ao mesmo tempo, a entropia conformacional do polímero aumenta, pois o aumento da temperatura provoca o enovelamento da cadeia do polietilenoglicol. Isto ocorre devido à transição das ligações carbono-carbono da forma TRANS para a forma CIS, diminuindo o número de sítios ativos para as interações polímero-polímero (DA SILVA e LOH, 2000)

Assim, o calor irá intensificar o movimento moléculas da solução, provocando maior mobilidade das moléculas de MD, o que irá liberar a molécula de caseína e gerar um aumento na competição entre a MD e a

caseína pelos sítios da cadeia de PEG. Ocorrerá um aumento das interações proteína-PEG, o que se refletirá no aumento dos valores do k ao aumentar a temperatura.

Variações na temperatura podem provocar modificações na estrutura dos polímeros que compõem os SABs, influenciando as interações polímero-polímero. Estas interações têm relação direta com a composição das fases do sistema. Portanto, a temperatura pode afetar de maneira diferente os diagramas de equilíbrio das fases de SABs; dependendo dos compostos presentes, este efeito pode ocorrer de acordo com a faixa de temperatura de trabalho (MACHADO, 1999).

3.4 Dependência do coeficiente de partição da caseína com o comprimento da linha de amarração

Em estudos de partição é usual expressar a diferença na composição das fases por meio do comprimento das linhas de amarração (“tie line length”, TLL), que é determinado pela diferença na concentração das fases dos componentes do sistema.

O efeito do TLL sobre o coeficiente de partição foi avaliado neste trabalho para os sistemas formados por PEG 4000, 6000 e 8000, pois para estes sistemas foram estabelecidas as curvas de equilíbrio por MACHADO (1999). Nas Figuras 2 e 3, pode-se observar o efeito do TLL sobre o coeficiente de partição, para as duas temperaturas de trabalho (35 e 45°C), respectivamente.

Segundo SILVA e MEIRELLES (2000), a partição de proteínas em sistemas compostos por PEG e dextrana apresentaram valores do TLL entre 10 e 30 (% m/m), enquanto que em sistemas formados por PEG e MD estes valores oscilaram entre 20 e 60 (% m/m). SILVA e MEIRELLES (2000) usaram PEGs com massa molar de 1450, 8000 e 10000 g mol⁻¹, MD de massa molar de 2000 e 4000 g mol⁻¹, a 25 °C.

No presente trabalho foram obtidos valores entre 30 e 46 (% m/m) para SAB compostos por PEG (4000, 6000 e 8000 g mol⁻¹) e MD, a 35 e 45 °C, como visto na Tabela 2 (Apêndice 2), estão na faixa relatada por SILVA e MEIRELLES (2000).

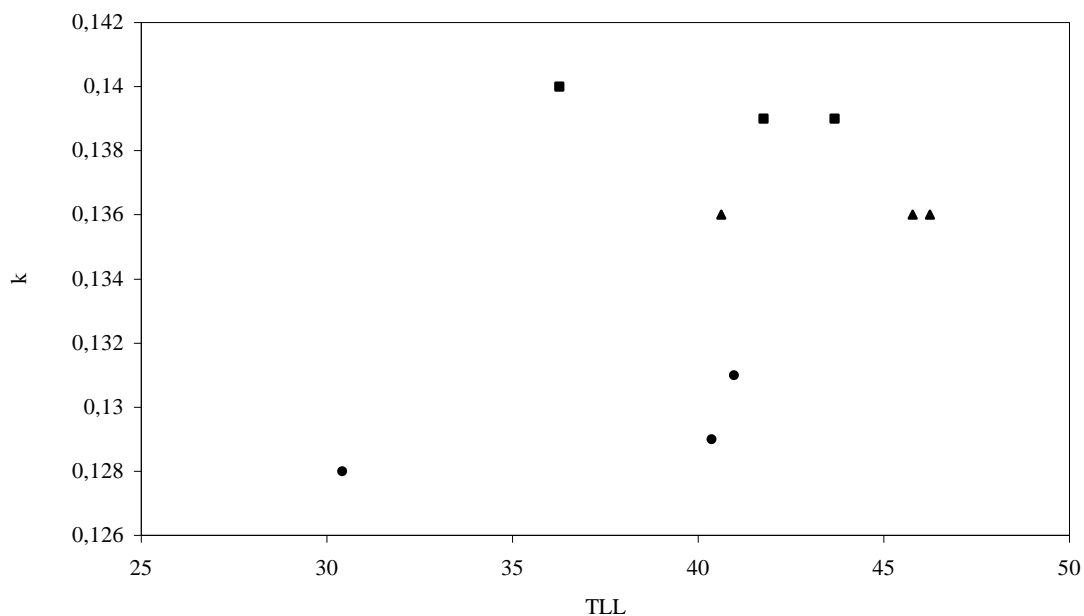


Figura 2. Efeito do TLL sobre o coeficiente de partição da caseína para PEG 4000/MD-DE 10,5 (●), PEG-6000/MD-DE 10,5 (Δ) e PEG-8000/MD-DE 10,5 (■) a 35°C

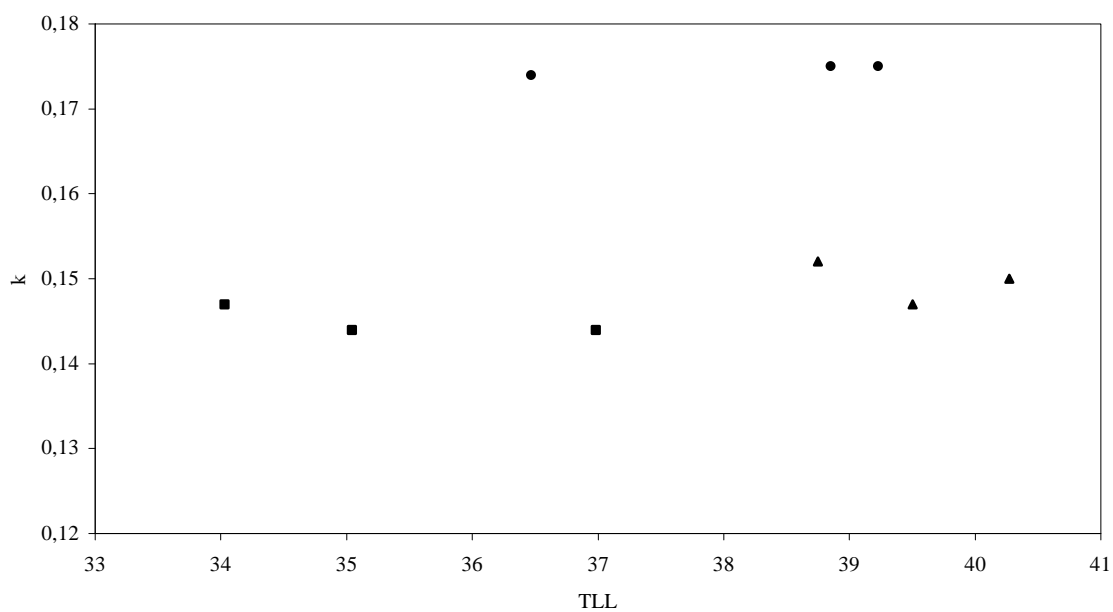


Figura 3. Efeito do TLL sobre o coeficiente de partição da caseína para PEG 4000/MD-DE 10,5 (●), PEG-6000/MD-DE 10,5 (Δ) e PEG-8000/MD-DE 10,5 (■) a 45°C

De acordo com os resultados, a 35 °C, este efeito é desprezível para PEG de massas molares de 6000 e 8000 g mol⁻¹, enquanto que para PEG 4000 evidencia-se uma pequena elevação no valor do k com o aumento da concentração dos componentes de fases, expressa em função do TLL.

À temperatura de 45 °C, para todas as massas molares, o efeito da variação do TLL sobre o coeficiente de partição também foi pequeno, já que o valor do coeficiente de partição permaneceu praticamente constante com o aumento do TLL.

SILVA e MEIRELLES (2001b) obtiveram o mesmo resultado no TLL, ao estudar a partição de α -lactalbumina, β -lactoglobulina e albumina de soro bovino em sistemas formados por PPG1450 e MD 4000.

3.5 Densidade

Para o cálculo da densidade das fases foi utilizada a equação 1. A temperatura ambiente medida foi de, aproximadamente, 26°C. Desta forma, valores para a densidade do ar e da água foram obtidos por interpolação de dados próximos a esta temperatura, consultados na literatura (WEAST, 1975). Na Tabela 2 se relacionam os resultados obtidos.

Observa-se que a densidade das fases é próxima da unidade (1 g mL^{-1}), devido ao alto conteúdo de água, necessária para a formação dos SABs. Observa-se também um pequeno aumento nesses valores com a elevação da massa molar do polímero (exceto para a fase superior dos SABs formados por PEG e MD a 45°C), o que significa uma redução da densidade. O anterior concorda com o exposto por BROOKS e SHARP (1985) que estabeleceram que quanto maior a cadeia do polímero, menos arranjadas estarão as moléculas, justificando a redução da densidade da fase superior, rica em PEG. Assim, a elevação da massa molar do polímero favorece as interações polímero-polímero e desfavorece as interações polímero-água.

Pode-se observar na Tabela 2, que com o aumento da temperatura e da massa molar do PEG, os valores das densidades das fases inferiores aumentam, enquanto que para as fases poliméricas se observa um aumento da densidade à temperatura de 35 °C e um decréscimo na temperatura de 45 °C.

Tabela 2. Valores da densidade em g mL^{-1} para SAB formados por PEG/MD (DE-10,5)

Sistema	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)			
	35		45	
	Fase superior	Fase inferior	Fase superior	Fase inferior
PEG-1500 / MD	1,0694	1,1525	1,0835	1,1789
PEG-4000 / MD	1,0780	1,1984	1,0656	1,1981
PEG-6000 / MD	1,0796	1,2176	1,0519	1,1992
PEG-8000 / MD	1,0844	1,2322	1,0509	1,2008

4. CONCLUSÕES

A partição da caseína em sistemas aquosos bifásicos compostos por polietilenoglicol, maltodextrina e água, foi maior na fase inferior rica em MD (valores de k_r menores que 1). Os melhores resultados foram obtidos ao se trabalhar com PEG-1500 nas duas temperaturas de trabalho, 35 e 45 °C.

O comprimento da linha de amarração não afetou de forma acentuada o coeficiente de partição da caseína.

Em geral, a extração da caseína utilizando sistemas aquosos bifásicos formados por PEG e MD mostrou ser uma técnica eficiente e que pode ser aplicada em escala industrial.

5. BIBLIOGRAFIA

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

ALBERTSSON, P.A.; **Partition of cell and macromolecules**. Stockol: **Almqimt & Wiksells**, p.231; 1960.

APPL, R.C. Confectionery Ingredients from starch. **Food Technology**, Março, p. 148-149, 1991

BOLOGNESE, B.; NERLI, B.; PICÓ, G.; Application of aqueous two-phase systems of ethylene and propylene oxide copolymer-maltodextrin for protein purification; **Journal of chromatography B**; 814; 347-353; 2005

BASKIR, J.N.; HATTON, T.A.; SUTER, U.W.; Protein partitioning in two-phase aqueous polymer systems; **Biotechnology and Bioengineering**.; 34; 541-558; 1989

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

- BRAMANTI, E., FERRI, F., RASPI, G., LAMPUGNANI L., SPINETTI, M.C., MILLER, K.E., SYNOVEC, R.E.; New method for separation and determination of denatured caseins by hydrophobic chromatography; **Talanta**; 54; 343-349; 2001.
- BROOKS, D.E.; SHARP, K.A.; Theoretical aspects of partitioning; In: **Partitioning in Aqueous two-phase systems**; 2; 11-45; 1985
- CHEFTEL, J.C., CUA, J.L., LORIENT, D., **Proteínas alimentarias**. Zaragoza: Editorial Acribia, p. 345, 1989.
- CHRISTIAN, T.J.; MANLEY-HARRIS, G.N.; A preliminary study of the use of larch arabinogalactan in aqueous two-phase systems; **Carbohydrate Polymers**; 35; 7; 1998.
- DA SILVA, L.H.M.; LOH, W.; Calorimetric investigation of the formation of aqueous two-phase systems in ternary mixtures of water, poly (ethylene oxide) and electrolytes (or dextran); **Journal Physic Chemical B.**; 104; 10069-10073; 2000.
- DALGLEISH, D.G.; **Milk proteins, chemistry and physics** In: FOX P.F.; CONDON, J.J.; (Ed) Food Proteins London; Applied science publisher; 1982.
- GUO, C.; CAMPBELL, B.E.; CHEN, K.; LENHOFF, A.M.; VELEC, O.D.; Casein precipitation equilibria in the presence of calcium ions and phosphates; **Colloids and surfaces B**; 29; 297-307; 2003
- GÜNDÜZ, U.; Evaluation of viscosities of two-phase systems containing protein; **Journal of Chromatography B**; 807; 157-161; 2004
- JOHANSSON, G.; Partitioning proteins. In: H. Walter, D.E. Brooks e D. Fisher; **Partitioning in aqueous two-phase systems**, Orlando, Academic Press.; 161-198; 1985

- KINSELLA, J.E.; Relationship between structure and functional properties of food proteins; In: FOX, P.F.; CONDON, J.J.; Food proteins. London: **Applied Science Publisher**, 51-104; 1982.
- LING, T.G.I.; NILSSON, H.; MATTIASSON, B.; Reppal PES-A starch derivate for aqueous two-phase systems; **Carbohydrate Polymers**; 11; 43; 1989
- MACHADO F.L.C; **Equilíbrio de fases para sistemas aquosos bifásicos compostos de polietilenoglicol-maltodextrina-água**; Dissertação Mestrado; UFV, Viçosa, 1999.
- Mc PHERSON, A. E., SEIBRA, P.A. Preparation and properties of wheat and corn starch maltodextrins with a low dextrose equivalent. **Cereal Chemistry**, v.47, n.4, p. 424-430, 1997
- MAYERHOFF, D.V.L.; ROBERTO, I.C.; FRANCO, T.T.; Purification of xilose reductase from *Candida mogii* in aqueous two-phase systems; **Biochemical Engineering Journal**; 18, 217-223, 2004
- SGARBIERI, V.C; **Proteínas em alimentos protéicos, propriedades, degradações e modificações**. São Paulo; Livraria Varela; 1996.
- SILVA, L.H.M.; MEIRELLES, A.J.A.; Phase equilibrium and protein partitioning in aqueous mixtures of maltodextrin with polypropilene glycol; **Carbohydrate polymers**, 46; 267-274; 2001a
- SILVA, L.H.M.; MEIRELLES, A.J.A; Bovine seru albumin, alpha-lactoalbumin and beta-lactoglobulin partitioning in polyethylene glycol/maltodextrin aqueoustwo-phase systems; **Carbohydrate polymers**, 42; 279-282; 2000
- SILVA, L.H.M.; MEIRELLES, A.J.A; Phase equilibrium and protein partition in aqueous mixtures of maltodextrin with polypropilene glycol; **Carbohydrate polymers**, 46; 267-274; 2001b.

SZLAG, D.G.; GIULANO, K.A.; A low cost Two-phase System for enzyme extraction; **Biotechnology Techniques**, 4; 277-282; 1988.

WEAST, R.C.; **Handbook of Chemistry and Physics**; 56th ed.; 1975.

CONCLUSÕES FINAIS

- ❖ Baseando-se nos resultados obtidos, pode-se dizer que foi possível a *separar* a caseína utilizando sistemas aquosos bifásicos compostos por PEG/sal e PEG/MD.
- ❖ O sistema aquoso bifásico PEG/sal, mais adequado para a *separação* de caseína foi aquele cuja concentração dos componentes foi 25 % (m/m) para PEG e 13 % (m/m) para sal, obtendo-se um valor de coeficiente de partição igual a 10,8.
- ❖ Em relação à *separação* e *recuperação* da caseína em sistemas salinos os melhores valores do coeficiente de partição (10,8) e porcentagem de recuperação (99 %), foram obtidos ao se utilizar PEG-1500 e fosfato de potássio, a 25 °C.
- ❖ O sistema aquoso bifásico, 6 % (m/m) PEG 1500 e 25 % (m/m) MD, a 35 °C, foi o mais adequado para a *separação* de caseína, obtendo-se valores de k na faixa de 0,118 a 0,123.
- ❖ Observou-se que com o aumento da massa molar do PEG a tendência do coeficiente de partição foi decrescente para sistemas PEG/sal e crescente para sistemas PEG/MD.

- ❖ O comportamento dos diferentes tipos de sais utilizados neste trabalho é similar em todos os casos, sendo que os melhores valores do coeficiente de partição foram os obtidos com PEG-1500, a 25°C, utilizando como sal o fosfato de potássio, seguido pelo sulfato de lítio e o sulfato de amônio. Para o sulfato de zinco não foram obtidos dados de partição, já que a proteína permaneceu totalmente pela fase superior, rica em PEG.

- ❖ Observou-se um aumento do coeficiente de partição, para sistemas salinos, na faixa de temperatura de 5 a 25 °C e um decréscimo no mesmo na faixa de 25 a 45 °C. Este comportamento foi atribuído às características próprias da proteína em estudo.

- ❖ A caseína presente nas fases polimérica e salina dos diferentes SABs testados, foram purificadas satisfatoriamente mediante o uso da CEM, obtendo-se, aproximadamente, 99 % como percentagem do grau de recuperação.

- ❖ Foi possível estabelecer medidas da densidade das fases para os dois tipos de sistemas estudados (PEG/sal e PEG/MD).

APÊNDICE 1

TESTES PRELIMINARES

1.1 Determinação da concentração dos componentes de fases em sistemas salinos

Polietilenoglicol 1500, fosfato de potássio (monobásico e dibásico; pH 7) e água, na temperatura de 25 °C, foram os componentes usados para selecionar a composição dos sistemas que levassem aos maiores valores do coeficiente de partição, baseando-se nos diagramas de equilíbrio estabelecidos por CARVALHO (2004).

Procedimentos estatísticos, características e condições dos sistemas de trabalho, como: relação de volumes das fases (próxima da unidade), estimativa do desvio padrão, maior valor do k e a menor percentagem de erro no balanço de massa, foram os aspectos avaliados na escolha do sistema aquosos bifásico mais adequado à separação da caseína, conforme apresentado na Tabela 1.

A relação de volume das fases foi calculada através da razão entre o volume da fase superior rica em PEG e o volume da fase inferior rica no sal. Partindo da densidade da água, na temperatura ambiente, e da relação $r = \frac{m}{V}$, uma correlação foi obtida em função do volume da água e da altura da mesma no tubo. Por exemplo, para o tubo 1 foi obtida a relação, $y = 5,154x - 3,9447$, em que x é a altura medida em cm e y é o volume

correspondente em mL. Desta forma, antes de retirar as alíquotas de cada fase, media-se a altura da fase com régua e calculava-se o volume correspondente.

Tabela 1. Relação de critérios utilizados na escolha da melhor composição do SAB

Critérios	Sistema testado											
	PEG 1500/ fosfato de potássio (% m/m)											
	16/15	16/13	16/8,8	17/15	17/13	17/8,8	21/15	21/13	21/8,8	25/15	25/13	25/8,8
Relação dos volumes das fases	0,7	0,8	0,9	0,7	0,8	0,9	0,8	0,9	0,9	1	1	0,9
Valor do k	2,75	5,07	7,08	3,4	7,48	18,31	5,0	9,6	15	9,86	10,8	13
Estimativa do desvio padrão de k	±0,05	±0,04	±0,20	±0,01	±0,25	±0,37	±0,05	±0,04	±0,15	±0,09	±0,01	±0,25
% de erro no balanço de massa	1,79	1,9	2,2	1,33	1,31	6,03	1,96	1,34	1,30	0,33	0,24	1,4

Foram escolhidos aqueles sistemas com relação de volume de fase igual ou próximo de 1.

Os valores de coeficiente de partição na maioria das composições testadas para os SAB PEG 1500 e fosfato de potássio, foram menores que 10. Foram selecionados os sistemas com *k* superiores ou iguais a 10, para dar prosseguimento aos estudos.

Estimativa do desvio padrão de k foi estabelecida como a variabilidade do valor do coeficiente de partição. Por exemplo, para o SAB composto por 25,0 % de PEG e 8,8 % de fosfato de potássio, se obtiveram valores do *k* na faixa de 12,75 e 13,25. Foram considerados aqueles sistemas com a menor variabilidade de dados do coeficiente de partição.

Porcentagem de erro no balanço de massa, foram considerados os menores valores, sendo que para a maioria dos sistemas ao percentual de erro foi menor ou igual a 6.

Experimentos fatoriais, aplicados no delineamento inteiramente casualizado (DIC) com análise da variância (ANOVA) e nível de significância

de 5 % foi o método estatístico utilizado para escolha do melhor sistema formado por PEG 1500 e fosfato de potássio.

Os resultados da análise de variância (Tabela 2) mostraram que não houve diferença significativa e também não foi observada interação entre as várias concentrações testadas, ou seja, não é possível aplicar nenhum teste de médias para determinar qual dos sistemas testados é o mais adequado à separação de caseína.

O sistema formado por 25 % (m/m) PEG 1500, 13 % (m/m) fosfato de potássio e 62 % (m/m) água, foi o selecionado para dar continuidade ao trabalho, pois, segundo os critérios estabelecidos, foi o mais adequado na separação da caseína. Adicionalmente, este sistema gera fases com composição distante do ponto crítico, o que não ocorre para o sistema 17 % (m/m) PEG 1500, 8,8 % (m/m) sal, cujo valor de k foi igual a 18,31.

Tabela 2. Análise de variância para a escolha do melhor SAB à separação da caseína

FV	GL	SQ	QM	F_c	F_t
A	2	46,096	24,548	0,73 ^{n.s.}	3,44
B	3	21,513	7,171	0,21 ^{n.s.}	3,05
AxB	6	15,038	2,5	0,075 ^{n.s.}	2,55
Tratamentos	(11)	82,65			
Resíduos	24	79,799	33,24		
Total	35				

Em que:

FV	Fator de variância
A	Tratamento A., porcentagem de PEG
B	Tratamento B, porcentagem de sal
A x B	Interação dos tratamentos A e B
GL	Graus de liberdade
SQ	Soma de quadrados
QM	Quadrado médio
F _c	Valor calculado de F
F _t	Valor tabulado de F
n.s.	não significativo ao nível de 5 % de significância

1.2 Determinação da quantidade de proteína adicionada ao sistema

Sendo que o método de quantificação da proteína usado neste trabalho, método de Bradford, apresenta a desvantagem no trabalho com quantidades elevadas de proteínas, pois os resultados se afastam da região linear, testou-se a quantidade de proteína mínima detectável por esse método. Para tanto, foram adicionadas ao sistema 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg mL⁻¹ de proteína, e segundo a Figura 1, o valor do coeficiente de partição é constante ao aumentar a quantidade de proteína adicionada ao sistema.

A quantidade mínima detectável pelo método de Bradford nos sistemas foi de 1 mg mL⁻¹. Quantidades menores adicionada aos sistemas dificultavam a leitura por espectrofotometria no UV visível, gerando erros no balanço de massa. Na Figura 2, se mostra a curva analítica da caseína utilizada neste trabalho para calcular a concentração da proteína nas fases.

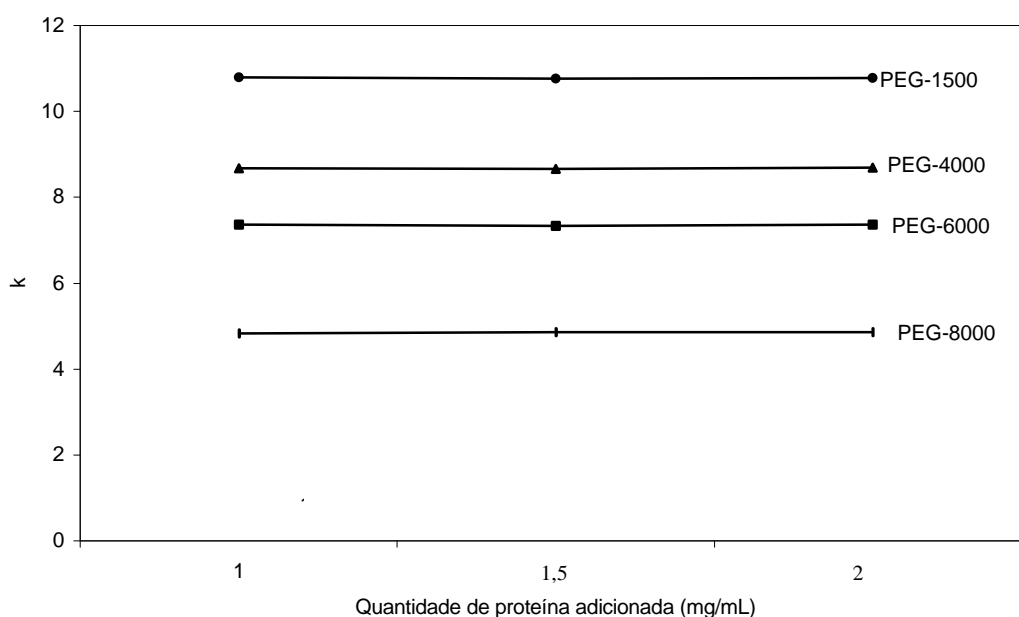


Figura 1. Determinação da quantidade inicial de proteína nos SABs compostos por 25 % (m/m) PEG, 13 % (m/m) sal e 62 % (m/m) água

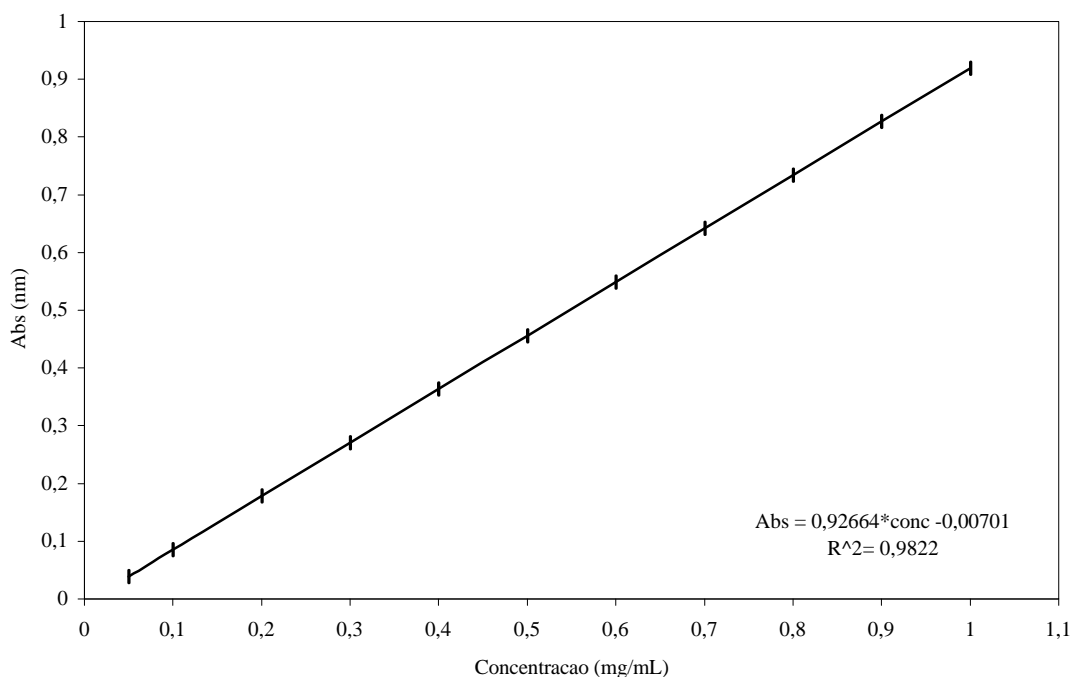


Figura 2. Curva analítica da caseína pelo método de Bradford

1.3 Bibliografia

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

CARVALHO, C.; **Estudo de equilíbrio de fases para sistemas aquosos bifásicos compostos por polietilenoglicol, sais e água**. Dissertação de tese de Mestrado em Ciência Tecnologia de alimentos; Viçosa; UFV; 2004.

Determinación de proteínas totales: Método de Bradford, disponível em: www.webspawner.com/users/labtox/, Fevereiro 2005.

APÊNDICE 2
VALORES DO COEFICIENTE DE PARTIÇÃO DA CASEÍNA

Tabela 1. Comprimento das linhas de amarração (TLL) e coeficiente de partição para caseína em sistemas compostos por PEG, MD e água.

SISTEMA	TEMPERATURA (°C)	SABs		% TLL	<i>k</i>
		% PEG	% MD		
PEG-4000/ MD-DE10,5	35	6	25	30,408	0,128
		7,5	27	40,357	0,129
		8	28	40,968	0,131
PEG-6000/ MD-DE10,5	35	6	25	40,629	0,136
		8	28	45,774	0,136
		9	30	46,234	0,136
PEG-8000/ MD-DE10,5	35	6	25	36,251	0,140
		9	26	41,753	0,139
		9,5	28	43,674	0,139
PEG-4000/ MD-DE10,5	45	6	25	38,749	0,152
		7	27	39,505	0,147
		8	28	40,274	0,150
PEG-6000/ MD-DE10,5	45	6	25	34,029	0,147
		7,5	26	35,044	0,144
		8	28	36,983	0,144
PEG-8000/ MD-DE10,5	45	6	25	36,466	0,174
		8	27	38,851	0,175
		9	28	39,227	0,175

Tabela 2. Coeficientes de partição da caseína em SABs formados por PEG de diferentes massas molares, diferentes tipos de sais e diferentes temperaturas

Temperatura (°C)	Tipo de sal	Massa molar do PEG	k
25	Fosfato de potássio	1500	10,80
		4000	8,67
		6000	7,36
		8000	4,83
45	Fosfato de potássio	1500	10,21
		4000	7,35
		6000	7,32
		8000	4,41
5	Fosfato de potássio	1500	3,92
		4000	4,19
		6000	3,83
		8000	3,66
25	Sulfato de lítio	1500	9,27
		4000	7,66
		6000	6,76
		8000	5,44
45	Sulfato de lítio	1500	5,80
		4000	4,83
		6000	4,35
		8000	3,96
5	Sulfato de lítio	1500	3,81
		4000	3,67
		6000	3,67
		8000	3,36
25	Sulfato de amônio	1500	7,26
		4000	6,92
		6000	6,20
		8000	5,66
45	Sulfato de amônio	1500	5,44
		4000	4,98
		6000	4,69
		8000	4,39
5	Sulfato de amônio	1500	3,30
		4000	3,76
		6000	2,88
		8000	2,60
25	Sulfato de zinco	1500	---
		4000	---
		6000	---
		8000	---
45	Sulfato de zinco	1500	---
		4000	---
		6000	---
		8000	---
5	Sulfato de zinco	1500	---
		4000	---
		6000	---
		8000	---

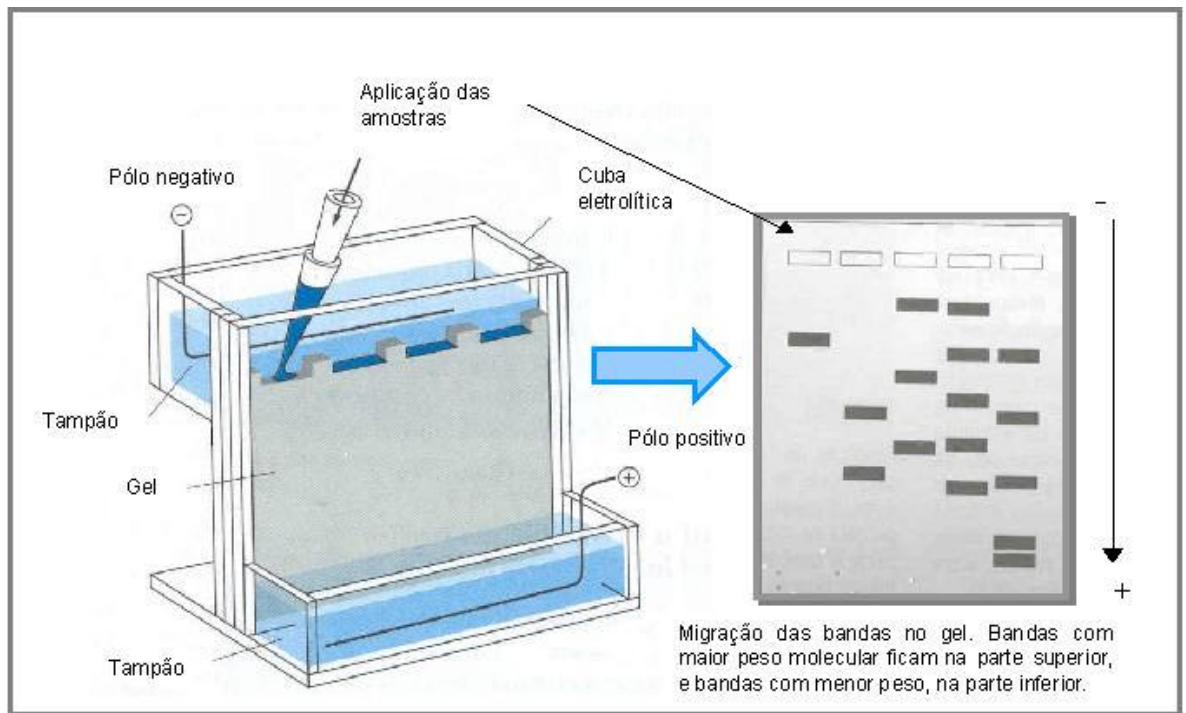
APÊNDICE 3

ELETROFORESE

3.1 Fundamento teórico

O termo eletroforese foi criado por Michaelis, em 1909, para descrever a migração de colóides sob a influência de um campo elétrico, a eletroforese representa por tanto, a migração de íons submetidos à corrente elétrica (COUTO, 1998).

A eletroforese consiste na migração de moléculas ionizadas, de acordo com suas cargas elétricas e pesos moleculares em campo elétrico (ver figura). Moléculas com carga negativa migram para o pólo positivo (ânodo) e moléculas com carga positiva migram para o pólo negativo (cátodo). A carga líquida das moléculas é função somatória dos aminoácidos que as constituem. Em razão das proteínas serem substâncias anfóteras, ou seja, capazes de adquirirem carga positiva ou negativa em função do pH, é indispensável manter constante o pH do meio durante a eletroforese, pelo uso de soluções-tampão.



O sistema-tampão usado consiste em duas partes: o tampão do gel usado na preparação do gel e o tampão do tanque, ou cuba eletrolítica, na qual se encontram os eletrodos (ânodo e cátodo). Nos tampões dos tanques e do gel, a corrente elétrica é conduzida por íons, e nos eletrodos, por elétrons. Na presença de um sistema-tampão adequado, a hidrólise da água, que se dá na superfície dos eletrodos, permite a troca entre elétrons e íons.

A eletroforese pode ser conduzida em solução com gradiente de densidade ou em diferentes meios-suporte, tais como papel de filtro, sílica gel, membranas de acetato de celulose, gel de agarose, amido ou poliacrilamida, entre outros. O suporte deve ser química e fisicamente inerte, de modo a não interferir na mobilidade das moléculas. No caso de eletroforese em géis, especialmente de poliacrilamida, a migração das moléculas é profundamente influenciada pelas malhas (poros) do gel.

Para que a técnica funcione, deve ser desenvolvida sob voltagem (V), corrente (I) e potência (W) constantes, fornecidas por uma fonte apropriada de energia que tem por princípio converter a corrente alternada em corrente contínua. Além disso, depende de vários fatores, muitos deles oriundos da maneira e das condições que a técnica é conduzida, embora algumas condições mínimas sejam requeridas para seu sucesso.

Para proteínas, geralmente os géis são imersos numa solução de "coomasie blue", como corante, e, para enzimas, os géis são incubados em solução específica, contendo os componentes (substrato, coenzimas, solução-tampão e sais) necessários para a revelação das bandas de atividade enzimática. O conjunto das bandas nos géis é denominado Zimograma, que pode ser representado por fotografias ou esquemas.

No caso de moléculas de DNA ou de RNA, vários são os sistemas de revelação das bandas. Estes são consequência dos corantes usados. Quando se usa o corante brometo de etídio no gel ou na amostra, a detecção das bandas é feita através da fluorescência, emitida por esse corante, em presença da luz ultravioleta. Pode-se, também, detectar as bandas através de radioatividade, de nitrato de prata e de quimiluminescência. A escolha é feita a partir do tipo de técnica que se deseja empregar ou da conveniência e praticidade em cada laboratório (Figura 2) (COUTO, 1998; EMBRAPA, 2001)

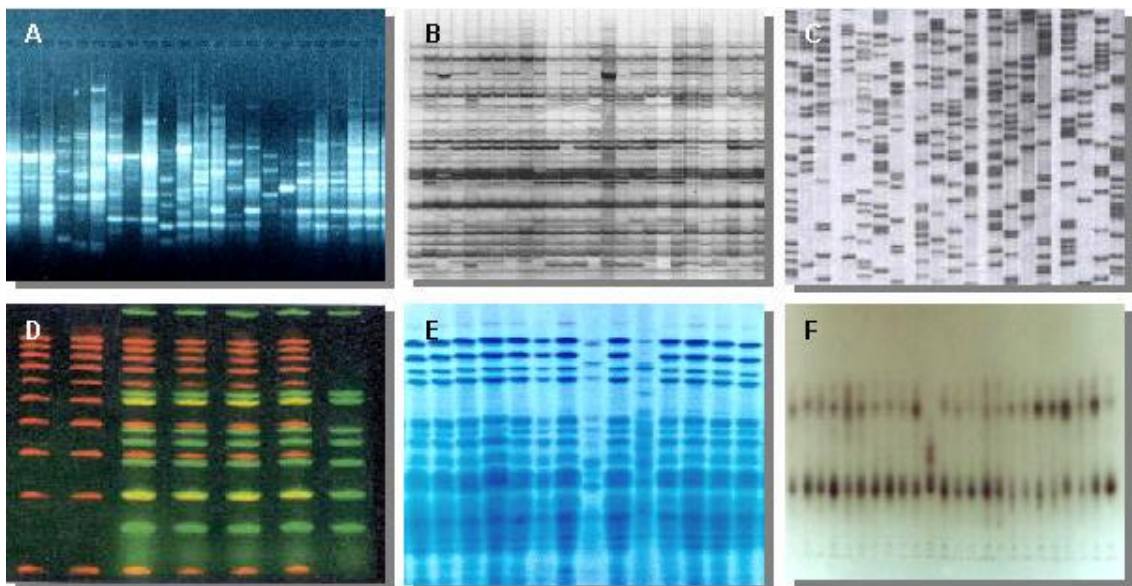


Figura 2. Diferentes sistemas de revelação dos géis: **a)** brometo de etídio; **b)** nitrato de prata; **c)** raio – X; **d)** quimiluminescência; **e)** coomasie blue e **f)** fast blue BB salt, α e β nafetil acetato.

3.2 Eletroforese da caseína em SABs

Neste trabalho utilizou-se a eletroforese com uma técnica qualitativa, tendo como objetivo monitorar a presença da caseína nas fases dos sistemas aquosos bifásicos. Para isso, utilizou-se a técnica conhecida como eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE. O equipamento usado foi sistema vertical de placas, cujas dimensões são 140 mm de altura e 160 mm de largura (SIGMA ALDRICH, USA). O método para a realização deste técnica foi o proposto por COUTO (1998).

Na Figura 3 se mostra a eletroforese SDS-PAGE da caseína nas fases onde se encontrava em maior concentração, fase superior e inferior, para os sistemas compostos por PEG/sal e PEG/MD, respectivamente.

A quantidade de amostra colocada no gel foi de 10 μ L, o tempo de corrida foi de aproximadamente 2 horas e a técnica de revelação utilizada foi “coomassie blue”. Pode-se dizer que a eletroforese foi uma ferramenta que auxiliou a comprovar presença da caseína nas fases coletadas dos sistemas aquosos bifásicos, possibilitando assim sua posterior análise por CEM.

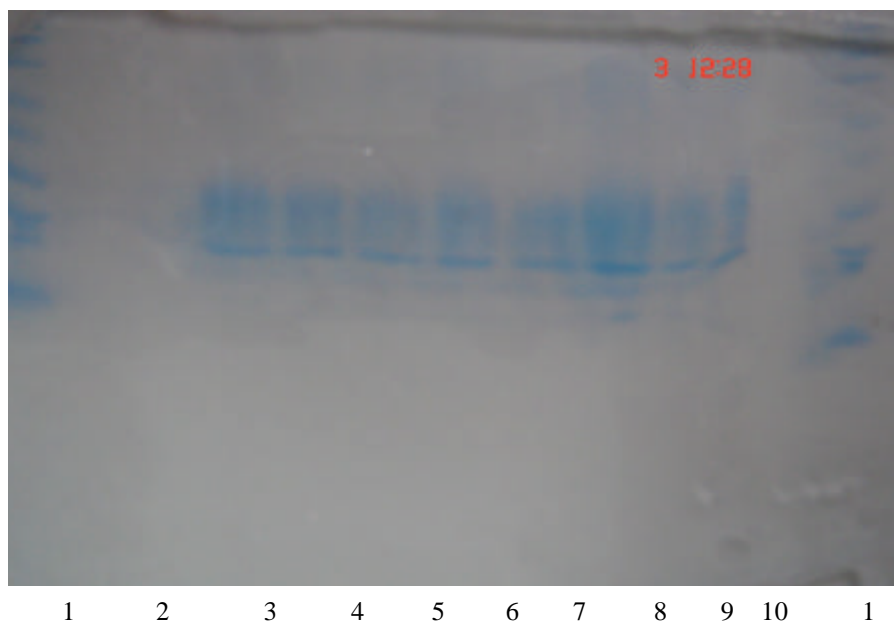


Figura 3. Eletroforese em gel de poliacrilamida para confirmar a presença da caseína nas fases dos SABs estudados. (de esq a dir.) **1.** marcador, **2.** PEG-1500, **3.** fase superior SAB PEG-1500/fosfato de potássio (25°C), **4.** fase superior SAB PEG-1500/fosfato de potássio (45°C) **5.** fase superior SAB PEG-1500/sulfato de lítio (25°C), **6.** fase superior SAB PEG-1500/sulfato de amônio (25°C), **7.** fase superior SAB PEG-1500/sulfato de zinco(25°C), **8.** solução de caseína (10 mg/mL), **9.** fase inferior SAB PEG-1500/MD (35°C), **10.** fase inferior SAB PEG-1500/MD (45°C)

3.3 Bibliografia

COUTO ALFENAS , A.; **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**; fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos, editora UFV, cap. 4; pg. 151; 1998.

EMBRAPA (2001), disponível em:
www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do06_2.htm, Outubro 2005.