

ABRAHAM DAMIAN GIRALDO ZUÑIGA

**ESTRATÉGIA DE PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS α -LACTOALBUMINA E β -
LACTOGLOBULINA DO SORO DE QUEIJO**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2003**

ABRAHAM DAMIAN GIRALDO ZUÑIGA

**ESTRATÉGIA DE PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS α -LACTOALBUMINA E
 β -LACTOGLOBULINA DO SORO DE QUEIJO**

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

APROVADA: 11 de Junho de 2003.

Prof. Luis Antonio Minim
(Conselheiro)

Prof. José Antonio M. Pereira
(Conselheiro)

Prof. Luis Henrique Mendes da Silva

Prof^a. Vânia Regina Nicoletti Telis

Prof^a Jane Sélia dos Reis Coimbra
(Orientadora)

A Deus.

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

Ao meu pai in memoriam

AGRADECIMENTO

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

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

À professora Jane Sélia dos Reis Coimbra, pela oportunidade que me deu para a realização da tese, pela orientação, pelo apoio, pelos ensinamentos, pela amizade e paciência.

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

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

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

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

Aos amigos do Laboratório de Processos de Separação (LPS) da Universidade Federal de Viçosa, Alexandre, Rafael, Renata, Carolina, e Sergio, pelo convívio harmonioso e companheirismo, especialmente ao Sérgio, pelo software fornecido, e a todos aqueles que, de alguma outra forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

CONTEÚDO

RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	ix
2. ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	
2.1. Obtención de Fracciones Enriquecidas de α -Lactoalbumina Y β -Lactoglobulina Usando Cromatografía de Intercambio Iônico en Escala Semipreparativa.....	01
2.2. Otimização da Dessorção de α -Lactoalbumina β -Lactoglobulina em Cromatografia de Troca Iônica.....	15
2.3. Separação e Purificação da α -Lactoalbumina e β -Lactoglobulina por Integração da Cromatografia de Troca Iônica, Sistemas Aquosos Bifásicos e Cromatografia de Exclusão Molecular.....	34
2.4. Estudo Preliminar de Implantação de Uma Unidade de Purificação de Proteínas do Soro de Queijo.....	55
2.5. Extração Líquido – Líquido Usando Sistemas Aquosos Bifásicos: Uma Revisão.....	75
2.6. Propriedades Funcionais e Nutricionais das Proteínas do Soro de Leite.....	107
2.7. Revisão: Técnicas Usadas no Processo de Purificação de Biomoléculas.....	132
3. CONCLUSÕES GERAIS.....	156

RESUMO

ZUÑIGA, Abraham Damian Giraldo, D.S., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2003. **Estratégia de Purificação das Proteínas α -lactoalbumina e β -lactoglobulina do Soro De Queijo**. Orientadora: Jane Sélia dos Reis Coimbra. Conselheiros: Luis Antonio Minim e José Antonio Marques Pereira.

A extração líquido-líquido convencional, usando soluções aquosas e solventes orgânicos, não é adequada para separar compostos de origem biológica, como proteínas e células, pois a estabilidade destas é baixa em solventes orgânicos. Uma variante da extração líquido-líquido tradicional, compatível com os processos de biosseparações, é a partição em SAB, a qual vem sendo usada com sucesso no isolamento de proteínas e de outras biomoléculas. As técnicas cromatográficas destacam-se também na purificação de biomoléculas, pela sua elevada resolução. Neste trabalho foram utilizadas as técnicas de Cromatografia de Troca Iônica (CTI), Sistemas Aquosos Bifásicos (SAB) e Cromatografia por Exclusão Molecular (CEM) para desenvolver uma estratégia de purificação das proteínas do soro de queijo α -lactoalbumina (α -la) e β -lactoglobulina (β -lg). Na etapa de adsorção foi empregada a cromatografia de troca iônica com a resina Accell Plus QMA[®],

ocorrendo uma adsorção seletiva das proteínas α -la e β -lg. Na etapa de pré-purificação das proteínas foi empregado um sistema aquoso bifásico composto por 18% de polietilenoglicol 1500 Da (PEG) + 18% de fosfato de potássio (FFP). Os coeficientes de partição das proteínas mostraram que a α -la migrou para a fase rica em PEG e a β -lg para a fase rica em FFP. Na etapa de polimento foi utilizada a cromatografia por exclusão molecular (CEM) para purificar as proteínas α -la e β -lg presentes, respectivamente, nas fases polimérica e salina do sistemas aquosos bifásicos compostos por PEG + água + FFP. As soluções aquosas provenientes da CEM, contendo α -la e β -lg foram então liofilizadas, obtendo-se uma pureza de 93% para α -la e 97% para β -lg, com rendimentos aproximados de 47% e 65% para α -la e β -lg, respectivamente. Por fim um estudo financeiro preliminar para a implantação de uma unidade de purificação destas proteínas apresentou um elevado grau de atratividade do projeto com uma taxa de retorno de capital (TRC) inferior a três anos e uma taxa interna de retorno (TIR) superior a 35%.

ABSTRACT

ZUÑIGA, Abraham Damian Giraldo, D.S., Universidade Federal de Viçosa, June, 2003. **Purification Strategy of proteins α -lactalbumin and β -lactoglobulin of whey.** Adviser: Jane Sélia dos Reis Coimbra. Committee Members: Luis Antonio Minim and José Antonio Marques Pereira.

Convectional liquid-liquid extraction based on partition between an aqueous phase and water-immiscible organic solvent is not appropriate for biomolecules separation, such as proteins, due to its low stability in organic solvents. An alternative is the partitioning using ATPS, which has been applied recently with success for isolation of proteins and other biomaterials. The strategy developed for purification whey proteins α -lactalbumin (α -la) e β -lactoglobulin (β -lg) employed a combination of ion exchange chromatography, aqueous two-phase system and size exclusion chromatography (SEC) techniques. In the stage of adsorption ion exchange chromatography was used with Accell Plus QMA ® resin. A selective adsorption of the proteins α -la and β -lg was verified. Aqueous Two-Phase Systems (ATPS) composed by 18% (w/w) polyethylene glycol 1500 Da (PEG) + 18% (w/w) potassium phosphate (FFP) was used in intermediary purification stage. The proteins α -la and β -lg were satisfactorily separated in aqueous two-phase systems. Practically all β -lg remained in the saline phase, and α -la was largely transferred to the polymeric phase. Size exclusion chromatography (SEC) was used in the polish stage to

purify the whey proteins α -la and β -lg present, respectively, in the polymeric and saline phases of aqueous two-phase systems, composed by 18% (w/w) PEG 1500 Da + 18% (w/w) (FFP). The yield and purity from whey proteins was approximately 93% and 47% and 97% and 65% to α -la and β -lg, respectively. To conclude the study, a preliminary financial analysis was accomplished for the implantation of a unit proteins purification. This study showed high attractiveness of the project, presented a return of investment inferior to three years and a return internal rate superior to 35%.

1. Introdução Geral

As proteínas do soro de queijo possuem elevado valor funcional e nutricional. Podem ser usadas como espumantes, emulsificantes e são consideradas ingredientes alimentícios potenciais, com capacidade para substituir outros ingredientes de características semelhantes, como a clara de ovo, ovo integral ou leite em pó desnatado em uma ampla variedade de produtos alimentícios, como por exemplo em produtos de panificação, produtos cárneos, na fortificação de cereais, bebidas nutricionais, queijos, produtos farmacêuticos (USDEC, 1997), na microencapsulação de lipídeos do leite (KEOGH et al., 1999), em produtos extrusados (ONWULATA et al., 2001), no preparo de alimentos funcionais, filmes comestíveis e alimentos nutraceuticos (MANN, 2000). A α -lactoalbumina (α -la) e a β -lactoglobulina (β -lg) são as proteínas presentes em maior quantidade no soro de queijo e constituem cerca de 70% do conteúdo protéico total do soro (MORR e HA, 1993). Estas proteínas em forma purificada são benéficas à saúde (ETZEL, 2000). Dentre as funções atribuídas à α -la e à β -lg encontram-se as anticarcinogênicas, digestiva, reguladoras do sono e da vigília, sendo também usadas como suplemento alimentício (MCINTOSHI et al., 1998) e no desenvolvimento de fórmulas especiais, como por exemplo alimentos para pessoas com fenilcetonúria, uma enfermidade que provoca a não-metabolização de fenilalanina e causa, entre outros problemas, a deficiência mental (GRASSELLI et al., 1997).

O crescimento da produção de soro no Brasil, aproximadamente 3,2 milhões de toneladas (ANUALPEC, 2002), resultante da demanda de queijo, criou um problema para a indústria de laticínios, isto é, a poluição produzida pelo soro nos mananciais de água devido à sua alta demanda bioquímica de oxigênio (40.000 a 60.000 mg.L⁻¹) (FERRAT, 1980), pois somente 55% do total de soro produzido é utilizado em produtos alimentícios de forma geral. Com o passar dos anos, esse problema torna-se cada vez mais saliente, em razão do surgimento, dentro da opinião pública e da economia em geral, de uma preocupação predominante que é a luta contra a poluição.

Devido à vasta aplicabilidade das proteínas do soro de queijo e aos grandes volumes de soro produzidos tanto no Brasil, quanto no mundo, várias

técnicas tem sido utilizadas para sua separação e isolamento. Dentre elas pode-se mencionar a cromatografia de troca iônica em leito fluidizado (CARRÈRE et al., 1996), filtração em gel (YOSHIDA, 1990), precipitação com polifosfatos (AL-MASHIKI e NAKAI, 1987), cromatografia de troca iônica (GERBERDING e BYERS, 1998; HAHN et al., 1998, MANJI et al; 1985), ultrafiltração (MEHRA e DONNELLY, 1993), combinação dos processos de precipitação e diafiltração (PETRA et al., 1997) e adsorção bioseletiva (GURGEL et al., 2001), dentre outros. Existem também algumas patentes para o fracionamento das proteínas α -la e β -lg, como as de OUTINEN et al. (1996) e de ETZEL (1999).

Os resultados alcançados nos trabalhos citados levaram a valores máximos de pureza de 91,9% para β -lg e de 90,6% para α -la, quando foi utilizada uma resina composta por um hexapeptídeo covalente (GURGEL et al., 2001). Considerando que estes valores possam ser aumentados busca-se desenvolver processos de separação e purificação alternativos, que possam ser aplicados em escala contínua, que sejam técnica e economicamente viáveis, assim como de fácil aumento de escala e que produzam frações com elevados níveis de pureza.

Portanto, este trabalho visou estabelecer uma estratégia alternativa de purificação das proteínas do soro de queijo α -la e β -lg mediante a integração das técnicas de adsorção, extração líquido-líquido com sistemas aquosos bifásicos e de cromatografia por exclusão molecular (CEM). A CEM foi empregada como etapa de polimento para separar as proteínas das fases do sistema aquoso bifásico a fim de obtê-las puras. A etapa final de liofilização foi utilizada para concentrar o produto purificado. O trabalho está organizado em forma de artigos científicos, sendo os três últimos apresentados, como anexos, na forma de artigos de revisão. Sendo assim distribuídos:

1. Obtención de Fracciones Enriquecidas de α -lactoalbumina y β -lactoglobulina Usando Cromatografía de Intercambio Iónico en Escala Semipreparativa.
2. Otimização da Dessorção da α -lactoalbumina e β -lactoglobulina em Cromatografia de troca Iônica.
3. Separação e Purificação da α -lactoalbumina e β -lactoglobulina por Combinação da Cromatografia de Troca Iônica, Sistemas Aquosos Bifásicos e Cromatografia de Exclusão Molecular.
4. Análise técnica e financeira de uma unidade de purificação de proteínas do soro de queijo.

5. Extração Líquido – Líquido Usando Sistemas Aquosos Bifásicos: Uma Revisão.
6. Propriedades Funcionais das Proteínas do Soro de Leite.
7. Técnicas Usadas no Processo de Purificação de Biomoléculas.

Com este trabalho espera-se obter frações protéicas com elevado grau de pureza em α -la e β -lg contribuindo assim para o aumento do valor agregado do soro de queijo e para a redução do problema da poluição ambiental causada pelo descarte do soro no solo e em leitos de rios.

2. Referências bibliográficas

- ALBERTSSON, P. A . **Partition of cell and macromolecules**. New York: John Wiley, 1986. 346 p.
- AL-MASHIKI, S. A., NAKAI, S. Reduction of β -lactoglobulin content of cheese whey by polyphosphate precipitation. **Journal Food Science**, v.52, n.5, p.1237-1240, 1987.
- ANUALPEC. Anuário da Pecuária Brasileira. São Paulo-Brasil: FNP Consultoria & Comercio, 2002. 400p.
- CARRÈRE, H., BASCOUL, A., FLOQUET, P., WILHELM, A. M., DELMAS, H. Whey proteins extraction by fluidized ion exchange chromatography: simplified modeling and economical optimization. **The Chemical Engineering Journal**, v. 64, p. 307-317, 1996.
- COIMBRA, J. R., TÖMMES, J., KULA, M. R., Continuous separation of whey proteins with aqueous two-phase systems in a graesser contactor. **Journal of Cromatography A**, v.668, n.1, p. 85-94, 1994.
- ETZEL, M. R. Isolation Beta-lactoglobulin and alpha-lactalbumin by eluting from a cation exchanger without sodium chloride. **United States Patent**, N° 126904, 1999.
- ETZEL, M. R. A new way to separate whey proteins?. **Food Engineering** , v. 3, p. 12, 2000.
- FERRAT, A. Como valorizar o subproduto das fábricas de queijos, o "Lacto Soro". **Boletim do leite**, v.618, p.32-38, 1980.
- FERREIRA, R. C. **Separação de α -lactoalbumina e β -lactoglobulina de proteínas do soro de queijo por adsorção em colunas de leito fixo**, Viçosa, MG: DTA, UFV, 2001. Dissertação (Mestrado), Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa , 2001, 81p.
- GERBERDING, S. J., BYERS, C. H. Preparative ion-exchange chromatography of proteins from dairy whey. **Journal of Chromatography**, v. 808, p.141-151, 1998.
- GRASSELLI, M., NAVARRO, A., FERNANDEZ, H. L., MIRANDA, M. V., CAMPERI, I., OSVALDO CASCONI. Que hacer com el suero de queso. **Ciencia Hoy**, v.43, n.1, p.27-35, 1997.
- 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. **Ciencia y Tecnologia de Alimentos**, v. 3, n. 3, p. 149-155, 2001.

- GURGEL, P., CARBONELL, R. G., SWAISGOOD, H. E. Fractionation of whey proteins with a hexapeptide ligand affinity resin. **Bioseparation**, v.9, p.385-392, 2001.
- HAHN, R., SHULZ, P. M., SCHAUPP, C., JUNGBAUER, A. Bovine whey fractionation based on cation-exchange chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 795, p.277-287, 1998.
- USDEC, **Manual de referência para produtos de soro dos EUA**. Arlington , VA 22201-3001 U.S.A, 1997.
- KEOHJ, M. K., O'KENNEDY, B. T. Milk fat microencapsulation using whey proteins. *International Dairy Journal*, v. 9, p.657-663, 1999.
- MCINTOSHI H. GRAEME, PETER J. ROYLE, RICHARD K.LE LEU, GEOFFREY REGESTER, MELISSA JOHNSON, ROSS L. GRINSTED, RACHEL S. KENWARD AND GEOFFEREY W. SMITHERS., Whey Proteins as Functional Food Ingredients?., **International Dairy Journal** ,8 p. 425-434,1998
- MANJI, B., HILL, A., KAKUDA, Y., IRVINE, D. M. Rapid separation of milk proteins by anion exchange chromatography. **Journal of Dairy Science**. v. 68, p.3176-3179, 1985.
- MEHRA, R. K., DONNELLY, W. Fractionation of whey protein components trough a large pore size hydrophilic, cellulosic membrane. **Journal Dairy Research**. v.60, n.1, p. 89-97, 1993.
- ONWULATA, C. I., SMITH, P. W., KONSTANCE, R. P., HOLSINGER, V. H. Incorporation of whey products in extruded corn, potato or rice snacks. *Food Research International*. v.34, p.679-687, 2001.
- OUTINEN, M., HARJU, M., TOSSAVAINEN, O and ANTILA, P. (Valio Oy, FIN-00100 Helsinki, Finland) PCT International Patent application WO 95/19714. **Trends in Food Science & Technology**. v. 7, p.340, 1996.
- MANN, E. Whey products and their uses. **Dairy Industries International**. v. 6, p.13, 2000.
- MORR, C., HA, E. W. Whey protein concentrates and isolates processing and functional properties critical reviews. **Food Science and Nutrition**, v.33, n.6, p.431-476, 1993.
- PETRA, W. J. R., CAESSENS., VISSER, S., GRUPPEN, H. Method for the isolation of bovine β -lactoglobulin from a cheese whey protein fraction and physicochemical characterization of the purified product. **International Dairy Journal**, v. 7, p. 229-235, 1997.
- YOSHIDA, S. Isolation of β -lactoglobulin and α -lactoglobulin by gel filtration using sephacryl s-200 and purification by diethylaminoethyl ion - exchange chromatography. **Journal of Dairy Science**, v.73, p.2292-2298, 1990.

OBTENCIÓN DE FRACCIONES ENRIQUECIDAS DE α -LACTOALBUMINA Y β -LACTOGLOBULINA USANDO CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO EN ESCALA SEMIPREPARATIVA

Laboratório de Processos de Separação (LPS) / Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), Universidade Federal de Viçosa, MG – Brasil, CEP 36571-000

RESUMEN

En el presente trabajo fue desarrollado un proceso cromatográfico en escala semipreparativa para la purificación de las proteínas del lactosuero α -lactoalbumina (α -la) y β -lactoglobulina (β -lg). Los resultados mostraron que hubo una adsorción selectiva de α -la y β -lg (35,05% de α -la y 61,08% de β -lg) en la resina de intercambio iónico Accell Plus QMA® (Waters). Para la elución de las proteínas fueron testadas diferentes soluciones tampón como fases móviles y varios tipos de gradientes de fuerza iónica. En esta etapa fueron obtenidas varias fracciones conteniendo α -la y β -lg en diferentes proporciones. Con el uso de los gradientes y diferentes tipos de sales fue posible obtener fracciones enriquecidas de α -la y β -lg.

Palabras clave: α -lactoalbumina, β -lactoglobulina, lactosuero, cromatografía de intercambio aniónico.

1. INTRODUCCIÓN

La α -lactoalbumina (α -la) y la β -lactoglobulina (β -lg) son las dos proteínas presentes en mayor cantidad en el lactosuero y constituyen cerca del 70% del contenido proteico total del mismo (MORR e HA, 1993). La α -la es una albúmina

constituida de 123 residuos de aminoácidos, tiene una masa molar de 14,2 kDa y su concentración en el lactosuero varia de 0,6 a 1,7 g/L (YE et al, 2000). Es una fuente proteica preferida para la formulación de alimentos infantiles debido a su elevado valor nutricional, alta digestibilidad y bajo potencial para causar alergia (GURGEL et al., 2001, PUERTA et al., 2002). La β -lg esta presente en mayor cantidad en el lactosuero, aproximadamente 50%, tiene una masa molar de 18,4 kDa y contiene 162 residuos de aminoácidos, su concentración en el lactosuero se encuentra en el rango de 2 - 4 g/L (YE et al 2000). La β -lg también es de grande valor nutritivo y puede ser utilizada para el fortalecimiento de bebidas energéticas a base de frutas, debido a su grande solubilidad y estabilidad (DE WITH, 1998). Preparados enzimáticos hidrolizados con β -lg son usados como complemento para convalecientes, ya que muchos péptidos de la β -lg pueden ser adsorbidos directamente por el intestino (GRASSELLI et al, 1997).

Debido a las características de estas proteínas, varios estudios fueron hechos con el fin de separarlas o purificarlas. GIRALDO-ZUÑIGA et al (2001) utilizaron un sistema de dos fases acuosas compuesto por 18% de polietilenglicol + 18% de fosfato de potasio + 64% de agua para separar la α -la y la β -lg, obteniendo un coeficiente de partición elevado para ambas proteínas. Otro estudio con este mismo propósito es el realizado por YE et al. (2000) quienes usaron una resina de intercambio aniónico para la separación de lactoferrina, α -la y β -lg. Entre otras técnicas usadas para la purificación de estas proteínas, pueden ser mencionados también la filtración por gel (YOSHIDA, 1990). La aplicación en grande escala, de la mayoría de estos métodos, todavía

es limitado (HAHN et al., 1998), normalmente se utilizan pequeñas cantidades de muestras para ser separadas.

En las últimas décadas, aumentó el interés en las separaciones por medio de técnicas cromatográficas. Este crecimiento es debido, al desarrollo de la industria biotecnológica y a las necesidades de las industrias farmacéutica y química por productos con elevado grado de pureza (GERBERDING e BYERS, 1998). Entre estas técnicas, la cromatografía de intercambio iónico esta siendo usada con mucho éxito, por conservar las características naturales de las biomoléculas separadas (NIVEN, 1995).

En este estudio fue desarrollada una técnica, en escala semi-preparativa, para la separación de las proteínas α -la y β -lg de las otras proteínas presentes en el lactosuero. Para este fin, fue usada la resina de intercambio aniónico Accell Plus QMA® como adsorbente de las proteínas de interés, pues esta resina presentó buenos resultados para la adsorción de esta proteínas (FERREIRA, 2001). La desorción de estas proteínas de la columna, nos llevó a la obtención de fracciones con diferentes composiciones de α -la y β -lg.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Equipo

El equipo utilizado en este trabajo fue el sistema cromatográfico “ÄKTA® purifier” (Pharmacia, Sweden), el cual es compuesto por dos bombas dosificadoras (P-900), un misturador (m-925), una válvula de inyección (INV-907), un detector (UV-900) , controlador de pH (pHC-900), sistema de control (EIC-900) y un colector de fracciones (FRAC-900). El sistema fue controlado

mediante el software UNICORN®. Un diagrama esquemático del sistema “ÄKTA® purifier” es mostrado en la Figura 1.

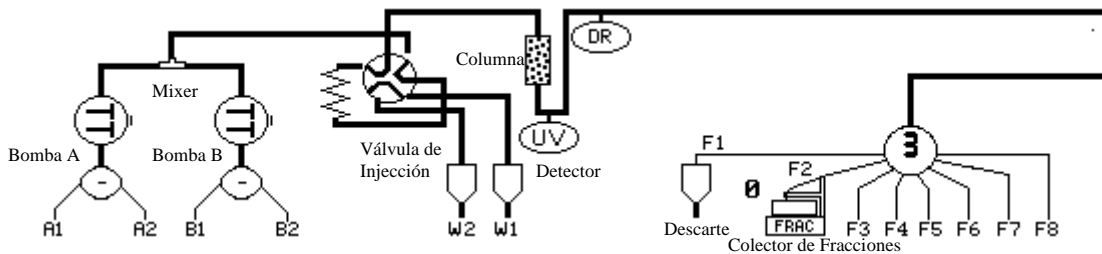


Figura 1. Diagrama esquemático del sistema ÄKTA® purifier (Pharmacia, 1998)

La columna utilizada fue del tipo HR 10/10 (1 cm de diámetro x 10 cm de longitud) (Pharmacia), la cual fue empaquetada con la resina ACCCELL PLUS QMA® (Waters) mediante la ayuda de un equipo para empaquetamiento HR 10 (Pharmacia), siendo que el volumen del lecho de la columna fue de 6,2 mL. La resina escogida para este estudio es compuesta por una matriz de sílica con alto grado de entrecruzamiento y con grupos de intercambio iónico ligados químicamente a la matriz. El grupo de intercambio iónico es el amino cuaternario cargado positivamente. Esta resina tiene un tamaño nominal de partícula en el rango de 37µm a 55 µm y un tamaño de los poros de 500 Å. Debido a su estructura rígida e incompresible, esta resina es adecuada para el aislamiento y purificación de proteínas, enzimas e inmunoglobulinas, particularmente en los casos de ampliación de escala y en cromatografía preparativa (WATERS, 2002).

2.2. Preparación del Lactosuero y Adsorción de las Proteínas

Para la adsorción de las proteínas fue utilizada una solución de 1% (fracción en masa) de aislado proteico de lactosuero en polvo WPI (Daisco

Foods, USA) preparada en tampón Tris (hidroximetil) -aminometano-HCL 0,05 M y pH 7,6 y filtrada con filtro de acetato de celulosa (0,4 μ m). Esta condición fue determinada como óptima para la adsorción de las proteínas por FERREIRA (2001). La adsorción fue realizada, mediante la inyección continua de la solución de 1% de WPI a través de la columna de intercambio aniónico, hasta su saturación, utilizando un “Superloop” (Pharmacia) de 200 mL, para la inyección de la muestra. Después de saturarse la columna, esta fue lavada con agua deionizada, filtrada y desgasificada, para retirar el material que no fue adsorbido. El tiempo de saturación y lavado de la columna fueron determinados experimentalmente. Para determinar el tiempo de saturación fueron analizadas las fracciones al final de la columna mediante HPLC hasta verificar que las concentraciones de entrada y salida eran iguales.

2.3. Condiciones de la Desorción de las Proteínas

Después del lavado de la columna, fue realizada la desorción de las proteínas adsorbidas a la matriz. Dicha desorción se realizó usando diferentes tipos de sales y de gradientes de fuerza iónica. Las Tablas 1 e 2 muestran las fases móviles A y B y las programaciones de los gradientes utilizados, respectivamente.

Tabla 1. Sales empleadas en la desorción de las proteínas mediante gradiente

Sistema	Fase Móvil A	Fase Móvil B
1	Tampón Tris-HCL 0,05M pH 7,6	NaCl 1M + Fase móvil A
2	Tampón Tris-HCL 0,05M pH 7,6	Fosfato de potasio 1M + Fase móvil A
3	Água	Acetato de Sódio 1M + Fase móvil A

Tabla 2. Programación de los gradientes usados en la desorción de las proteínas

Número	Tempo (minutos)	Fase móvil B (%)
1	0 - 37	10
	37 - 85	35
	85 - 122	100
	122 - 150	0
2	0 - 57	10
	57 - 109	28
	109 - 153	39
	153 - 190	60
	190 - 219	100
	219 - 237	0
3	0 - 15	5
	15 - 29	10
	29 - 44	20
	44 - 59	25
	59 - 87	30
	87 - 95	35
	95 - 203	40
	203 - 210	45
	210 - 217	50
	217 - 223	60
223 - 230	100	
230 - 250	0	
4	0 - 47	10 (pH 5)
	47 - 172	35 (pH 4)
	172 - 215	100 (pH 4)
	215 - 240	0

2.4. Análisis de las Fracciones Obtenidas en la Desorción de la Columna

Para cada tipo de sal y de gradiente, fueron obtenidas varias fracciones que fueron recogidas en el colector de fracciones. Estas fracciones fueron filtradas (filtros de acetato de celulosa de 0,4 μm) y analizadas, en duplicado, mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) utilizando una columna

de exclusión molecular (CEM) en el sistema ÄKTA purifier[®], con una columna Superdex[®] HR 75/30 (Pharmacia), flujo isocrático, fase móvil compuesta por tampón fosfato pH 7 + NaCl 0,05 M, flujo de la fase móvil de 1 mL.min⁻¹, temperatura ambiente (28°C), volumen de inyección de 100 µL y longitud de onda de 210 nm. Los reactivos utilizados fueron de grado analítico y el agua deionizada, filtrada y desgasificada.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inicialmente fue verificado, que las proteínas α -la, β -lg y trazos de albúmina de suero bovino (BSA) quedaron adsorbidas en la resina. Para esto fue realizado un experimento preliminar de adsorción y desorción de las proteínas en conjunto, empleándose para la desorción una solución de NaCl 1 M, con el objetivo de obtener solamente una fracción proteica. Después de colectar estas fracciones, sus constituyentes fueron cuantificados mediante CEM.

3.1. Saturación, Desorción y Fraccionamiento de las Proteínas

La saturación de la columna de intercambio iónico, fue alcanzada mediante la inyección continua de la solución de aislado proteico descrita en el ítem 2.2. El tiempo de saturación fue calculado mediante las curvas de perfil de concentración obtenidas para ambas proteínas. Esta curva fue construida analizando las concentraciones de las proteínas en la salida de la columna de intercambio iónico. El tiempo de saturación fue definido como el tiempo en el cual las concentraciones de entrada y salida fueron iguales.

En la desorción de las proteínas fueron empleados gradientes de fuerza iónica del tipo “paso”, los cuales pueden ser fácilmente ampliados de escala

(HAHN et al., 1998). En La Figura 2 es presentado, uno de los cromatogramas obtenidos con la aplicación de los diferentes tipos de sales y gradientes testados para la desorción de las proteínas.

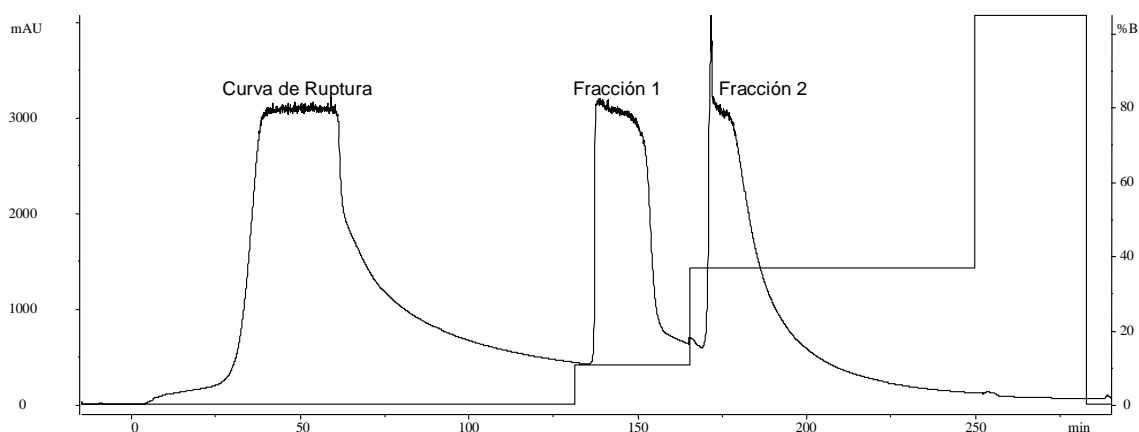


Figura 2 - Cromatograma obtenido con el sistema 1 y el gradiente número 1.

3.2. Análisis de las Fracciones Obtenidas en la Desorción

El análisis de las fracciones eluidas fue realizada mediante CEM, según la metodología descrita en el ítem 2.4. El cromatograma del análisis de la segunda fracción obtenida, cuando fueron utilizados el sistema 1 y el gradiente número 1 (Figura 2,) esta mostrado en la Figura 3. La fracción analizada está compuesta por α -la y β -lg, lo que muestra una cierta capacidad de esta condición de trabajo, para la separación de estas dos proteínas.

La Tabla 3 muestra las diferentes proporciones de α -la y β -lg obtenidas en las fracciones desorbidas en las diferentes condiciones testadas. En la mayoría de los casos, la desorción de las fracciones conteniendo las proteínas de interés, fue hecha en bajas concentraciones de sal (0,1 a 0,25 M), lo cual es

ventajoso, pues podría ser eliminada una etapa a más, normalmente usada para separar la proteína de la sal.

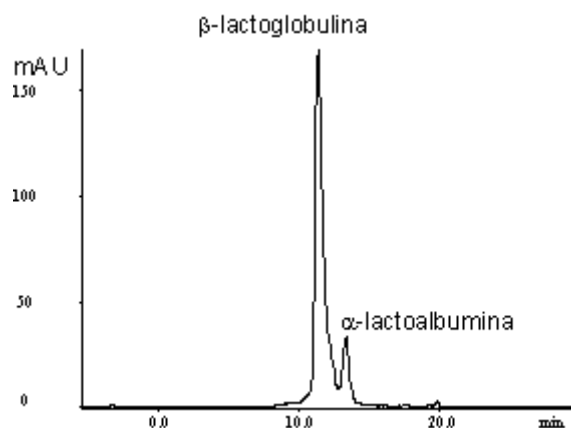


Figura 3 - Cromatograma de la fracción 2 de la Figura 2 obtenido por CEM.

Tabla 3. Contenido de α -la y β -lg en las diferentes fracciones obtenidas

Sistema	Gradiente	α -la (%)					β -lg (%)				
		F1	F2	F3	F4	F5	F1	F2	F3	F4	F5
1	1	45,13	13,90	-	-	-	54,80	86,01	-	-	-
1	2	35,30	43,70	20,20	12,30	-	62,10	54,20	70,80	79,50	-
1	3*	74,50	40,64	48,03	24,09	0	15,84	55,70	51,71	72,47	100
2	1	26,20	82,33	0	-	-	73,40	11,32	99,90	-	-
2	2	14,50	27,92	52,40	13,22	-	82,30	65,40	46,90	85,49	-
2	3	36,73	40,71	33,10	12,10	-	63,05	58,95	64,80	82,18	-
3	1	35,51	9,92	-	-	-	63,00	85,65	-	-	-
3	2	20,94	21,61	39,20	6,27	0	79,00	71,53	58,59	93,70	100

F: fracción. *en el sistema 1 y gradiente 3, fueron obtenidas 8 fracciones, siendo que las fracciones F5, F6, F7 y F8 fueron constituidas por 100% de β -lg.

En la tentativa de obtener fracciones de α -la y β -lg mas puras, se utilizó una combinación de gradientes de pH y de fuerza iónica (gradiente 4). Se utilizó pH 5 para eluir las proteínas con punto isoeléctrico (pI) mayor que 5, luego la

fuerza iónica fue aumentada y el pH disminuido para 4, para eluir las proteínas con pI encima de 4. Estas condiciones fueron testadas debido a que al disminuir el pH las proteínas se hacen menos positivas y pueden ser eluidas más fácilmente (GU et al., 1991). Los resultados en estas condiciones fueron similares a los obtenidos sin utilizar el gradiente de pH. Dos fracciones fueron obtenidas, siendo la primera compuesta por 19,48 % de α -la y 71,35% de β -lg y la segunda fracción por 12,59 % de α -la y 78,4 % de β -lg. En la bibliografía existen estudios referentes al aislamiento de estas proteínas, como el trabajo de YOSHIDA (1990) que utilizó cromatografía de filtración en gel, seguida de cromatografía de intercambio iónico y obtuvo fracciones con 73 % de α -la. En las investigaciones de MANJI et al. (1985) y GURGEL et al. (2001) fueron obtenidas fracciones con poco más de 90% de pureza de α -la, trabajando con volúmenes de muestras de máximo 500 μ L que son muy inferiores a los empleados en este estudio. La utilización de volúmenes mayores como los empleados por GERBERDING et al. (1998) y HANH et al. (1998) condujo a resultados comparables con los de este trabajo, o sea fracciones conteniendo diferentes porcentajes de α -la e β -lg. Todas las fracciones obtenidas contenían soluciones de sal empleado para la desorción.

Puede ser observado que para cada tipo de gradiente fueron obtenidos diferentes número de fracciones, debido a que la elución por pasos es realizada mediante cambios de fuerza iónica o de pH (PASECHNIK e PHLS, 1995). Por este motivo cuando la fuerza iónica aumentaba, una nueva fracción era obtenida, mas fue observado también que en algunos casos donde la fuerza iónica aumentaba, no eran obtenidas otras fracciones, este hecho es posiblemente debido a que eran necesarias fuerzas iónicas mayores.

En cada ciclo de extracción (inyección y elución) y fraccionamiento de las proteínas fueron recuperadas cantidades relativamente grandes de estas proteínas, por ejemplo la cuando fue inyectado en la columna 435 mg de β -lactoglobulina, la cantidad adsorbida en la columna, fue de aproximadamente 300 mg, lo que verifica el fraccionamiento en escala semipreparativa.

La recuperación total de las proteínas, empleando los diferentes sales y gradientes, fue de aproximadamente 66% para α -lactoalbumina e de 75% para β -lactoglobulina, con una diferencia media entre os tipos de sales de 4%.

Para las fracciones ricas en β -lg, los mejores resultados fueron obtenidos mediante el empleo de del sistema 1 con gradientes 1 e 3, sistema 2 con gradiente 1, y el sistema 3 con gradiente 1, donde fueron obtenidas fracciones con 100%, 99,90%, e 85,65%, respectivamente. Para el caso de la α -la, el sistema 2 con gradiente 1 y el sistema 1 con gradiente 3 fueron los más favorables a la obtención de fracciones con 82,33 % y 14,50% de esta proteína.

Las fracciones conteniendo α -la y β -lg, con bajos contenido de sal, pueden ser utilizadas en la industria de alimentos para aumentar la gelificación, rigidez y visco-elasticidad de los geles, pudiendo ser empleadas como sustituto de las proteínas individuales (GURGEL et al., 2001). Las fracciones conteniendo β -lg pura o en concentraciones elevadas, pueden ser utilizadas en productos como bebidas energéticas y en la clarificación de bebidas entre otras aplicaciones. Esta proteína también presenta una alta digestibilidad y solubilidad (DE WIT, 1998).

4. CONCLUSIONES

La técnica de cromatografía de intercambio iónico usando diferentes tipos de gradientes, demostró ser efectiva en la separación de α -la y β -lg de las otras proteínas del lactosuero. Fueron obtenidas algunas fracciones conteniendo α -la y β -lg en proporciones factibles de uso industrial. Las mejores condiciones para la separación de las proteínas α -lactolalbumina y β -lactoglobulina fue cuando se utilizó el sistema 2 con gradiente 1, donde solo fueron obtenidas tres fracciones con elevados contenidos de ambas proteínas (82,33 de α -la e 99,90 de β -lg). Cuando fue testado el cambio simultáneo de pH y fuerza iónica los porcentajes de proteínas obtenidos en cada fracción no fueron superiores.

Agradecimientos: Los autores agradecen al CNPq/PADCT III y a la Fapemig por el apoyo financiero y también a la CAPES por la bolsa de estudios concedido a Abraham Damian Giraldo Zuñiga.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANUALPEC. Anuário da Pecuária Brasileira. São Paulo-Brasil: FNP Consultoria & Comercio, 2002. 400p.
- DE WITH, J. N. Nutritional and Functional characteristics of whey proteins in food products. **Journal Dairy Science**, v.81, n.6, p.597-609, 1998.
- FERREIRA, R. C. **Separação de α -lactoalbumina e β -lactoglobulina de proteínas do soro de queijo por adsorção em colunas de leito fixo**, Viçosa, MG: DTA, UFV, 2001. Dissertação (Mestrado), Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Brasil, 2001, 81p, 2001.
- GERBERDING, S. J., BYERS, C. H. Preparative ion-exchange chromatography of proteins from dairy whey. **Journal of Chromatography**, v. 808, p.141-151, 1998.

- 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. **Ciencia y Tecnologia de Alimentos**, v. 3, n. 3, p. 149-155, 2001.
- GRASSELLI, M., NAVARRO, A., FERNANDEZ, H. L., MIRANDA, M. V., CAMPERI, I., OSVALDO CASCONI. Que hacer con el suero de queso. **Ciencia Hoy**, v.43, n.1, p.27-35, 1997.
- GU, T., TSAI, G., TSAO, G. T. Some considerations for optimization of desorption chromatography. **Biotechnology and Bioengineering**, v.37, p. 65-70, 1991.
- GURGEL, P. V., CARBONELL, R.G., SWAISGOOD, H. Fractionation of whey proteins with a hexapeptide ligand affinity resin. **Bioseparation**, v. 9, p.385-392, 2001.
- HAHN, R., SHULZ, P. M., SCHAUPP, C., JUNGBAUER, A. Bovine whey fractionation based on cation-exchange chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 795, p.277-287, 1998.
- MANJI, B., HILL, A., KAKUDA, Y., IRVINE, D. M. Rapid separation of milk proteins by anion exchange chromatography. **Journal of Dairy Science**, v. 68, p.3176-3179, 1985.
- MORR, C., HA, E. W. Whey protein concentrates and isolates processing and functional properties critical reviews. **Food Science and Nutrition**, v.33, n.6, p.431-476, 1993.
- NIVEN, G. W. Separation processes for biotechnology in the food industry. In: **Food processing: recent developments**. Elsevier Science. N.Y, 1995, p. 143-195.
- PASECHNIK, V. A., PHLS, J. M. **Large-scale extraction and purification of enzymes and other proteins**, in: Handbook of enzyme biotechnology, third edition, editor, Wiseman, A., N.Y, 1995.
- PUERTA, A., JAULMES, A., FRUTOS, M., DIEZ-MASA, J. C., VIDAL-MADJAR, C. Adsorption kinetics of β -lactoglobulin on a polyclonal immunochromatographic support. **Journal of Chromatography**.v.935, p.17-30, 2002.
- WATERS CORPORATION, WWW.waters.com/SPE.chem.htm#gma (ingreso en 04/03/2002).
- YE, X., YOSHIDA, S., Ng, T. B. Isolation of lactoperoxidase, lactoferrin, α -lactoglobulin, β -lactoglobulin B and β -lactoglobulin A from bovine rennet whey using ion exchange chromatography. **The international Journal of Biochemistry & cell Biology**, v.32, p. 1143-1150, 2000.

YOSHIDA, S. Isolation of β -lactoglobulin and α -lactoglobulin by gel filtration using sephacryl s-200 and purification by diethylaminoethyl ion - exchange chromatography. **Journal of Dairy Science**, v.73, p.2292-2298, 1990.

OTIMIZAÇÃO DA DESSORÇÃO DE α -LACTOALBUMINA E β -LACTOGLOBULINA EM CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

Laboratório de Processos de Separação (LPS) / Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), Universidade Federal de Viçosa, MG – Brasil, CEP 36571-000

Resumo

Na etapa de dessorção são recuperadas biomoléculas de soluções diluídas, que foram previamente adsorvidas em resinas cromatográficas. Esta etapa tem um papel importante no desenvolvimento de novos processos de separação de proteínas biologicamente ativas, particularmente em escala piloto, onde a quantidade do composto dessorvido é determinante no rendimento do processo. Para realizar a dessorção na cromatografia de troca iônica faz-se uso de soluções salinas de elevadas forças iônicas, sendo o NaCl o sal mais comumente empregado. No presente trabalho foram analisados o efeito da força iônica de uma solução salina de fosfato de potássio e a influência da vazão da fase móvel sobre o processo de dessorção das proteínas α -lactoalbumina e β -lactoglobulina previamente adsorvidas na resina Accell Plus QMA®. As condições operacionais ótimas para estes fatores foram determinadas por meio da metodologia de superfície de resposta, utilizando um planejamento fatorial 2^2 . O valor ótimo da quantidade de proteínas recuperadas da matriz cromatográfica foi estabelecido com $1,37 \text{ gmol.L}^{-1}$ de fosfato de potássio e $0,54 \text{ mL.min}^{-1}$ de vazão da fase móvel.

1. Introdução

Biomoléculas protéicas tais como a α -lactoalbumina (α -la) e β -lactoglobulina (β -lg) são consideradas aditivos alimentares potenciais. Podem ser empregadas no desenvolvimento de alimentos especiais, para enfermos, devido às suas excelentes características nutricionais e funcionais (HOCH, 1997). Entretanto os custos envolvidos no isolamento destes compostos devem ser baixos para

viabilizar a sua comercialização. Na literatura encontram-se vários estudos sobre o isolamento destas proteínas, porém são, na maioria, inviáveis e aplicam-se somente para propósitos de análise de laboratório (KONRAD et al., 2000).

Dentre as diversas técnicas passíveis de uso na purificação de biomoléculas, os métodos cromatográficos se destacam por apresentarem elevada eficiência na separação, alto poder de resolução e pela ampliação do seu emprego em larga escala (PASECHNIK e PHLS, 1995). A utilização de um linha de processo com uma seqüência de métodos cromatográficos possibilita purificar, por exemplo, uma única enzima, entre os milhares de componentes presentes em um extrato celular (NIVEN, 1995).

A variabilidade das técnicas cromatográficas, cada uma delas com diferentes propriedades, fornece uma combinação poderosa para a purificação de qualquer biomolécula (PHARMACIA, 1999). A quantidade e tipo de técnicas usadas nos processos de purificação, dependerão da natureza e características das amostras assim como do grau de pureza desejado no produto final (PASECHNIK e PHLS, 1995).

A escolha da técnica cromatográfica a usar leva em consideração os critérios de recuperação, resolução, velocidade e capacidade, posto que cada técnica se comporta de maneira diferenciada frente a estes parâmetros.

Dentre os diferentes métodos cromatográficos, a cromatografia de troca iônica é a técnica de purificação de proteínas de maior emprego. Adicionalmente, deve-se notar que é utilizada com efetividade pelas indústrias farmacêutica e de química fina para purificar diversas biomoléculas, mesmo quando é feita a ampliação de escala (GERBERDING e BYERS, 1998). A cromatografia de troca iônica separa biomoléculas de acordo com suas próprias cargas e as cargas do adsorvente nos quais são ligadas por meio de forças eletrostáticas (LEVISON, 2002).

Nos processos de purificação de biomoléculas via cromatografia de troca iônica a avaliação da etapa de dessorção é necessária ao estudo da recuperação de biomoléculas, tanto em nível analítico quanto em escala piloto (LUO e HSU, 1997). Nos processos microbiológicos, a dessorção recebeu considerável atenção, por exemplo, na remoção *in loco* de produtos tóxicos provenientes da fermentação. GU et al. (1991) conectaram colunas cromatográficas a um tanque

de fermentação para a remoção de contaminantes simultânea à fermentação. Os produtos foram obtidos após dessorver os contaminantes das colunas cromatográficas. Embora a dessorção seja uma etapa importante na recuperação de biomoléculas, poucos são os estudos a seu respeito, principalmente no tocante às quantidades dessorvidas do adsorvente.

Na literatura não foram encontrados relatos acerca da eficiência da dessorção, ou seja quanto do produto ligado no adsorvente é recuperado na dessorção, apesar desta etapa afetar diretamente os custos de produção de biocompostos. Assim, para avaliar a dessorção no caso específico da α -la e β -lg, no presente trabalho foi estudada a dessorção dessas proteínas com o emprego do sal fosfato de potássio. Este sal foi escolhido devido ao seu posterior uso no preparo de sistemas aquosos bifásicos como técnica de purificação intermediária.

A metodologia de superfície de resposta foi utilizada para otimizar o processo. Esta é uma técnica de otimização baseada em planejamentos fatoriais, introduzida nos anos cinquenta, e desde então tem sido empregada com sucesso na modelagem de diversos processos industriais (NETO et al., 2001). É composta por duas etapas distintas, modelagem e deslocamento, que são repetidas tantas vezes quantas forem necessárias, com o objetivo de atingir uma região ótima de superfície investigada (BOX e DRAPER, 1987).

2. Materiais e métodos

2.1. Proteínas do soro

As biomoléculas utilizadas como adsorvato, foram as proteínas α -lactoalbumina e β -lactoglobulina presentes no isolado protéico de soro de queijo em pó (BioPro, Davisco Foods, USA[®]). A partir deste isolado foi preparada uma solução aquosa a 1% (fração mássica), a qual foi injetada na coluna cromatográfica com o auxílio de um “superloop” de 200 mL.

2.2. Matriz cromatográfica

A resina cromatográfica usada como adsorvente, foi a Accell Plus QMA[®] (Waters), que é composta por uma matriz de sílica com alto grau de entrecruzamento, na qual estão ligados grupos de troca aniônica amino

quaternário $(-C(O)NH(CH_2)_3N(CH_3)_3^+Cl^-)$. Esta resina têm um tamanho nominal de partícula na faixa de 37 μm a 55 μm e tamanho dos poros de 500 Å. É incompressível, devido a sua estrutura rígida e é adequada ao isolamento e purificação de proteínas, enzimas e imunoglobulinas, particularmente nos casos de aumento de escala e em cromatografia preparativa (WATERS, 2002). Foi empregada com sucesso para estudos de adsorção de albumina de soro bovino (ARAÚJO, 1996), beta-galactosidase (PEREIRA, 1999) e proteínas do soro de queijo (FERREIRA, 2001).

2.2. Sistema cromatográfico

O equipamento utilizado no presente trabalho foi o sistema cromatográfico “ÄKTA® purifier” desenvolvido pela Pharmacia (Suécia). O sistema consiste de duas bombas dosadoras (P-900), um misturador (m-925), uma válvula de injeção (INV-907), um detector (UV-900), um controlador de pH (pHC-900), um sistema de controle (EIC-900) e um coletor de frações (FRAC-900). É monitorado via o software UNICORN®. Um diagrama esquemático do sistema “ÄKTA® purifier” é mostrado na Figura 1.

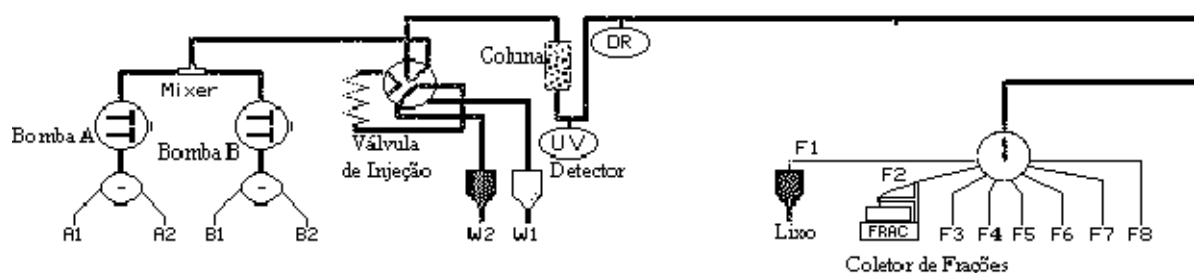


Figura 1. Diagrama esquemático do sistema ÄKTA® purifier (Pharmacia, 1998)

A coluna empregada foi do tipo HR 10/10 (1 cm de diâmetro por 10 cm de comprimento, Pharmacia), empacotada com a resina mediante a ajuda do equipamento para empacotamento HR 10 (Pharmacia).

2.2. Adsorção das proteínas

Para a adsorção das proteínas foi empregada a condição determinada como ótima por FERREIRA (2001): uma solução de 1% (fração mássica) de isolado protéico de soro em pó, IPS (BioPro, Davisco Foods, USA), preparada em tampão Tris-HCL 0,05 M e pH 7,6 e filtrada em filtro de acetato de celulose (0,4 μm). A adsorção foi realizada com a injeção contínua desta solução através da coluna, até atingir a saturação da mesma, usando um “Superloop” (Pharmacia) de 200 mL para injeção da amostra. Após a saturação da coluna, verificada mediante quantificação do eluente na saída da coluna, esta foi lavada com água deionizada, filtrada e degaseificada, para a retirada do material não adsorvido presente na coluna. O tempo de saturação e lavagem da coluna foi determinado experimentalmente.

Para garantir a total dessorção das proteínas e a repetitividade dos experimentos, foi implementado um procedimento de lavagem CIP (“clean-in-place”), que envolve lavagens seqüenciais com NaOH 0,1 gmol.L^{-1} (3 volumes de coluna), H₂O (3 volumes de coluna), HCl 0,25 gmol.L^{-1} (3 volumes de coluna) e NaCl 2 gmol.L^{-1} , pH 7,5 (3 volumes de coluna).

2.3. Dessorção das proteínas

Após a lavagem da coluna as proteínas foram dessorvidas, usando diferentes forças iônicas (μ) do sal fosfato de potássio e diferentes vazões volumétricas da fase móvel (Q). No planejamento para definição das condições ótimas de dessorção das proteínas, com estas variáveis, foi utilizado a metodologia de superfície de resposta. Inicialmente, foi realizado um delineamento fatorial 2², com três repetições no ponto central, e, a partir dos resultados obtidos, foram inseridas novas combinações de força iônica e vazão volumétrica, mediante o deslocamento ao longo do caminho da máxima inclinação. Na Tabela 1 encontram-se os valores de vazão volumétrica (Q) e força iônica (μ) utilizados nos experimentos.

Tabela 1. Valores analisados no planejamento estatístico

Condição	Q (mL.min ⁻¹)	μ (gmol.L ⁻¹)
1	0,3	1
2	0,7	1
3	0,3	2
4	0,7	2
5	0,5	1,5
6	0,5	1,5
7	0,5	1,5
8	0,22	1,5
9	0,5	2,2
10	0,78	1,5
11	0,5	0,79

O planejamento inicial, foi realizado para as condições de vazão de 0,5 mL.min⁻¹; 1,0 mL.min⁻¹ e 1,5 mL.min⁻¹ e para três níveis de força iônica 0,5 gmol.L⁻¹; 1 gmol.L⁻¹ e 1,5 gmol.L⁻¹.

2.4. Quantificação das proteínas eluídas na dessorção.

Para cada condição testada, a fração recolhida no coletor de frações, foi filtrada (membranas de acetato de celulose de 0,4 μm) e quantificada, em duplicata, por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR, cromatógrafo SHIMADZU) segundo a metodologia descrita por GIRALDO-ZUÑIGA et al. (2000). Para quantificação simultânea das proteínas α-la e β-Ig nas amostras construiu-se uma curva de calibração utilizando soluções das proteínas α-la e β-Ig puras (Sigma®), com concentrações na faixa de 0,02 mg.mL⁻¹ a 3,2 mg.mL⁻¹.

2.5. Determinação da quantidade de proteínas adsorvidas na coluna

Para determinação da quantidade de proteína adsorvida na resina, é preciso conhecer a área sob a curva de ruptura, para posteriormente calcular o valor de “q”, mediante a equação 1. As curvas de ruptura das duas proteínas foram construídas, para cada uma das condições apresentadas na Tabela 1, com os dados obtidos mediante a coleta de frações do eluente durante a adsorção, em

intervalos de tempo preestabelecidos. Em seguida estas frações foram analisadas por CLAE-FR, conforme o item 2.4.

$$q = \frac{C_0 * Q * t_f - \left[Q * \left(\int_0^{t_f} y dt \right) + y_1 + y_2 \right]}{m_{ads}} \quad (1)$$

em que

$$y = \frac{a}{1 + \left(\frac{t}{t_0} \right)^b}$$

$$y_1 = C_0 * A_T * L * \varepsilon_b$$

$$y_2 = C_0 * A_T * L * (1 - \varepsilon_b) * \varepsilon_p$$

sendo a , b e t_0 parâmetros da equação calculados por meio do ajuste e da análise de regressão; C_0 (mg.mL^{-1}) a concentração inicial da solução; A_T (m^2) a área da seção transversal da coluna; L (m) o comprimento da coluna; ε_b e ε_p as porosidades do leito e da partícula, respectivamente; Q a vazão volumétrica (mL.min^{-1}); t_f o tempo final de operação e m_{ads} a massa do adsorvente (g).

Os termos y_1 e y_2 representam as quantidades de soluto não-adsorvido (mg) mas presentes na coluna nos espaços externo e interno à partícula, respectivamente, no instante em que o processo foi interrompido.

Um modelo empírico (sigmoidal) foi ajustado às curvas de ruptura. Por meio de integração numérica, utilizando um programa computacional em linguagem Fortran, calculou-se a área sob a curva de ruptura, segundo o procedimento estabelecido por FERREIRA (2001). Por exemplo, na Figura 2 é apresentada a área sob a curva de ruptura da β -lactoglobulina para uma vazão de $0,78 \text{ mL.min}^{-1}$. Posteriormente, calculou-se o valor de q .

2.6. Determinação da quantidade de proteínas recuperadas na dessorção

Este parâmetro foi obtido por meio da diferença entre a quantidade adsorvida na coluna, como calculada no item 2.5, e a quantidade dessorvida,

calculada no item 2.4. Assim foi possível avaliar a recuperação de proteínas na dessorção.

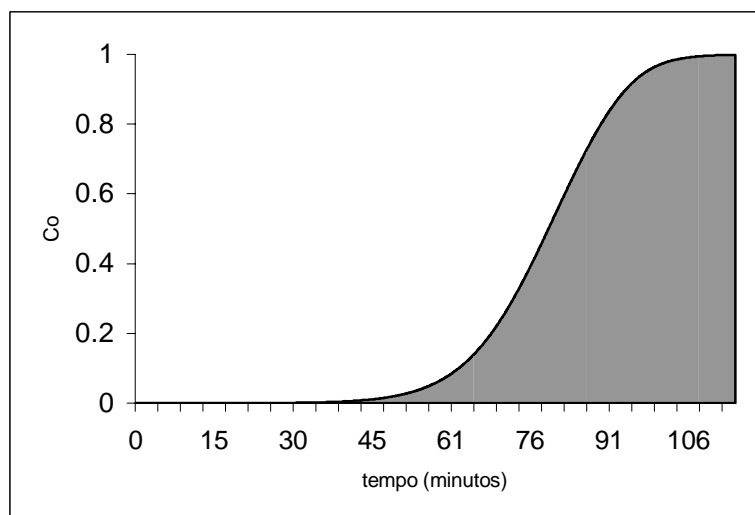


Figura 2. – Curva de ruptura para β -lactoglobulina (vazão igual a $0,78 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) utilizada na determinação do equilíbrio, por análise frontal. C_0 é a concentração adimensional, e t , tempo de adsorção.

3. Resultados e discussão

3.1. Dessorção das proteínas α -la e β -lg

Inicialmente foi realizado um experimento para verificar quais proteínas presentes no IPS ficaram retidas na matriz cromatográfica. Foi observado que a resina Accell Plus QMA® adsorveu seletivamente as proteínas α -lactoalbumina e β -lactoglobulina, com alguns traços de albumina de soro bovino.

3.1.1. Otimização da dessorção

Para determinar uma condição ótima do processo de dessorção das proteínas α -la e β -lg, a força iônica (μ , $\text{gmol}\cdot\text{L}^{-1}$) e a vazão da fase móvel (Q , $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$) foram escolhidas como as variáveis independentes do processo e a

quantidade de proteínas dessorvida (D, % em massa) foi a variável dependente ou variável resposta.

Tabela 2 - Quantidades dessorvidas para as diferentes condições testadas

Q (mL.min ⁻¹)	μ (gmol.L ⁻¹)	Quantidade dessorvida (D,%)	
		α-la	β-Ig
0,3	1	65,0	69,0
0,7	1	69,0	77,0
0,3	2	62,0	69,5
0,7	2	65,0	73,0
0,5	1,5	71,0	81,0
0,5	1,5	70,0	80,0
0,5	1,5	71,0	82,0
0,22	1,5	63,0	69,0
0,5	2,2	65,0	71,0
0,78	1,5	66,0	72,0
0,5	0,79	68,0	77,0

O sal empregado na dessorção foi o fosfato de potássio (FFP) pois a fração dessorvida contendo as proteínas será usada no preparo de um sistema aquoso bifásico composto por polietilenoglicol (PEG) + FFP + H₂O, para separar a α-lactoalbumina da β-lactoglobulina.

O modelo empregado para o planejamento fatorial 2² com três repetições do ponto central foi:

$$\hat{D}(\%) = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2 \quad (1)$$

Este é o modelo quadrático completo, em que D (%) é a resposta predita, b_0 é o termo de intercepto, b_1 e b_2 são os coeficientes dos termos lineares e b_{11} e b_{22} os coeficientes dos termos não lineares.

A partir dos resultados experimentais apresentados na Tabela 2, foram obtidas duas correlações para prever a quantidade de proteínas dessorvidas. Os dados dos coeficientes destas correlações estão listados na Tabela 3. Para este propósito foi utilizado o pacote estatístico SAS (SAS Institute Inc., 1989), procedimentos RSREG e REG. Foram feitos os testes de falta de ajuste,

significância dos parâmetros e análise de resíduos e do coeficiente de determinação (R^2) para a escolha do melhor modelo.

Os parâmetros estimados e a análise de variância da regressão com o teste de falta de ajuste para os modelos determinados, são apresentados nas Tabelas 3, 4 e 5, respectivamente. Nestes modelos observou-se que o coeficiente do produto entre força iônica e vazão da fase móvel (x_1x_2), foi não-significativo a 5% de probabilidade, pelo teste t. O modelo foi reavaliado, retirando-se o parâmetro citado, e obteve-se um modelo simplificado, no qual todos os parâmetros foram significativos a 5% de probabilidade, pelo teste t.

Na Tabela 3, pode ser observado um elevado valor de R^2 , o que indica a eficiência do modelo para ajustar os dados experimentais. Os valores experimentais da quantidade de proteínas desorvida em função daqueles preditos pelo modelo podem ser observados na Figura 2.

Tabela 3 – Parâmetros estimados

Proteína	Intercepto (b_0)	b_1	b_2	b_{11}	b_{22}	R^2
α -Ia	70,66	1,4053	-1,4053	-3,1459	-2,1458	0,9730
β -Ig	81,02	1,9678	-1,4982	-5,2813	-3,5313	0,9526

Tabela 4 - Análise de variância para o ajuste do modelo $\hat{D}(\%) = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2$ aos dados da Tabela 1, para a α -lactoalbumina

Fonte de variação	Nº de graus de liberdade	Quadrado médio	$F_{\text{calculado}}$
Regressão	4	24,1867	50,22**
Resíduo da regressão	6	0,4816	
Falta de ajuste	4	0,5557	1,67 ^{ns}
Resíduo puro	2	0,3333	
Total	10		

CV = 1,09%

** significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.
ns - não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

Tabela 5 - Análise de variância para o ajuste do modelo $\hat{D}(\%) = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2$ aos dados da Tabela 1, para a β -lactoglobulina

Fonte de variação	Nº de graus de liberdade	Quadrado médio	F _{calculado}
Regressão	4	57,6665	20,67**
Resíduo da regressão	6	2,7905	
Falta de ajuste	4	3,68575	3,69 ^{ns}
Resíduo puro	2	1	
Total	10		

CV = 2,05%

** significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.
 ns – não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

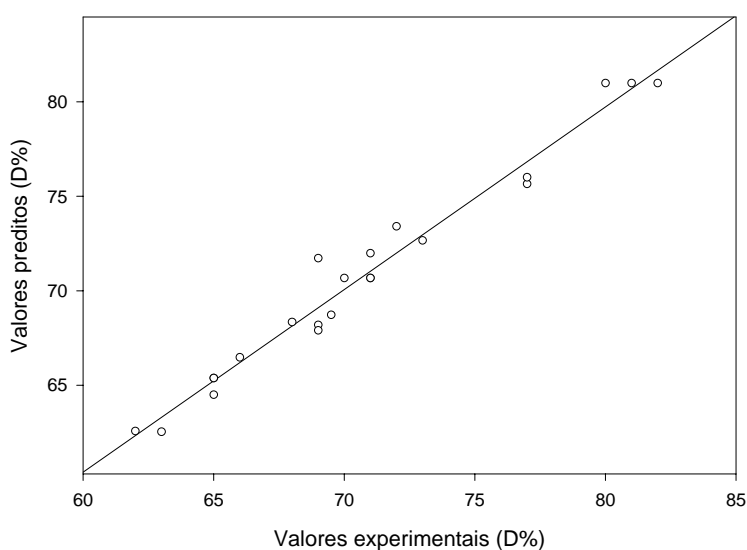


Figura 2 – Valores experimentais da quantidade de proteínas desorvida em função dos valores preditos pelo modelo.

Os resultados experimentais mostraram que as melhores condições de trabalho para a desorção das proteínas α -la e β -lg dentro da faixa estudada foram: μ do sal fosfato de potássio igual a 1,37 gmol.L⁻¹ e Q igual a 0,54 mL.min⁻¹.

Nestas condições foi obtida a maior recuperação do adsorvato ligado ao adsorvente. Foi observado também que as proteínas adsorvidas na coluna cromatográfica, não foram desorvidas totalmente, ou seja não foi possível recuperar 100% das proteínas que ficaram ligadas à resina na etapa de adsorção. Este fato pode ter ocorrido devido: a) a uma forte ligação entre o grupo trocador da resina e as proteínas ou b) ao efeito de “salting out” observável em concentrações muito elevadas de sal. Para obter maiores quantidades recuperadas de proteínas podem ser empregados deslocadores específicos como, por exemplo, o ácido fítico (LUO e ANDRADE, 2000) .

As Figuras 3 e 4 mostram as superfícies de resposta da quantidade de proteínas desorvida (% mássica) da resina de troca iônica Accell Plus QMA[®] para os valores de μ e Q utilizados na desorção das proteínas α -la e β -lg, respectivamente.

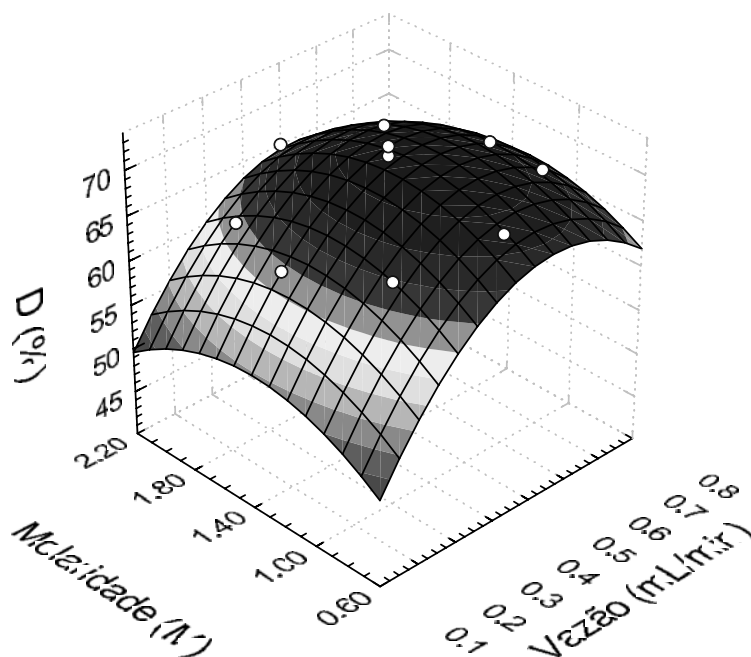


Figura 3 – Superfície de resposta para a desorção de α -lactoalbumina com relação à força iônica de FFP e vazão da fase móvel

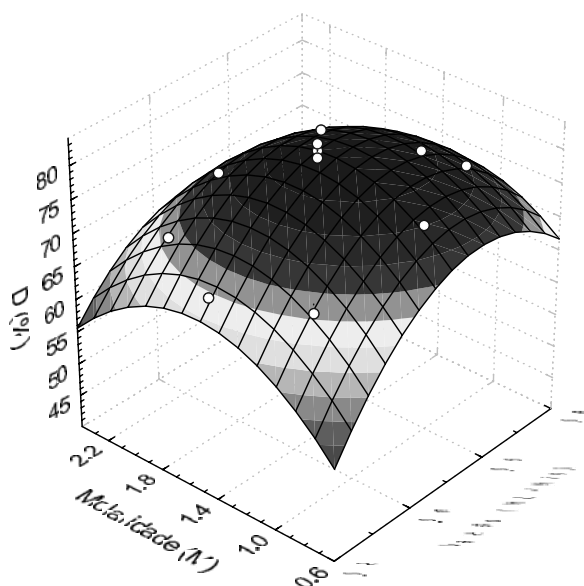


Figura 4 – Superfície de resposta para a dessorção de β -lactoglobulina com relação à força iônica de FFP e vazão da fase móvel

Na maioria de estudos envolvendo a purificação de proteínas mediante cromatografia, a etapa de dessorção tem sido avaliada com informações relacionadas com a resolução dos picos, única variável utilizada para analisar o grau de separação. Em situações onde o tempo de operação, a diluição do produto, a pureza e o rendimento alteram o custo e eficiência do processo a simples medida da resolução não é a mais adequada para definir a eficiência global da separação no processo cromatográfico (LUO e HSU, 1997). Portanto, alguns autores têm incluído novas variáveis objetivando detalhar o processo de dessorção e conseqüentemente a separação de biomoléculas com técnicas cromatográficas. LUO e HSU (1997), por exemplo introduziram uma variável, o “fator de otimização da resolução”, que define a eficiência da separação em um processo cromatográfico; porém, esta nova variável é função somente da resolução e do tempo de dessorção, não considerando o rendimento ou recuperação da biomolécula adsorvida na matriz cromatográfica.

Na cromatografia de troca iônica as moléculas são ligadas à matriz por ação das forças eletrostáticas entre as referidas moléculas e os grupos carregados da matriz. A diminuição destas interações, por alteração da força

iônica ou do pH do meio, permite recuperar as moléculas adsorvidas (DORSEY et al., 1998). Quanto maior a força iônica do tampão, maior será a recuperação das biomoléculas, devido à competição entre as proteínas e os íons presentes na fase móvel pelo sítio de adsorção da resina (PHARMACIA, 1999). No entanto, no presente trabalho, quando a força iônica do sal aumentou, observou-se que a quantidade de proteínas recuperada diminuiu; este fato deve-se, provavelmente, à alteração da solubilidade das proteínas com a variação da força iônica. Para verificar este efeito, foram realizados testes experimentais de solubilidade da α -la e β -lg. A Figura 5 mostra o comportamento de ambas proteínas em função da força iônica dos sais fosfato de potássio e cloreto de sódio. Nota-se que quando a força iônica aumentou a solubilidade das proteínas diminuiu, devido provavelmente à precipitação das proteínas, com uma conseqüente redução da sua concentração no sobrenadante. Este fato pode justificar a redução da quantidade de proteínas dessorvidas em forças iônicas elevadas. Segundo SGARBIERI (1997), as proteínas precipitam pelo efeito de “salting out”, no qual a solubilidade das proteínas decresce, devido à competição entre estas e os íons salinos pelas moléculas de água, ocasionando maior interação proteína-proteína e conseqüente agregação das moléculas de proteína, seguida de precipitação.

Como observado na Figura 5, em soluções de NaCl a solubilidade das proteínas foi pouco alterada ao variar a força iônica, em comparação com soluções de FFP. Segundo ARAÚJO (1999) o FFP é mais efetivo do que o NaCl na precipitação de proteínas, devido à sua maior carga de íons. Este fato possivelmente aumentou a recuperação de proteínas na dessorção ao empregar o NaCl.

Na avaliação da dessorção das proteínas uma solução de NaCl com diferentes forças iônicas também foi testada como eluente. Os resultados mostraram que a quantidade de proteínas dessorvidas aumentou com o emprego de NaCl, principalmente, em relação à β -lg; porém, as diferenças ao redor de 4%, não foram significativas, este fato justificou a sua não utilização como eluente na dessorção, visto que o FFP seria usado para partição das proteínas na etapa posterior de extração líquido-líquido com sistemas aquosos bifásicos.

Diferentes valores de vazão da fase móvel foram testados na dessorção objetivando minimizar os tempos de separação, aumentar a resolução e a

eficiência do processo. Foi observado que este parâmetro influenciou também no rendimento da dessorção das proteínas. O efeito da vazão, nos processos cromatográficos, está ligado diretamente à produtividade do processo (RICKER e SANDOVAL, 1996), mas não foram encontrados na literatura outros relatos referentes à sua influência na recuperação de compostos. Este parâmetro afeta de alguma forma o processo de dessorção, pois foi verificada a influência da vazão sobre a taxa de transferência de massa, a forma e a simetria dos picos de proteínas (DORSEY et al., 1998).

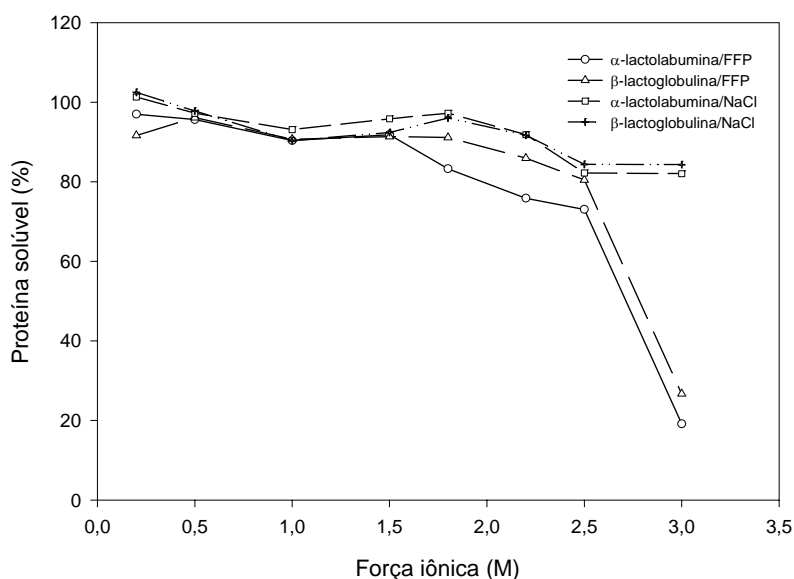


Figura 5 – Solubilidade das proteínas α -lg e β -lg em função da força iônica de soluções de FFP e NaCl.

Dentre os estudos existentes, para a separação de proteínas do soro de queijo, usando cromatografia de troca iônica, o sal de maior uso na etapa de dessorção das proteínas é o NaCl, como observado na Tabela 6.

Nestes trabalhos (tabela 6) não foi explicitado os motivos para as escolhas dos valores de μ e Q avaliadas, bem como não foram apresentados os dados de dessorção das proteínas relativos tanto à quantidade de proteínas recuperadas na dessorção quanto à influência das variáveis μ e Q no processo. Os dados

disponíveis referem-se ao tipo de sal, aos valores de força iônica e a vazão da fase móvel. Somente HEDDLESSON et al. (1997) apresentam a porcentagem de proteínas recuperadas ao empregar a cromatografia de bioafinidade para imobilizar trans-retinal em celite, que também foi utilizada como uma matriz seletiva para adsorção da β -lactoglobulina do soro de queijo. A β -lg foi dessorvida com uma solução de fosfato de sódio $0,4 \text{ gmol.L}^{-1}$, pH 7 a uma vazão de 1 mL.min^{-1} , obtendo-se nestas condições uma recuperação de proteínas de aproximadamente 87,1%, indicando assim que uma quantidade considerável de β -lg ficou ainda retida na coluna.

Este comportamento também foi verificado no presente trabalho, pois as porcentagens de recuperação de α -la e β -lg foram de aproximadamente 71,04% e 81,33%, respectivamente, indicando um bom resultado para o caso em estudo, onde foi avaliado o processo dessortivo simultâneo de duas proteínas, a α -la e a β -lg.

Tabela 6 - Sais empregados na dessorção das proteínas do soro de queijo

Tipo de sal	μ (M)	Q (mL.min^{-1})	Referência
NaCl	0,3	2	YOSHIDA, 1990
NaCl, NaAc	0,7	2	MANJI et al., 1985
NaCl	0,1 – 1,0	3,3	HANH et al., 1998
NaAc	0,05 – 0,1	50	GERBERDING e BYERS, 1998
NaCl	0,3	-	YE et al., 2000
NaCl	0,1 – 0,5	0,15	GURGEL, 2001

4. Conclusões

A solução salina de fosfato de potássio, empregada para a dessorção das proteínas, foi adequada para a dessorção das mesmas, apresentando diferenças mínimas em comparação com a solução de NaCl. Mediante o método de superfície de resposta foi possível otimizar o processo de dessorção das proteínas, sendo as condições operacionais ótimas de dessorção das proteínas α -la e β -lg: $1,37 \text{ gmol.L}^{-1}$ de força iônica e $0,54 \text{ mL.min}^{-1}$ de vazão da fase móvel.

Nestas condições foi recuperado 71,04% e 81,33% para α -la e β -lg, respectivamente.

5. Referências Bibliográficas

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos/teoria e prática**. Viçosa: UFV, imprensa Universitária , 1999, 415p.

BOX, G. E. P., DRAPER, N. R. **Empirical model-building and response surfaces**, United States of América: Jhon Wiley & Sons, Inc, 1987, 669p.

DORSEY, J. G., COOPER, W. T., SILES, B. A., FOLEY, J. P., BARTH, H. G. Liquid chromatography: theory and methodology, **Analitical Chemistry**, v. 70, p.591-644, 1998.

ETZEL, M. R. Whey protein isolation and fractionation using ion exchangers. In: **Bioseparation Processes in Foods**. Edited by SINGH, R. K and RIZVY, S.S. N.Y. 1995. p. 389-415.

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

GERBERDING, S. J., BYERS, C. H. Preparative ion-exchange chromatography of proteins from dairy whey. **Journal of Chromatography**, v. 808, p.141-151, 1998.

GIRALDO ZUÑIGA, A. D., COIMBRA, J. S. R., FERREIRA, R. C., MINIM. L. A. Quantificação de proteínas do soro de queijo através de cromatografia líquida de fase reversa. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. v 54, n.316, p 17-21, 2000.

GU, T., TSAI, G., TSAO, G. T. Some considerations for optimization of desorption chromatography. **Biotechnology and Bioengineering**, v.37, p. 65-70, 1991.

GURGEL, P. V., CARBONELL, R.G., SWAISGOOD, H. Fractionation of whey proteins with a hexapeptide ligand affinity resin. **Bioseparation**, v. 9, p.385-392, 2001.

HAHN, R., SHULZ, P. M., SCHAUPP, C., JUNGBAUER, A. Bovine whey fractionation based on cation-exchange chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 795, p.277-287, 1998.

HEDDLESON, R. A., ALLEN, J. C., WANG, Q. W., SWAISGOOD, H. E. Purity and yield of beta-lactoglobulin isolated by an N-retinyl-Celite bioaffinity column. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n.7, p. 2369-2373, 1997.

- HOCH, G. J. Whey to go. **Food processing**, v. 58, n. 3, p. 51, 1997.
- KONRAD, G., LIESKE, B., FABER, W. A large-scale isolation of native b-lactoglobulin: characterization of physicochemical properties and comparison with other methods. **International Dairy Journal**, v. 10, p. 713-721, 2000.
- LEVISON, P. R. Large-scale ion-exchange column chromatography of proteins comparison of different formats. **Journal of Chromatography**, v.1, p. 123-135, 2002.
- LUO, Q., ANDRADE, J. D. Phytic acid as an efficient low-molecular-mass displacer for anion-exchange displacement chromatography of proteins. **Journal of Chromatography B**, v. 741, p.23-29, 2000.
- LUO, R. G., HSU, J. T. Optimization of gradient profiles in ion-exchange chromatography for protein purification. **Industrial and Engineering Chemical Research** v. 36, p.444-450, 1997.
- MANJI, B., HILL, A., KAKUDA, Y., IRVINE, D. M. Rapid separation of milk proteins by anion exchange chromatography. **Journal of Dairy Science**, v. 68, p.3176-3179, 1985.
- MORR, C., HA, E. W. Whey protein concentrates and isolates processing and functional properties critical reviews. **Food Science and Nutrition**, v.33, n.6, p.431-476, 1993.
- NETO, B. D., SCARMINIO, I. S., BRUNS, R, E. **Como fazer experimentos – pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Editorada Unicamp. SP, Brasil, 401p.
- NIVEN, G. W. Separation processes for biotechnology in the food industry. In: **Food processing: recent developments**. Elsevier Science. N.Y, p. 143-195, 1995.
- PASECHNIK, V. A., PHLS, J, M. Large-scale extraction and purification of enzymes and other proteins. In: **Handbook of Enzyme Biotechnology**. Edited by Wiseman. N.Y. p.31-82. 1995.
- PEREIRA, J. A. M. **Adsorção de beta-galactosidase de *Scopulariopsis sp.* em resina trocadora de íons objetivando a purificação e a ampliação de escala**, Campinas, SP: FEQ, UNICAMP, 1999. Dissertação (Doutorado), Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 138p. 1999.
- PHARMACIA BIOTECH, **Protein purification handbook**, Sweden, 97p, 1999.

- RICKER, R. D., SANDOVAL, A. A. Fast, reproducible size-exclusion chromatography of biological macromolecules. **Journal of Chromatography**, v. 743, p.43-50, 1996.
- SAS. Institute INC. **SAS/STAT[®] User's Guide, version 6**, 4th ed, Volume 2, Cary, NC: SAS Institute Inc., 1989, 846p.
- SGARBIERI, V. C. Proteínas do leite e derivados. IN: **Proteínas em alimentos protéicos. Propriedades. Degradações. Modificações**. São Paulo- SP: Ed. Livraria Varela. p 139-157, 1996.
- WATERS CORPORATION, WWW.waters.com/SPE.chem.htm#qma (capturado em 04/03/2002).
- YE, A., SINGH, H. Influence of calcium chloride addition on the properties of emulsions stabilized by whey protein concentrate. **Food Hydrocolloids**, v.14, p. 337-346, 2000.
- YOSHIDA, S. Isolation of β -lactoglobulin and α -lactoglobulin by gel filtration using sephacryl s-200 and purification by diethylaminoethyl ion - exchange chromatography. **Journal of Dairy Science**, v.73, p.2292-2298, 1990.

SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA α -LACTOALBUMINA E β -LACTOGLOBULINA POR INTEGRAÇÃO DA CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA, SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS E CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR

Laboratório de Processos de Separação (LPS) / Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), Universidade Federal de Viçosa, MG – Brasil, CEP 36571-000

Resumo

No presente trabalho foi desenvolvida uma rota de separação e purificação das proteínas presentes em maior quantidade no soro, a α -lactoalbumina (α -la) e a β -lactoglobulina (β -g). O processo de purificação destas biomoléculas foi composto pela integração de várias etapas. A primeira delas foi a adsorção das proteínas presentes na solução de isolado de soro de queijo em pó em uma coluna cromatográfica, empacotada com a resina Accell Plus QMA®, seguida da dessorção das proteínas do adsorvente usando fosfato de potássio 1,37 M e pH 7,0. A segunda etapa consistiu na separação individual das proteínas α -la e β -lg provenientes da dessorção, em um sistema aquoso bifásico (SAB) composto por 18% de fosfato de potássio (FFP) pH 7,0 + 18% de polietilenoglicol (PEG) + 64 % de água. Na terceira etapa as proteínas α -la e β -lg foram separadas das fases salina e polimérica do SAB e purificadas por cromatografia de exclusão molecular (CEM) usando o gel Shepadex G-25® médio. Os resultados mostraram a ocorrência de uma adsorção seletiva das proteínas α -la e β -lg na resina Accell Plus QMA®. A partição com SAB foi bem sucedida, sendo que a α -la migrou para a fase polimérica e a β -lg para a fase salina. A CEM foi eficiente na separação tanto da α -la da fase rica em PEG quanto da β -lg da fase rica em sal. As soluções procedentes da CEM foram liofilizadas e as proteínas obtidas com uma pureza de 93% para α -la e 97% para a β -lg. O rendimento total do processo foi de 47,39% e 65,12% para a α -la e a β -lg, respectivamente. As proteínas do soro de queijo tem aplicações potenciais na medicina e na indústria de alimentos devido a suas excelentes propriedades funcionais e nutricionais.

1. Introdução

As proteínas são componentes cuja função básica é fornecer a quantidade de aminoácidos essenciais da dieta necessária para a sobrevivência de animais e homens. Dentre os diferentes tipos de proteínas existentes, as do soro de queijo destacam-se pelas suas excelentes propriedades funcionais e nutricionais pois contêm peptídeos e proteínas bioativas que podem ser empregadas no preparo de alimentos funcionais, filmes comestíveis, alimentos nutracêuticos e fórmulas alimentícias infantis, dentre outras aplicações (FRIEDMAN, 1996; MANN, 2000; GIRALDO-ZUÑIGA et al., 2002). Estas proteínas, em forma purificada, são benéficas à saúde e permitem o desenvolvimento de alimentos especiais como, por exemplo, formulados para fenilcetonúricos. Frações enriquecidas com α -lactoalbumina, rica em triptofano, são empregadas no preparo de alimentos com elevado teor de triptofano e com baixas concentrações de β -lactoglobulina, proteína que estimula reações alérgicas e a diarreia (GRASSELLI et al., 1997; BRAMAUD et al., 1997; HUGUNIN, 1999; ETZEL, 2000).

MCINTOSHI et al. (1998) evidenciaram também que o consumo de proteínas do soro de queijo auxiliou na redução da incidência de câncer. Na Tabela 1 são mostradas algumas propriedades biológicas das proteínas α -la e β -lg.

Tabela 1 - Funções biológicas das proteínas α -lactoalbumina e β -lactoglobulina.

Proteína	Função Biológica
α -lactoalbumina	Anti-carcinogênica Reguladora do sono e da vigília
β -lactoglobulina	Digestiva Suplemento alimentício Anti-carcinogênica

Fonte: MCINTOSHI et al. (1998); GRASELLI et al. (1997)

As características das proteínas do soro de queijo, acima mencionadas, despertaram o interesse pela sua recuperação, purificação e comercialização. Somado a isto: a) o crescimento da indústria de laticínios com conseqüente aumento do volume de soro produzido, tanto no Brasil quanto no mundo

(ANUALPEC, 2002) e b) a preocupação com poluição do meio ambiente, ocasionada pelo descarte do soro de queijo no solo ou em leitos de rios sem tratamento prévio, ratificam a necessidade da implementação de um processo de recuperação destas proteínas que agregue valor ao sub-produto soro de queijo e diminua a poluição ambiental.

No processo de recuperação e purificação de biomoléculas, tais como enzimas e proteínas, os processos cromatográficos destacam-se devido à sua eficiência na separação e ao seu elevado poder de resolução que levaram ao aumento do seu emprego em larga escala (PASECHNIK e PHLS, 1995) e, também, por não provocar desnaturação dos biocompostos (NIVEN, 1995). Dentre as diferentes técnicas cromatográficas, a cromatografia de troca iônica e a cromatografia de exclusão molecular são de vasto uso na purificação de proteínas. Estas metodologias vem sendo utilizadas com sucesso na purificação de biomoléculas pelas indústrias de química fina e farmacêutica (GERBERDING e BYERS, 1998). Na literatura são encontradas diversas referências de aplicações destas técnicas, inclusive relacionadas à separação de proteínas do soro de queijo, porém usando quantidades mínimas de amostras.

Uma outra operação de separação de biomoléculas é a extração líquido-líquido usando sistemas aquosos bifásicos (SAB). Os SAB são constituídos por duas fases distintas, que promovem a separação de biomoléculas, em condições amenas e em um ambiente adequado, de forma que sejam preservadas as suas principais características (ALBERTSSON, 1986). A alta concentração de água, de 65% a 90%, em tais sistemas favorece a estabilidade das proteínas durante a separação quando comparados com sistemas tradicionais, compostos com solventes orgânicos (LI et al., 1997).

Para o isolamento de proteínas do soro de queijo têm sido usados diferentes métodos, como a cromatografia de troca iônica em leite fluidizado (CARRÈRE et al., 1996), filtração em gel (YOSHIDA, 1990), precipitação com polifosfatos (AL-MASHIKI e NAKAI, 1987), cromatografia de troca iônica (GERBERDING e BYERS, 1998; HAHN et al., 1998) e ultrafiltração (MEHRA e DONNELLY, 1993), dentre outros. Existem também patentes para o fracionamento das proteínas α -la e β -lg, como o processo proposto por OUTINEN et al. (1996), no qual foi feita uma clarificação inicial do soro seguida do

tratamento da solução clarificada em uma coluna de troca aniônica. A fração contendo α -la foi recuperada mediante a lavagem da coluna com água deionizada. A fração rica em β -lg foi obtida por meio da eluição da proteínas com uma solução de NaCl. O inconveniente em usar uma solução salina na eluição é a necessidade da posterior separação da proteína da fase salina.

A ultrafiltração por membranas é usada para obter concentrados protéicos do soro (WPC) apesar da membrana ser rapidamente obstruída pelas fosfolipoproteínas e partículas suspensas do soro, levando à diminuição no fluxo de filtração (GRASSELLI et al., 1997). Industrialmente são comercializados também diferentes tipos de isolados protéicos do soro de queijo (IPS). Estes produtos, cujo conteúdo protéico é de aproximadamente 91%, contêm todas as proteínas do soro. Uma rota usada para a produção de IPS é o uso combinado da cromatografia de troca iônica, ultrafiltração e secagem por atomização (USDEC, 1997), mas os processos produtivos destes IPS não estão disponíveis na literatura. A comercialização individual das proteínas em forma purificada ainda é baixa embora exista demanda para estes produtos.

O pequeno número de relatos sobre a separação de proteínas de soro de queijo incentiva a busca por processos de separação e purificação alternativos que possam ser aplicados em escala contínua, que sejam técnica e economicamente viáveis bem como de fácil aumento de escala, pois a maioria dos estudos de purificação destas proteínas geram frações com níveis de pureza baixos e são de difícil aumento de escala.

No presente trabalho, foi desenvolvido um processo alternativo para recuperar e purificar as proteínas α -la e β -lg presentes no soro de queijo. As proteínas foram isoladas pela combinação dos processos de cromatografia de troca iônica (para adsorver seletivamente α -la e β -lg), seguido de sistemas aquosos bifásicos (para particionar a α -la da β -lg) e da cromatografia de exclusão molecular para purificação final das proteínas. As soluções contendo as proteínas purificadas foram então liofilizadas.

2. Materiais e métodos

2.1. Proteínas do soro

Foi empregada uma solução 1 % (fração em massa) de isolado protéico de soro de queijo em pó (Biopro, Davisco Foods, USA[®]), na qual estavam presentes as proteínas de interesse, α -la e β -lg.

2.2. Equipamentos

O equipamento utilizado no presente trabalho para as operações de separação foi o sistema cromatográfico “ÄKTA[®] purifier” (Pharmacia, Suécia). O sistema é composto por duas bombas dosadoras (P-900), um misturador (m-925), uma válvula de injeção (INV-907), um detector (UV-900), um controlador de pH (pHC-900), um sistema de controle (EIC-900) e um coletor de frações (FRAC-900). Este sistema é monitorado via o software UNICORN[®]. Para análise e quantificação das proteínas foi empregado o cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) da SHIMADZU (Série LC - 10Avp) equipado com uma coluna de fase reversa (C-18).

A coluna empregada no sistema “ÄKTA[®] purifier” foi do tipo HR 10/10 de 1 cm de diâmetro por 10 cm de comprimento (Pharmacia, Suécia) empacotada com a ajuda do equipamento para empacotamento HR 10 (Pharmacia). As resinas utilizadas foram a Accell Plus QMA[®] (Waters) e Shepadex G-25[®] para a cromatografia de troca iônica e de exclusão molecular, respectivamente.

2.3. Purificação das proteínas

A metodologia para a purificação das proteínas α -la e β -lg, foi desenvolvida com a integração da: a) adsorção e dessorção das proteínas por cromatografia de troca iônica, b) partição/separação das proteínas com sistemas aquosos bifásicos e c) purificação das proteínas usando cromatografia de exclusão molecular. Cada uma destas etapas é descrita a seguir.

2.3.1. Adsorção e dessorção

Para a adsorção das proteínas foi empregada uma solução de 1% (fração em massa) de isolado protéico de soro em pó, (Biopro, Davisco Foods, USA),

preparada em tampão Tris-HCL 0,05 M e pH 7,6 e filtrada em filtro de acetato de celulose (0,4 μm). A adsorção foi realizada mediante a injeção contínua da amostra através da coluna empacotada com a resina Accell Plus QMA® até atingir a saturação. Para tanto foi usado um “Superloop” de 200 mL (Pharmacia). Após a saturação a coluna foi lavada com água deionizada, filtrada e degaseificada para a retirada do material não adsorvido.

Após a lavagem da coluna as proteínas foram dessorvidas do leito, usando uma solução de fosfato de potássio 1,37 gmol.L^{-1} , pH 7,0 a uma vazão de 0,54 mL.min^{-1} . A determinação destas condições foi obtida em um experimento prévio realizado para testar a influência do tipo de sal sobre a dessorção das proteínas.

2.3.2. Partição em sistema aquoso bifásico (SAB)

Para a partição das proteínas foi empregado o sistema aquoso bifásico composto por 18% de fosfato de potássio (FFP) pH 7,0 + 18% de polietilenoglicol (PEG) de massa molar 1500 Da + 64% de água. Estas condições foram estabelecidas por GIRALDO-ZUNIGA et al. (2001) como as melhores para a partição de α -la e β -lg em SAB.

O SAB foi formado adicionando à solução salina, originária da dessorção na coluna de troca iônica, o PEG e a água em quantidades adequadas para formar o sistema. O sistema foi pesado em um becker e em seguida agitado magneticamente, durante duas horas e deixados em repouso por 12 horas, para a separação das fases.

2.3.3. Cromatografia de exclusão molecular (CEM)

As duas fases separadas do SAB, sendo uma fase rica em fosfato de potássio (fase inferior) e a outra rica em polietilenoglicol (fase superior), foram o meio de trabalho para a CEM. Cada fase continha uma proteína específica sendo necessário separar a α -la da fase polimérica e a β -lg da fase salina. A CEM foi conduzida segundo as condições operacionais definidas por ROJAS (2001), em que a água deionizada foi a fase móvel. A fase salina foi injetada diretamente na coluna, com o auxílio de um dispositivo de injeção (“superloop”), em volume de 0,5 mL. A fase polimérica foi diluída com água na proporção 1:1, devido à sua alta

viscosidade, e injetada em volume de 0,5 mL. A vazão da fase móvel foi de 2 mL.min⁻¹.

O eluente contendo PEG foi monitorado por absorção de UV a 280nm e aquele contendo sal foi monitorado por condutividade elétrica. As frações foram coletadas após cada injeção em um coletor de frações (Frac-900, Pharmacia). As frações contendo as proteínas foram inicialmente congeladas a -40°C e então liofilizadas em um equipamento LABCONCO X-23, por um tempo aproximado de 8 horas.

2.4. Análise e quantificação das proteínas

2.4.1. Eletroforese (SDS-PAGE)

As proteínas foram analisadas qualitativamente mediante a eletroforese em gel de poliacrilamida, utilizando SDS, segundo a metodologia descrita por LAEMMLI (1970). A concentração do gel de separação foi igual a 15%. Esta técnica foi escolhida por permitir detectar compostos de difícil análise na cromatografia além de possibilitar uma comparação entre todas as etapas do processo de purificação em um único gel.

Foi utilizado o equipamento com sistema vertical de placas (140 mm x 160 mm, espaçamento de 0,75 mm, SIGMA ALDRICH, MO, USA). Foi aplicada uma voltagem de 60V no gel de empilhamento e uma de 120 V no gel de separação. (fonte EC-154, E-C Apparatus Corporation) até que o marcador de frente atingisse aproximadamente 1 cm da borda inferior do gel.

Para revelação das bandas nos géis estes foram imersos em solução fixadora, contendo metanol 40% (v/v) e ácido tricloroacético 20% (m/v), por uma hora. Em seguida foram corados em solução de azul de comassie R-250 (0,25%, v/v), metanol (50%, v/v) e ácido acético (10%, v/v) por um período de 3 horas e descorados em solução de metanol (10%, v/v) e ácido acético (5%, v/v). Após revelação os géis foram armazenados em solução de glicerol 10% (v/v).

2.4.2. Cromatografia líquida de fase reversa (HPLC-RP)

Para quantificar as proteínas em cada etapa do processo bem como obter o rendimento final foi empregada a cromatografia líquida de alta eficiência em

fase reversa (CLAE-FR, cromatógrafo SHIMADZU Série LC - 10Avp) de acordo com a metodologia descrita por GIRALDO-ZUÑIGA et al. (2000). As análises foram feitas em duplicata, em uma coluna do tipo C18 .

3. Resultados e discussão

3.1. Adsorção e dessorção das proteínas α -la e β -lg

Para a adsorção das proteínas foi empregada a solução de isolado protéico descrita no item 2.3.1. O tempo de duração de cada experimento adsortivo dependeu da vazão de trabalho e foi calculado mediante a construção das curvas de ruptura e quantificação das proteínas no eluente na saída da coluna usando CLAE-FR (item 2.4.2). A Figura 1 mostra uma curva de ruptura obtida para a α -la; observa-se que 150 minutos após o início do processo de adsorção a coluna foi praticamente saturada. Nesta condição, a concentração de saída será igual à concentração inicial.

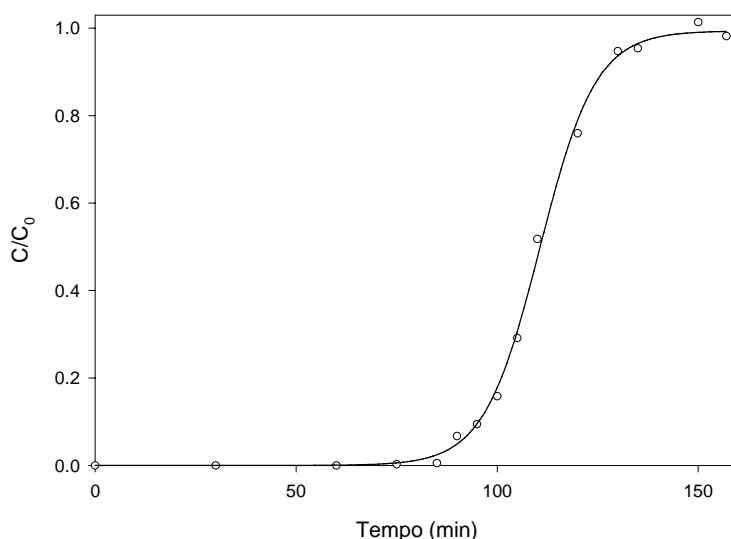


Figura 1 - Curva de ruptura para a α -lactoalbumina (vazão de $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$).

A interrupção da etapa de adsorção é usualmente estabelecida quando a concentração do eluente da coluna atinge entre 1% a 5 % da concentração inicial;

porém, é também usual saturar a coluna para garantir uma adsorção total das proteínas (GERBERDING e BYERS, 1998).

Para a resina testada, a capacidade de adsorção da proteína α -la foi inferior a da β -lg. Este fato deve-se, provavelmente, à diferença de carga líquida na superfície das proteínas e, conseqüentemente, à diferença de solubilidade entre as proteínas. Apesar de ambas serem globulares e possuírem pontos isoelétricos próximos, a α -la é mais hidrofóbica do que β -lg, em conseqüência da presença de triptofano, aproximadamente 6% em massa, que é o principal aminoácido apolar na estrutura da α -la (BRAMAUD et al., 1997). Assim a maior quantidade de aminoácidos apolares na superfície da α -la reduz o seu número de cargas e, conseqüentemente, a capacidade adsortiva da α -la, já que a presença de carga líquida é necessária para que haja a interação adsorvato-adsorvente nesse processo. A baixa concentração da α -la pode também ter influenciado sua capacidade de adsorção pois é provável que exista competição entre ambas proteínas na adsorção.

A Figura 2 mostra um cromatograma do eluente oriundo da etapa de dessorção das proteínas que ao ser comparado com o cromatograma típico dos padrões de α -lactoalbumina e β -lactoglobulina (Figura 3) confirma a adsorção seletiva das duas proteínas pelo adsorvato.

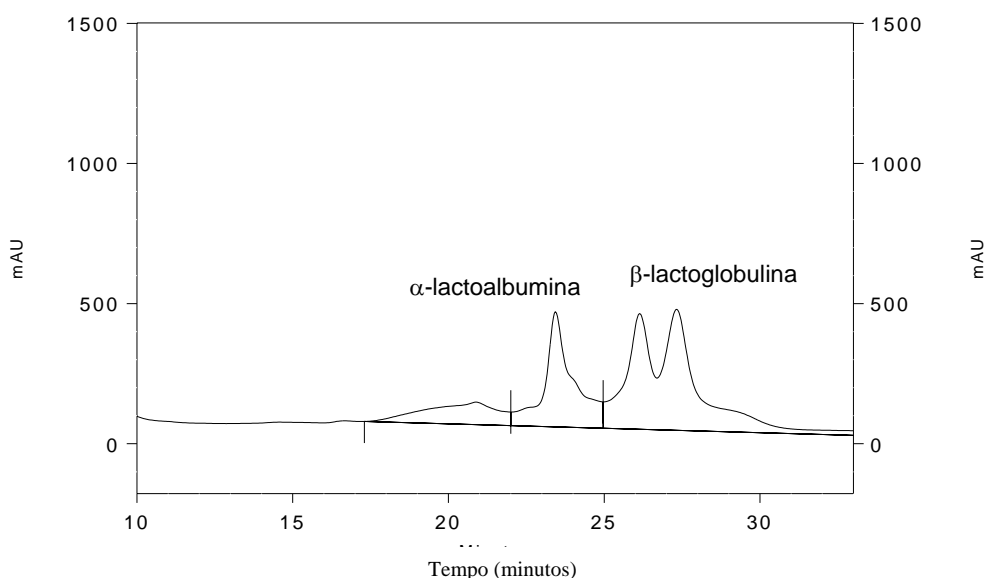


Figura 2 – Cromatograma da fração obtida na dessorção

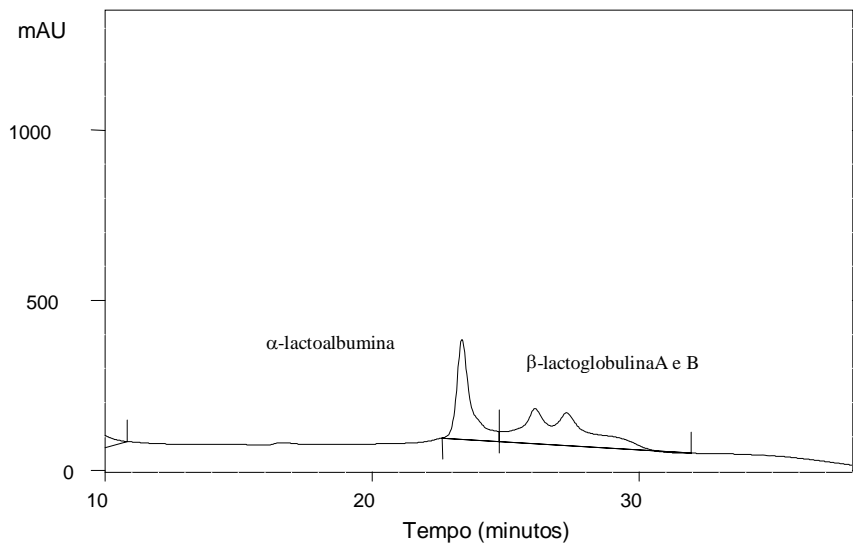


Figura 3 - Cromatograma típico dos padrões de α -lactoalbumina e β -lactoglobulina.

3.2. Partição em sistemas aquosos bifásicos

A partição em sistemas aquosos bifásicos (SAB) é avaliada pelo coeficiente de partição (K), que é a relação entre a concentração da biomolécula na fase superior e aquela na fase inferior (ALBERTSSON, 1986). As Figuras 4 e 5 apresentam cromatogramas das fases polimérica e salina, respectivamente, onde visualiza-se a partição seletiva das proteínas. Os resultados mostraram que praticamente toda a β -lg (98%) permanece na fase salina (baixo valor de K), enquanto a α -la se transfere em grande parte (95%) para a fase polimérica (alto valor de K), o que é indicativo da viabilidade da separação destas proteínas por extração líquido-líquido em SAB compostos por PEG e fosfato de potássio. Este comportamento de partição das proteínas é função, provavelmente, da hidrofobicidade de cada proteína. Proteínas com maior número de aminoácidos apolares, como a α -la, tem uma elevada afinidade pela fase rica em PEG, que é mais hidrofóbica do que a fase rica em sal (ANDERSSON e BAILEY, 1987).

SRINIVAS et al. (1999) purificaram a peroxidase a partir de folhas da planta *Ipomoea palmetta* mediante a combinação de SAB-CEM e concluíram que os SAB são um eficiente estágio de purificação primária desta biomolécula. LI e BEITLÉ (2002) que também obtiveram sucesso na purificação de proteínas usando uma combinação SAB-técnicas cromatográficas, enfatizaram que os SAB

são uma alternativa poderosa na purificação intermediária de proteínas, ou seja, antes do emprego de alguma técnica de cromatografia.

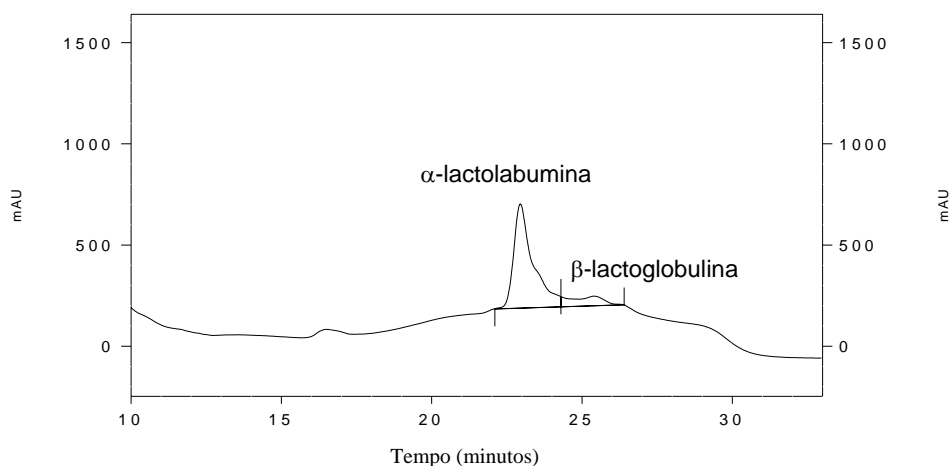


Figura 4 – Cromatograma da fase polimérica

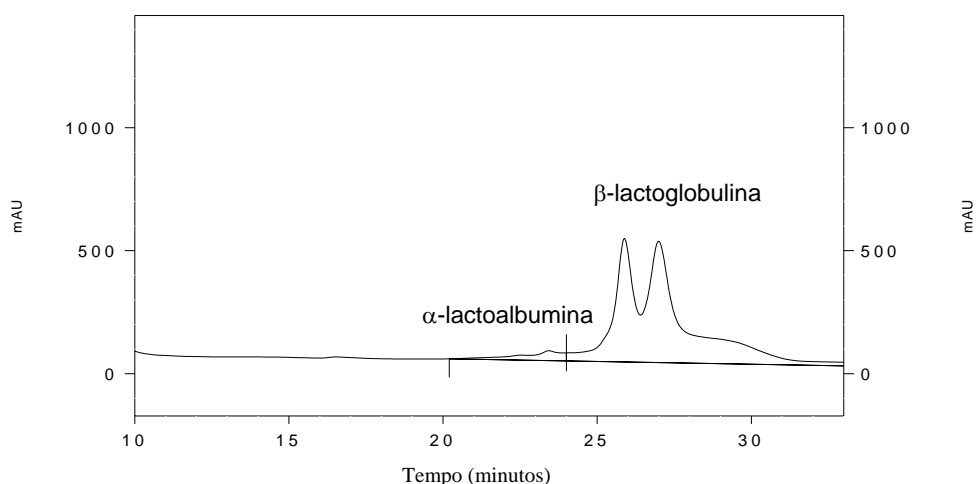


Figura 5 - Cromatograma da fase salina

3.3. Cromatografia de exclusão molecular

Para estabelecer as condições de operação da CEM, foram testados diferentes volumes de amostra e vazão. O ponto de partida foram as condições pré-estabelecidas por ROJAS (2001). A resolução cromatográfica foi usada como uma medida da separação das proteínas das fases polimérica e salina por ser

uma variável importante no desempenho da separação de biomoléculas mediante cromatografia (LOUGH et al., 1996).

A resolução foi determinada segundo FISCHER (1974):

$$R_s = 2 \left(\frac{V_{R_2} - V_{R_1}}{W_{H_1} + W_{H_2}} \right); (V_{R_2} > V_{R_1}) \quad (1)$$

em que:

V_{R_1} : Volume Retenção do pico 1

V_{R_2} : Volume Retenção do pico 2

W_{H_1} : Largura do pico 1

W_{H_2} : Largura do pico 2

As Figuras 6 e 7, mostram os cromatogramas das fases polimérica e salina após a CEM. Pode-se observar que a cromatografia de exclusão molecular foi eficiente na separação dos componentes de cada fase. No caso da fase polimérica, a α -la foi separada do polietilenoglicol e no da fase salina, a β -lg foi separada do sal. Esta separação ocorreu devido à diferença no tamanho das moléculas, já que a CEM efetua a separação de compostos com base no seu tamanho (IRVINE, 1997). Assim, moléculas grandes como a α -la e a β -lg movem-se rapidamente através da coluna e as moléculas pequenas como o PEG e o FFP são eluídas lentamente pela fase móvel porque penetram nos poros do gel, o que aumenta seu tempo de retenção (BARTH et al., 1998).

A Figura 8 mostra um eletroforetograma do processo de purificação das proteínas com as etapas discriminadas. As colunas A e L correspondem às bandas dos marcadores moleculares (Sigma, USA) cuja composição encontra-se na Tabela 2.

É possível acompanhar na Figura 8 a seqüência para a purificação das proteínas α -la e β -lg. Na coluna D, onde foi injetada uma amostra de isolado protéico de soro em pó, pode ser observado a presença de albumina de soro bovino (BSA), peptídeos de massa molar 55 kDa e 36 kDa assim como de α -la e β -lg. Nos produtos finais, nas linhas J e K, observa-se praticamente somente a presença das proteínas β -lg e α -la, ou seja na forma purificada.

As quantidades de proteínas recuperadas em cada etapa são apresentadas na Tabela 3. Após a dessorção verificou-se que quantidades consideráveis de proteínas ficaram adsorvidas na coluna. Na etapa usando SAB as perdas forma da ordem de 1,5% e para CEM de 1%.

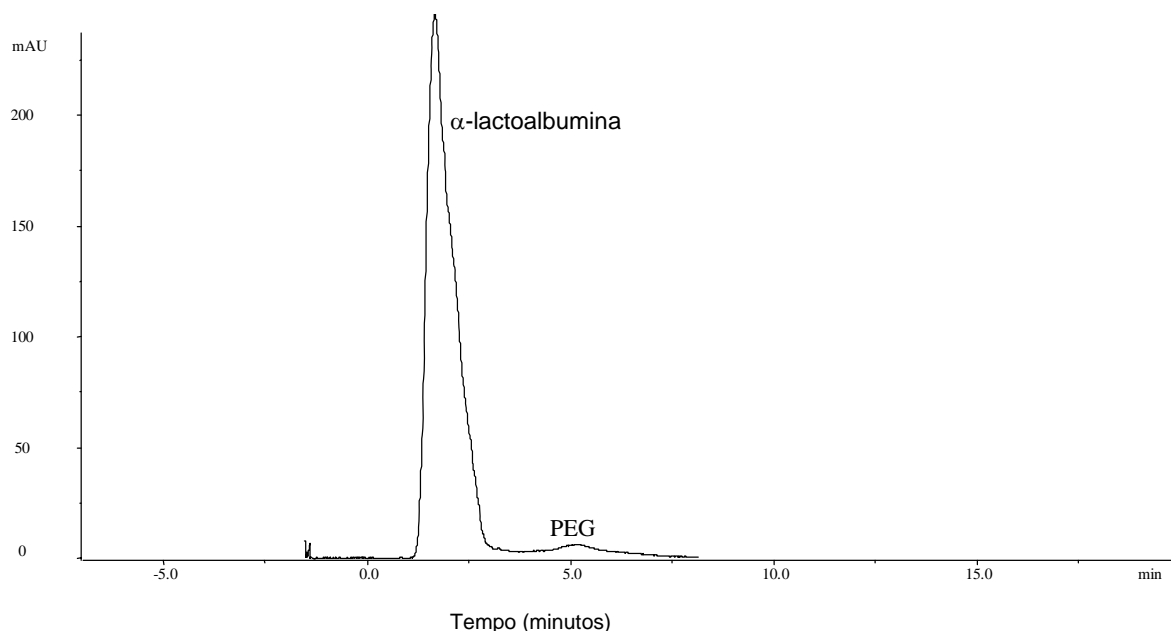


Figura 6 – Cromatograma da fase polimerica após a CEM (absorvância a 210 nm).

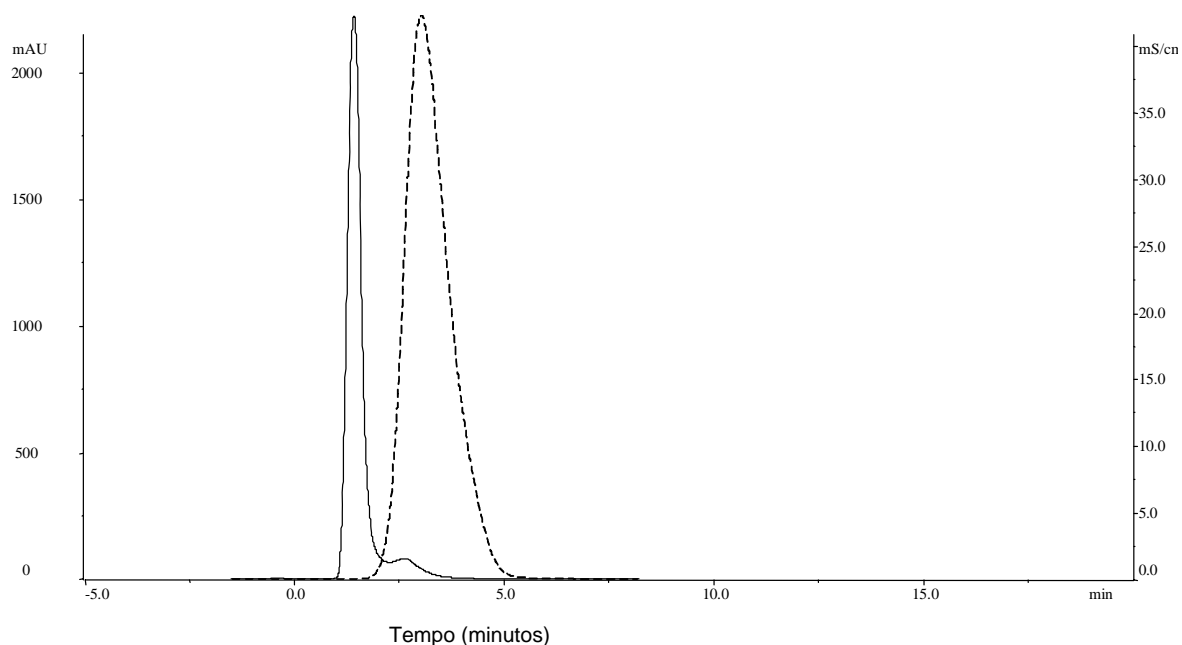


Figura 7 – Cromatograma da fase salina após a CEM (— β -lactoglobulina, absorvância a 210 nm, ---- fosfato de potássio, condutividade).

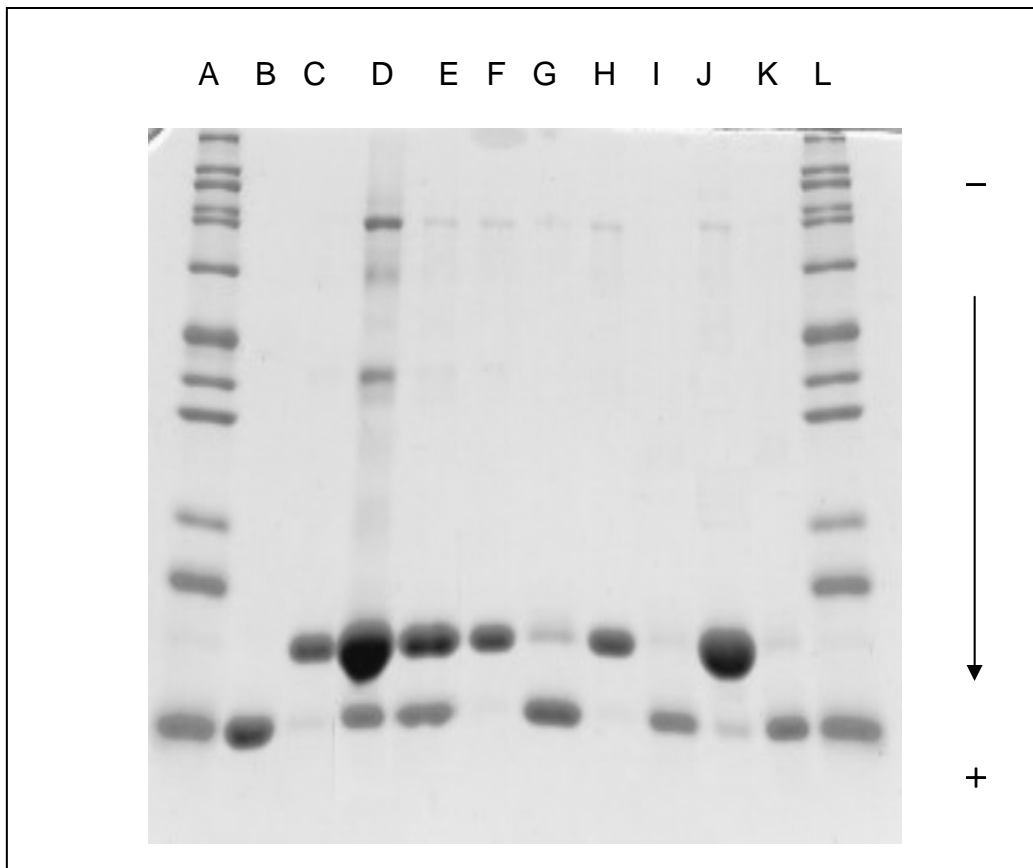


Figura 8 - Eletroforetograma de amostras nas diversas etapas do processo de purificação das proteínas

- A = Marcador molecular
- B = Padrão de α -la; (14 kDa)
- C = Padrão de β -lg; (18 kDa)
- D = Solução de isolado protéico de soro em pó (IPS)
- E = Fração após dessorção
- F = Fase salina do SAB
- G = Fase polimérica do SAB
- H = Fase salina após CEM
- I = Fase polimérica após CEM
- J = Fração H liofilizada
- K = Fração I liofilizada
- L = Marcador molecular

Tabela 2 – Composição dos marcadores moleculares

Linha	Proteína	Massa molar (kDa)
1	Miosina	205
2	β -galactosidase	116
3	Fosforilase b	97
4	Frutose-6-fosfato quinase	84
5	Albumina do soro bovino	66
6	Desidrogenase	55
7	Albumina do ovo	45
8	Gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase	36
9	Anidrase carbônica	29
10	Tripsinogênio	24
11	Inibidor de tripsina	20
12	α -lactoalbumina	14

Tabela 3- Quantidade de proteína recuperada em um ciclo de purificação

Fração	Proteína total (mg)		Rendimento(%)	
	α -la	β -lg	α -la	β -lg
Solução inicial	128,1	627,90		
Cromatografia de troca iônica				
Adsorção e dessorção	65,53	427,84	51,15	68,14
Sistemas aquosos bifásicos				
Fase polimérica	62,25	2,98	48,59	
Fase salina	8,56	419,28		66,77
Cromatografia por Exclusão Molecular				
Solução livre do PEG	61,32	2,91	47,08	
Solução livre do Sal	8,43	412,99		65,77
Liofilização	60,71	408,86	47,39	65,12
Pureza	93%	97%		

Verifica-se na Tabela 3 que houve um rendimento total do processo de aproximadamente 47% para a α -la e 65% para a β -lg. A quantificação das frações liofilizadas contendo α -la e β -lg mostrou a fração rica em α -la com pureza de 93%, traços de β -lg e pequenas quantidades de PEG, de aproximadamente 6% (quantificado por refratometria). Na fração rica em β -lg, com pureza de 97%, foram detectadas pequenas quantidades de α -la. As purezas obtidas neste trabalho são elevadas quando comparadas com dados disponíveis na literatura. Por exemplo, YOSHIDA et al. (1990) separaram as proteínas do soro de queijo

em cinco frações, usando CEM com a resina Sephacryl S-200. As frações obtidas na CEM, foram purificadas por cromatografia de troca iônica com a resina DEAE-TP. A pureza obtida foi de 73% para a fração rica em α -la e a fração de β -lg foi obtida em condição quase pura, porém ambas frações continham tris-hidroximetilaminometano e NaCl que foram usados na eluição na troca iônica. Estes autores não apresentam dados referentes às quantidades de sais, de recuperação e rendimento em cada etapa do processo.

MANJI et al. (1985) em um estudo de purificação de proteínas de soro de queijo empregaram a cromatografia de troca aniônica, com uma solução de acetato de sódio como fase móvel, obtendo uma boa purificação para a β -lg. As frações de α -la e BSA apresentaram alguns contaminantes. As frações protéicas coletadas na saída da coluna cromatográfica foram liofilizadas, sendo detectada nestas amostras a presença de grandes quantidades do acetato de sódio usado como fase móvel. Este problema poderia ter sido solucionado com o uso de CEM após a dessorção. A aplicação desta técnica no presente trabalho, permitiu eliminar o sal e o polímero da solução protéica. MANJI et al. (1985) não indicaram os níveis de pureza das proteínas, nem as quantidades recuperadas ou o rendimento do processo, além de empregarem volumes de amostras pequenos, da ordem de 500 μ L.

OUTINEN et al. (1996b) descreveram um processo para o fracionamento das proteínas α -la e β -lg utilizando diferentes resinas de troca iônica. Nas condições ótimas estabelecidas, os autores conseguiram recuperar aproximadamente 75% a 80% das proteínas com purezas de 66% e 80% para α -la e β -lg, respectivamente. A β -lg também foi isolada por meio de uma combinação dos processos de precipitação e diafiltração, obtendo-se a proteína com 95% de pureza e 60% de rendimento do processo (PETRA et al., 1997). GURGEL et al. (2001) empregaram a adsorção bioseletiva, usando uma resina composta por um hexapeptídeo covalente, para purificar a α -la a partir de uma solução de isolado protéico de soro em pó. Na etapa de dessorção foi usada um gradiente de 0,1 gmol.L^{-1} a 0,5 gmol.L^{-1} de NaCl, sendo obtidas quatro frações com diferentes conteúdos protéicos. As máximas purezas foram de 90,6% para α -la e 91,9% para a β -lg, com rendimentos de 47,9% e 26,3% para α -la e β -lg,

respectivamente. Estes resultados foram obtidos a partir de volumes de amostras de 500 μL .

Como pode ser observado os níveis de pureza nos estudos referenciados são menores que os do presente trabalho podendo-se afirmar que o resultado deste trabalho com relação à pureza está entre os mais altos descritos. Assim, o emprego das três etapas para a purificação das proteínas α -la e β -lg é uma alternativa técnica viável para a purificação destas proteínas; embora, não seja possível afirmar se é ou não a mais indicada, já que para tanto seria necessário comparar a factibilidade econômica financeira dos vários processos mencionados, mas, os dados para efetuar tal estudo são escassos na literatura.

4. Conclusões

A cromatografia de troca iônica usando a resina Accell Plus QMA®, foi uma técnica de concentração seletiva das proteínas α -la e β -lg. O sistema aquoso bifásico composto por 18% de PEG 1500 e 18% fosfato de potássio particionaram adequadamente ambas proteínas e a cromatografia de exclusão molecular foi capaz de purificar as proteínas das fases na etapa de polimento. A estratégia de purificação desenvolvida, mediante a combinação destas três técnicas de separação, foi eficiente na separação e purificação das proteínas α -la e β -lg a partir de uma solução de isolado protéico do soro de queijo. As purezas obtidas foram de 97% para a β -lg e de 93% para a α -la e o rendimento foi de 65,12% e 47,39%, para β -lg e para a α -la, respectivamente.

6. Referências Bibliográficas

- ALBERTSSON, P. A . **Partition of cell and macromolecules**. New York: John Wiley, 1986. 346 p.
- AL-MASHIKI, S. A., NAKAI, S. Reduction of β -lactoglobulin content of cheese whey by polyphosphate precipitation. **Journal Food Science**, v.52, n.5, p.1237-1240, 1987.
- ANDERSSON, E. and BAILEY, J. E. Aqueous two-phase partition coefficients for Escherichia coli B-galactosidase fusions . **Biotechnology Techniques**, v.1, p.207-212. 1987.
- ANUALPEC. Anuário da Pecuária Brasileira. São Paulo-Brasil: FNP Consultoria & Comercio, 2002. 400p.
- BARTH, H. G., BOYES, B. E., JACKSON, C. Size exclusion chromatography and related separation techniques. **Analytical Chemistry**, v. 70, p. 251-278, 1998.
- BRAMAUD, C., AIMAR, P., DAVEEE, G. Whey protein fractionation: Isoelectric precipitation of α -lactalbumin under gentle heat treatment. **Biotechnology and Bioengineering**, v.56, n.3, p.391-397, 1997.
- CARRÈRE, H., BASCOUL, A., FLOQUET, P., WILHELM, A. M., DELMAS, H. Whey proteins extraction by fluidized ion exchange chromatography: simplified modeling and economical optimization. **The Chemical Engineering Journal**, v. 64, p. 307-317, 1996.
- ETZEL, M. R. A new way to separate whey proteins?. **Food Engineering** , v. 3, p. 12, 2000.
- FERREIRA, R. C. **Separação de α -lactoalbumina e β -lactoglobulina de proteínas do soro de queijo por adsorção em colunas de leito fixo, Viçosa**, MG: DTA, UFV, 2001. Dissertação (Mestrado), Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa , 2001, 81p.
- FISCHER L., **Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology An introduction to Gel Chromatography**, Elsevier, Newyork, p.220, 1974.
- FRIEDMAN, M. Nutritional value from different food sources. A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 6-29, 1996.
- GERBERDING, S. J., BYERS, C. H. Preparative ion-exchange chromatography of proteins from dairy whey. **Journal of Chromatography**, v. 808, p.141-151, 1998.
- GIRALDO ZUÑIGA, A. D., COIMBRA, J. S. R., FERREIRA, R. C., MINIM. L. A. Quantificação de proteínas do soro de queijo através de cromatografia líquida

- de fase reversa. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. v 54, n.316, p 17-21, 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, n. 3, p. 149-155, 2001.
- GIRALDO ZUÑIGA, A. D., COIMBRA, J. S. R., GOMES, J. C., MINIM, L. A., GARCIA ROJAS, E. E. Propriedades funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. v 57, n.325, p. 36-45, 2002.
- GRASSELLI, M., NAVARRO, A., FERNANDEZ, H. L., MIRANDA, M. V., CAMPERI, I., OSVALDO CASCONI. Que hacer com el suero de queso. **Ciencia Hoy**, v.43, n.1, p.27-35, 1997.
- GURGEL, P., CARBONELL, R. G., SWAISGOOD, H. E. Fractionation of whey proteins with a hexapeptide ligand affinity resin. **Bioseparation**, v.9, p.385-392, 2001.
- HAHN, R., SHULZ, P. M., SCHAUPP, C., JUNGBAUER, A. Bovine whey fractionation based on cation-exchange chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 795, p.277-287, 1998.
- HUGUNIN, A. A protein for al seasons. (whey proteins). **Dairy Industries International**. v. 64, p.19-22, 1999.
- IRVINE, G. B. Size-exclusion high-performance liquid chromatography of peptides: a review. **Analytica Chimica Acta**, v.352, p. 387-397, 1997.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LI, M., ZHU, Q. Z., MEI. Partitioning of amino acids by aqueous two-phase systems combined with temperature-induced phase formation. **Biotechnology Progress**, v.13, n.1, p.105-108,1997.
- LI, Y., BEITLÉ, R. R. Protein purification via aqueous two-phase extraction and immobilized metal affinity chromatography. Effectiveness of salt addition to enhance selectivity and yield of GFPuv. **Biotechnology Progress**, v. 18,p. 1054-1059, 2002.
- LOUGH, W.J.,WAINER, I.W.(Eds). **Chromatography : Fundamental Principles and Practice**, London, p. 276, 1996.
- MANJI, B., HILL, A., KAKUDA, Y., IRVINE, D. M. Rapid separation of milk proteins by anion exchange chromatography. **Journal of Dairy Science**. v. 68, p.3176-3179, 1985.

- MANN, E. Whey products and their uses. **Dairy Industries International**. v. 6, p.13, 2000.
- MCINTOSHI H. GRAEME, PETER J. ROYLE, RICHARD K. LEU, GEOFFREY REGESTER, MELISSA JOHNSON, ROSS L. GRINSTED, RACHEL S. KENWARD AND GEOFFEREY W. SMITHERS., Whey Proteins as Functional Food Ingredients?., **International Dairy Journal** ,8 p. 425-434,1998
- MEHRA, R. K., DONNELLY, W. Fractionation of whey protein components through a large pore size hydrophilic, cellulosic membrane. **Journal Dairy Research**. v.60, n.1, p. 89-97, 1993.
- OUTINEN, M., HARJU, M., TOSSAVAINEN, O and ANTILA, P. (Valio Oy, FIN-00100 Helsinki, Finland) PCT International Patent application WO 95/19714. **Trends in Food Science & Technology**. v. 7, p.340, 1996.
- OUTINEN, M., TOSSAVAINEN, O., TUPASELA, T., KOSKELA, P., KOSKINEN, H., RANTAMAKI, P., SYVAOJA, E-I., ANTILA, P., KANKARE, V (b). Fractionation of proteins from whey with different pilot scale processes. **Lebensm.-Wiss. U. Technol**. v. 29, p.411-417, 1996.
- PETRA, W. J. R., CAESSENS., VISSER, S., GRUPPEN, H. Method for the isolation of bovine β -lactoglobulin from a cheese whey protein fraction and physicochemical characterization of the purified product. **International Dairy Journal**, v. 7, p. 229-235, 1997.
- ROJAS, G. E. E. **Separação e Purificação de α -lactoalbumina e β -lactoglobulina pela Cromatografia por Exclusão Molecular após a Extração com Sistemas Aquosos Bifásicos**. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa: UFV, 82p., 2001.
- SRINIVAS, N. D., RASHMI, K. R., RAGHAVARAO, K. S. M. S. Extraction and purification of a plant peroxidase by aqueous two-phase extraction coupled with gel filtration. **Process Biochemistry**, v.35, p.43-48, 1999.
- USDEC, **Manual de referência para produtos de soro dos EUA**. Arlington, VA 22201-3001 U.S.A, 1997
- WATERS CORPORATION, WWW.waters.com/SPE.chem.htm#qma (capturado em 04/03/2002).
- YOSHIDA, S. Isolation of β -lactoglobulin and α -lactoglobulin by gel filtration using sephacryl s-200 and purification by diethylaminoethyl ion - exchange chromatography. **Journal Dairy Science**, v.73, p.2292-2298, 1990.

ESTUDO PRELIMINAR DE IMPLANTAÇÃO DE UMA UNIDADE DE PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DO SORO DE QUEIJO

Laboratório de Processos de Separação (LPS) / Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), Universidade Federal de Viçosa, MG – Brasil, CEP 36571-000

RESUMO

A unidade de purificação de proteínas do soro de queijo será instalada no município de Viçosa, microrregião da Zona da Mata, estado de Minas Gerais, por razões de disponibilidade de matéria-prima, energia, água, infra-estrutura e mão-de-obra especializada. Esta unidade captará da região 5904 litros de soro diariamente.

A empresa terá uma área construída de 548,66 m², distribuídos entre a unidade de processamento, área administrativa e utilidades; em um terreno de 1400 m². Haverá a geração de 32 empregos diretos, sendo 5 na área administrativa e 27 na área de produção, divididos em três turnos de oito horas cada. Com sua hierarquia pouco verticalizada, contará com mão-de-obra especializada, distribuída nos segmentos de diretoria, gerência e produção.

Além da geração direta de empregos, ocorrerá o incentivo à produção leiteira, acarretando um aumento no número de empregos no campo. Haverá também maior circulação de renda na região devido à arrecadação de impostos, contribuindo para o desenvolvimento da mesma. Outra grande contribuição da unidade será a implantação e difusão de novas tecnologias, ofertando produtos de qualidade e alto valor agregado.

O investimento inicial da unidade será de R\$ 4.909.114,82, com uma necessidade de capital de giro de R\$ 1.604.187,51. Os custos totais anuais serão da ordem de R\$ 15.038.504,32 e a receita anual será da ordem de R\$ 17.723.520,00.

Os indicadores financeiros demonstram a viabilidade do investimento, com um Tempo de Retorno de Capital de 2,85 anos, Ponto de Nivelamento de 33,95%, Taxa Interna de Retorno de 35,95% e Valor Presente Líquido de R\$ 4.870.244,33.

1. INTRODUÇÃO

O presente estudo é decorrente da necessidade de conhecer a viabilidade econômica do processo de purificação de proteínas α -lactoalbumina e β -lactoglobulina, desenvolvido no laboratório de Processos de Separação (LPS) do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) –MG.

O processo foi desenvolvido inicialmente em escala de laboratório. Os dados colhidos na etapa experimental, foram a base para dimensionar os equipamentos e para efetuar o aumento de escala. O recomendado é aumentar o tamanho dos equipamentos de forma gradativa para observar o comportamento das etapas do processamento em relação à eficiência dos equipamentos. Este procedimento foi inviabilizado devido a impossibilidade de sua condução na maioria dos centros acadêmicos.

A avaliação do aumento de escala para as técnicas cromatográficas foram efetuadas com o emprego de um software desenvolvido por SARAIVA (2003), o que permitiu maior aproximação de situações reais, embora alguns parâmetros tenham sido estimados.

Assim, neste trabalho, é apresentada uma avaliação econômica da implantação de uma unidade de purificação das proteínas α -lactoalbumina e β -lactoglobulina presentes no soro de queijo possibilitando ter-se uma estimativa dos custos envolvidos em cada etapa do processo e identificar as etapas mais onerosas.

2. CARACTERIZAÇÃO DA EMPRESA

A unidade de purificação de proteínas do soro de queijo será instalada na cidade de Viçosa-MG e terá capacidade instalada de 5904 litros de soro. A captação do soro será a granel por meio de caminhão isotérmico.

Com o objetivo de recuperar as proteínas presentes no soro de queijo e aumentar o valor agregado deste sub-produto da indústria de laticínios, a

empresa purificará e comercializará as proteínas α -lactoalbumina (93% de pureza) e β -lactoglobulina (97% pureza) do soro de leite.

Os produtos em pó, comercializados em frascos de vidro de 10 g e 50 g, se destinarão ao uso como ingredientes para as indústrias de alimentos funcionais e nutracêuticos, devido às características particulares destas proteínas, assim como para a indústria farmacêutica. A distribuição será terceirizada.

A unidade consistirá de uma planta industrial de separação e purificação das proteínas α -lactoalbumina e β -lactoglobulina, um laboratório para análises de rotina, um prédio administrativo, uma guarita, um prédio para utilidades (caldeira, sistema de refrigeração e oficinas) e uma estação de tratamento de resíduos totalizando uma área construída de 548,66 m² em um terreno de 1400 m².

A empresa prevê a geração de 32 empregos diretos sendo 5 na área administrativa e 27 na área de produção, distribuídos em três turnos de trabalho.

3. MERCADO

Historicamente, o mercado brasileiro de laticínios sempre dependeu das importações para manter e suprir as necessidades internas, mas está conseguindo reverter essa tendência e, surpreendentemente, começando até a exportar parte de sua produção (ANUALPEC, 2002).

A evolução da produção interna de produtos lácteos no Brasil pode ser observada na Tabela 1.

Esses números mostram que apesar do aumento de produção, isolados protéicos de soro de leite em pó e outros derivados de leite não são produzidos em larga escala no Brasil, embora não existam levantamentos precisos do total de produção destes derivados. Estima-se que no Brasil 50% do soro seja despejado diretamente nos rios, o que não é só um crime previsto por lei como é também rejeitar um ingrediente de elevadas características nutricionais e funcionais (GIRALDO-ZUNIGA et al., 2002).

Tabela 1 - Dados da produção interna de lácteos no Brasil

PRODUTOS	PRODUÇÃO INTERNA (em milhões de litros)			
	1998	1999	2000	2001
LEITE IN NATURA	2.550	2.582	2.671	2.100
LEITE PASTEURIZADO	1.965	1.720	1.711	1.650
LEITE UHT	2.965	3.300	3.727	4.100
LEITE EM PÓ	2.420	2.300	2.262	2.600
QUEIJOS	6.751	6.830	7.161	7.250
IOGURTES	290	284	297	300
LEITE CONDENSADO	433	438	468	470
CREME DE LEITE	279	265	287	300
OUTROS PRODUTOS	1.043	1.351	1.183	1.745
TOTAL	18.696	19.070	19.767	20.515

Fonte: www.milknet.com.br

Nos EUA, maiores produtores de soro no mundo, o processamento diversificado e otimizado do mesmo resultou em um re-aproveitamento de 95%. Além disso, o soro de leite marca um novo começo em uma nova era na formulação de alimentos e suplementação alimentar. As proteínas do soro representam um grande mercado potencial, por ter larga aplicação em alimentos e bebidas em geral e, especialmente, àqueles voltados à saúde e à boa forma, fazendo do soro um dos mais importantes produtos no crescente mercado de ingredientes alimentícios que movimenta US\$ 50 bilhões por ano e continua em franca expansão (USDEC, 2002). O uso destas proteínas como ingredientes em alimentos funcionais lácteos e não lácteos está aumentando progressivamente devido às suas propriedades nutricionais e funcionais, tais como: anticarcinogênicas, regulador do sono e digestiva.

Analisando a situação econômica e tendências da indústria de laticínios nacional, nota-se que muitas empresas continuarão expandindo e investindo no setor, usando toda a criatividade para melhorar a competitividade. Um fator que também pode ser considerado relevante é a própria flutuação do câmbio uma vez que a maioria dos produtos tem seu preço fixado em dólar. Tais fatores mostram que o momento é oportuno e adequado para analisar o impacto econômico que a

industrialização e a comercialização otimizadas das proteínas do soro podem ter para a indústria brasileira.

4. LOCALIZAÇÃO

O Brasil tem passado por importantes mudanças em relação à distribuição geográfica da produção de leite. As bacias leiteiras tradicionais localizam-se, na atualidade, nas regiões sudeste e sul do país, notadamente nos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul.

Como o produto alvo da empresa a ser instalada é originado do soro e conseqüentemente do leite, é necessário precisar onde ficam os maiores produtores de leite do Brasil. Na Tabela 2 pode-se observar que MG ocupa, atualmente o primeiro lugar na produção leiteira do País, com cerca de 6 bilhões de litros anuais. Assim, o projeto da unidade de purificação de proteínas do soro de queijo, foi desenvolvido para a cidade de Viçosa, localizada na Zona da Mata Mineira.

Tabela 2 - Dados dos seis maiores estados produtores de leite no Brasil em 2000.

Produção de Leite		
Estados		Milhões de litros
1º	Minas Gerais	5.865
2º	Goiás	2.194
3º	Rio Grande do Sul	2.102
4º	São Paulo	1.861
5º	Paraná	1.799
6º	Santa Catarina	1.003

Fonte: Embrapa Gado de Leite

O estado de Minas Gerais é composto por várias mesorregiões geográficas, como mostrado na Figura 1. Dentre estas mesorregiões observa-se que o maior número de laticínios está localizado nas regiões sul, zona da mata, central e triângulo (Figura 2). Todas estas mesorregiões estão relativamente próximas à região da zona da mata, o que indica ser essa a melhor região para a implantação da indústria proposta.

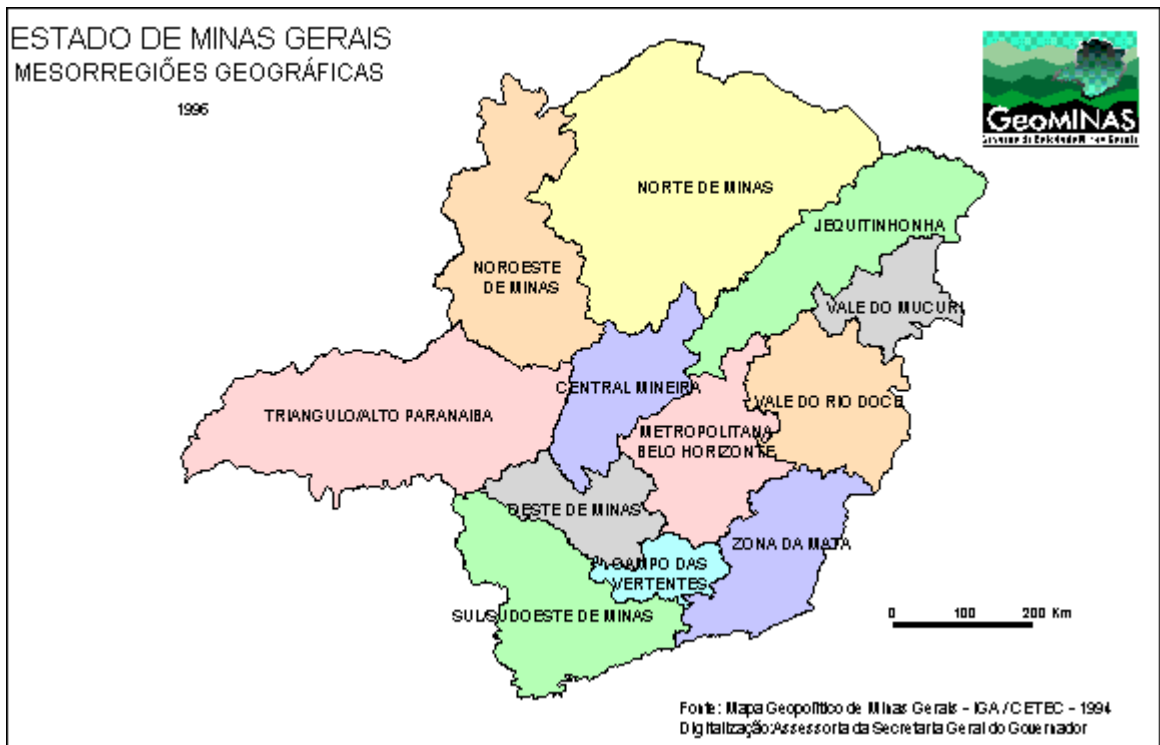


Figura 1 – Mesorregiões geográficas do estado de Minas Gerais

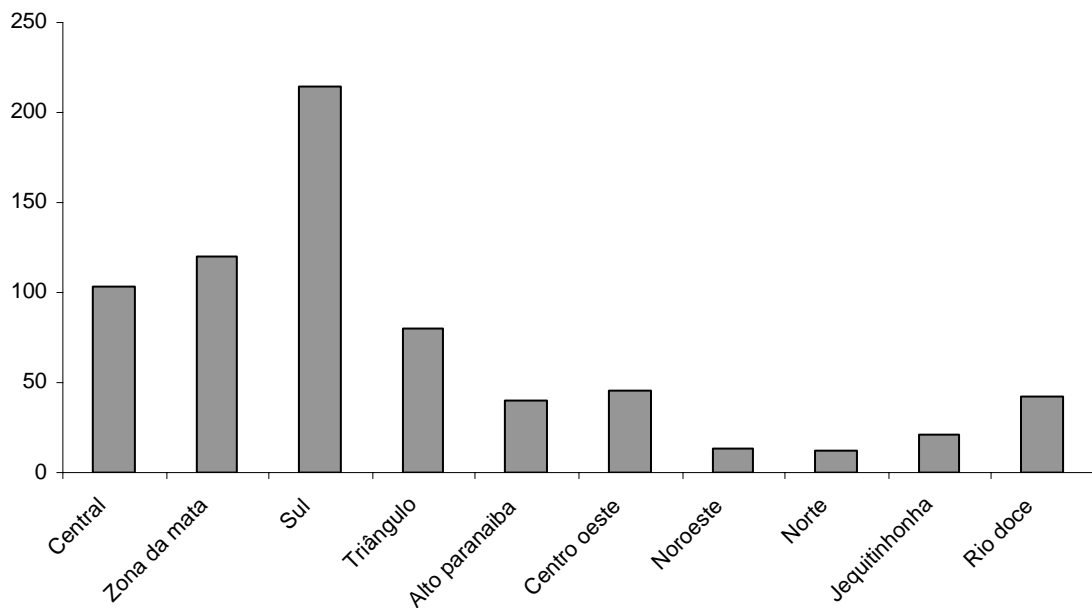


Figura 2 – Distribuição por mesorregião do número de unidades processadoras de leite com SIF em Minas Gerais

Após definir a mesorregião, foi selecionada a microrregião, pelo critério da disponibilidade de mão de obra especializada e infraestrutura oferecida. Decidiu-se então pela cidade de Viçosa, que também conta com os serviços da Universidade Federal de Viçosa e do laticínios da FUNARBE/UFV. Viçosa é um dos mais importantes Municípios da Zona da Mata. É sede da Universidade Federal Viçosa, tida como um dos mais importantes centros de estudos agrônômicos da América Latina. Seu nome presta uma homenagem a Dom Antônio Viçoso, bispo de Mariana.

5. CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

A matéria-prima aqui considerada trata-se de 5904 litros de soro por dia, adquiridos em laticínios de viçosa e demais municípios da microrregião, que apresentam em conjunto um volume de matéria-prima disponível constante.

5.1. SORO

O soro de queijo, também chamado de soro de leite, é um subproduto da indústria de laticínios, de cor amarelo-esverdeada, obtido pela coagulação do leite. O seu sabor, ligeiramente ácido ou doce, e a sua composição dependem do tipo e do processo de fabricação do queijo (BEM-HASSAN e GHALY, 1994). A composição média do soro doce e do ácido é mostrada na Tabela 3.

Tabela 3 - Composição média e pH de soros doce e ácido

	Soro doce (%)	Soro ácido (%)
Umidade	93 - 94	94 - 95
Gorduras	0,3 - 0,5	0,3 - 0,6
Proteínas	0,8 - 1,0	0,8 - 1,0
Lactose	4,5 - 5,0	3,8 - 4,2
Cinzas	0,5 - 0,7	0,7 - 0,8
Acido láctico e outros	0,1	0,1 - 0,8
Cálcio	0,05	0,13
Sódio	0,07	0,06
Potássio	0,13	0,15
Fósforo	0,06	0,09
<i>PH</i>	<i>6,4</i>	<i>4,7</i>

Fonte: modificado de MADRID et al. (1996), MULVIHILL (1992) e MORR e HÁ (1993).

A presença de proteínas no soro torna-o um material adequado para uso na alimentação humana. Nas últimas décadas observou-se crescente interesse pela qualidade nutricional dessas proteínas sendo observado uma tendência do aumento do número formulações de alimentos infantis e dietéticos nas quais o soro pode ser adicionado. As características nutricionais e funcionais das proteínas do soro estão relacionadas com a sua estrutura e função biológica. É importante ressaltar que têm uma alta digestibilidade e são constituídas por aminoácidos presentes em quantidades equilibradas que lhe conferem, ou até excedem, os requisitos nutricionais para adultos e crianças (DE WITT, 1998; TOSI et al., 1997).

A produção mundial do soro de queijo é de aproximadamente 84,9 milhões de toneladas anuais (ANUALPEC, 2002). No Brasil estes números estão em torno de 3,2 milhões de toneladas de soro, gerando 256 mil kg de proteínas, o que justifica o interesse crescente na utilização comercial deste subproduto.

6. DIMENSIONAMENTO

A unidade industrial terá capacidade instalada para receber 5904 litros de soro por dia, perfazendo um volume mensal de captação de cerca de 177 mil litros.

A Tabela 4 apresenta o volume mensal de produção da unidade industrial.

Tabela 4 - Volume mensal de produção.

Produto	Produção / kg	Produção frascos de 50g
α -lactoalbumina	72	252
β -lactoglobulina	220	4400

7. Fluxograma de produção

O fluxograma de produção bem como o balanço global de massa para um dia de operação estão apresentados, na Figura 3.

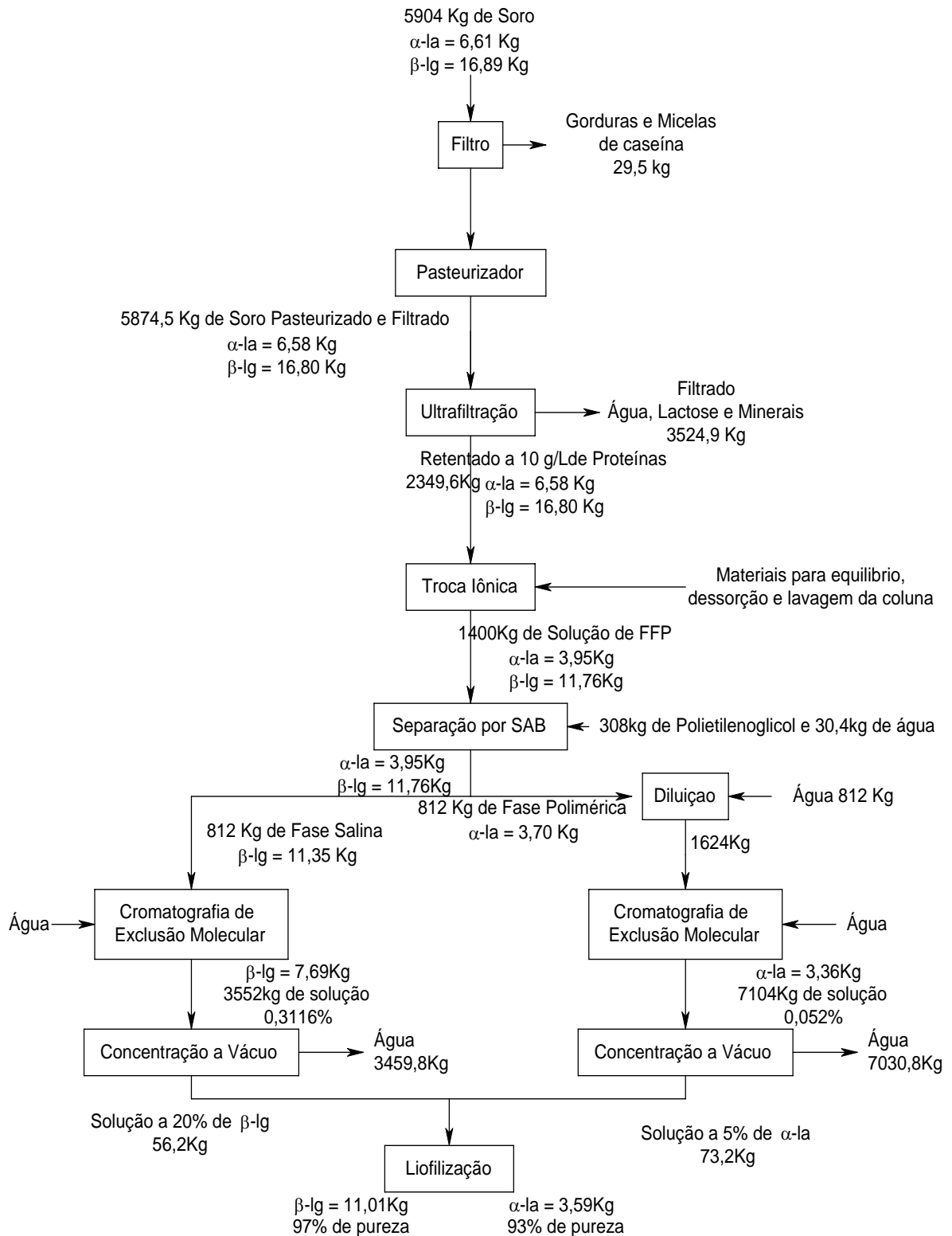


Figura 3 - Fluxograma de produção e balanço de massa para o processo.

8. CONSUMO DE COMBUSTÍVEL E DEMANDA DE ENERGIA ELÉTRICA

Dada a necessidade de vapor calculada, optou-se pela aquisição de uma caldeira flamo-tubular com geração de 1000 kg/h de vapor, cujo combustível será o óleo combustível fornecido pela BR-Distribuidora (Petrobrás) – Unidade Uberlândia. A necessidade diária de óleo combustível será igual a 331,67 kg.

Para estimar o consumo de energia elétrica da unidade foram considerados como pontos de maior consumo os seguintes itens: iluminação, compressores, bombas, agitadores dos tanques e silos. Com base nesses itens chegou-se a um consumo diário de 2570 kW.h.

9. ETAPAS DE PRODUÇÃO

9.1 . RECEPÇÃO DO SORO

O soro será recebido a granel, transportado por caminhões com tanques isotérmicos com capacidade para 8000 L. Na plataforma de recepção serão realizados testes relativos ao teor de proteínas, gordura, pH e contagem em placas. O soro será então bombeado para os silos de armazenamento, passando antes por um medidor de vazão que registrará a quantidade de soro alimentada na linha. Em seguida será processado.

9.2. PASTEURIZAÇÃO DO SORO

Dos silos de armazenamento, o soro será bombeado para a pasteurização a uma taxa de 1500 L/h. O tratamento térmico será realizado em um pasteurizador de placas a 75°C por 15 segundos. O objetivo da pasteurização é destruir todos os microrganismos patogênicos presentes no soro. Simultaneamente à pasteurização ocorrerá a separação da matéria gorda, ou desnate, do leite.

9.3. ULTRAFILTRAÇÃO

A ultrafiltração é um processo de separação por membranas onde moléculas (soluto) de diferentes massas molares são separadas da solução, dada uma pressão aplicada. As membranas de ultrafiltração têm sua precisão de separação determinada pelo tamanho de seus poros e sua distribuição. Uma

solução a ser ultrafiltrada terá suas moléculas separadas em função da sua massa molar, da sua forma e do seu tamanho. Esta técnica está emergindo gradativamente como processo de biosseparação importante para a purificação de substâncias como drogas terapêuticas, enzimas, hormônios, anticorpos, etc. (SAKSENA e SIDNEY, 1994)

Para a concentração das proteínas do soro até 10 g/L será utilizada a técnica de ultrafiltração, ocorrendo também a remoção parcial da lactose e dos sais minerais junto com a água.

9.4. CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

Na cromatografia de troca iônica, a separação ocorre de acordo com a carga das biomoléculas. Este é o método mais comumente empregado para purificação de proteínas. É também utilizada com muita efetividade pelas indústrias de bioquímica fina e farmacêutica e no escalonamento dos processos de isolamento de proteínas (GERBERDING e BYERS, 1998). O adsorvente a ser empregado será a resina Accell Plus QMA® (Waters) empacotada em duas colunas Chromaflo 600 de 35 L de volume e com uma operação de 8 ciclos. Nesta etapa as proteínas α -lactoalbumina e β -lactoglobulina ficarão adsorvidas na matriz.

9.5. EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO COM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS

Uma alternativa adequada aos processos tradicionais em biosseparações é a partição em sistemas aquosos bifásicos (SAB), a qual vem sendo usada com sucesso no isolamento de proteínas e de outros materiais de origem biológica.

Os SAB são constituídos por duas fases imiscíveis, que promovem a separação de biomoléculas, em condições amenas e em um ambiente adequado, de forma que sejam preservadas as suas principais características. Esses tipos de sistemas resultam da incompatibilidade, em soluções, de dois polímeros, por exemplo polietilenoglicol (PEG) e dextrana, ou entre um polímero e um sal, como PEG e fosfato de potássio (COIMBRA et al, 2002). A alta concentração de água, de 65% a 90%, em tais sistemas favorece a estabilidade das proteínas durante a

separação, quando comparados com sistemas tradicionais, compostos com solventes orgânicos (LI et al., 1997).

Será empregado o SAB composto por 18% de fosfato de potássio e 18% de polietilenoglicol no equipamento extrator Graesser. O SAB será formado pela solução de fosfato de potássio usada na etapa de dessorção da cromatografia de troca iônica adicionada de polietilenoglicol e água.

9.6. CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR

A técnica de cromatografia por exclusão molecular (CEM) efetua a separação de acordo com o tamanho efetivo das moléculas. A coluna é recheada com material inerte cujos poros têm tamanho controlado. As moléculas pequenas podem penetrar na maioria dos poros apresentando um maior tempo de retenção, enquanto as maiores são excluídas de todos os poros. Assim, moléculas grandes movem-se rapidamente através da coluna e as moléculas pequenas são eluídas lentamente pela fase móvel (COLLINS et al., 1997; IRVINE, 1997).

Após a separação das fases do SAB, a CEM será empregada para separar a α -lactoalbumina e β -lactoglobulina do polietilenoglicol e do fosfato de potássio, respectivamente. A resina a ser utilizada será a resina Shepadex® G-25-media (Pharmacia) empacotada na coluna Chromaflow 1000.

9.7. CONCENTRAÇÃO DO ELUENTE APÓS CEM

Em um evaporador com recompressão térmica de vapor (TVR) tem-se uma otimização do uso de energia na forma do vapor que promove a concentração do líquido de alimentação para o teor de sólidos desejado. Teoricamente, neste sistema, tem-se que cada 1 kg de vapor originário da caldeira será capaz de evaporar 1 kg de água por efeito. Assim se, por exemplo, para o caso de um evaporador de triplo efeitos, 1 kg de vapor fornecido poderá evaporar 3 kg de água da matéria prima a ser concentrada. A água evaporada no primeiro efeito é utilizada como fonte de energia para o mesmo fim no segundo efeito, que está a uma pressão menor que o primeiro, e, assim sucessivamente. Obviamente o número de efeitos a ser empregado é determinado por questões de custo e escala de projeto.

No processo de concentração o evaporador do tipo TVR será utilizado para concentrar a solução proveniente da cromatografia de exclusão molecular. Após a concentração, as fases são resfriadas e armazenadas em tanques isotérmicos para posterior secagem por liofilização.

9.8. LIOFILIZAÇÃO

A liofilização é uma técnica de conservação que emprega a redução da umidade do produto e resulta em compostos de alta qualidade. É aplicada em substâncias de alto valor comercial como alimentos dietéticos, produtos farmacêuticos, enzimas, proteínas, hormônios, alguns tipos de hortaliças e sucos de frutas.

A liofilização baseia-se na mudança do estado sólido da água para o de vapor, por sublimação, em determinadas condições de temperatura e pressão. Como método de desidratação, reduz significativamente a contração do produto, a decomposição térmica, perda de voláteis, as ações enzimáticas, a desnaturação de proteínas bem como as alterações da morfologia inicial do material (BARUFFALDI e OLIVEIRA, 1998).

O produto final, contendo as proteínas α -lactoalbumina e β -lactoglobulina, será liofilizado em um liofilizador FIC modelo L-50.

9.9. ACONDICIONAMENTO DOS PRODUTOS

Todos os produtos secos serão acondicionados em embalagens de vidro âmbar, com capacidade para 10g e 50g, e, com tampas herméticas para evitar o ganho de umidade do produto. O envase será feito manualmente acondicionando-se posteriormente as embalagens em pallets plástico.

Os produtos em pó serão acondicionados em local fresco e serão protegidos do contato com umidade excessiva durante seu armazenamento. As reações químicas nos produtos em pó à temperatura ambiente e com baixo conteúdo de umidade são lentas a ponto do valor nutritivo não ser afetado até mesmo depois de anos de armazenamento.

10. BOAS PRÁTICAS DE FABRICAÇÃO

De acordo com a portaria 368/97MAA, a unidade industrial adotará as boas práticas de fabricação (BPF) visando padronizar os processos produtivos e assegurar a qualidade dos produtos. Serão obedecidos requisitos como asseio e higiene nas áreas produtivas, condições externas à fábrica apropriadas, água com qualidade mínima garantida, estação de tratamento de efluentes, dentre outros abordados na portaria.

11. EQUIPAMENTOS

Os equipamentos devem seguir algumas normas de fabricação e localização, as quais resultam em um melhor desempenho das operações e bem estar dos funcionários. O uso do aço inox é imprescindível já as formas e superfícies dos equipamentos não devem permitir o acúmulo de resíduos que aumentam os riscos de contaminação do produto por favorecerem o desenvolvimento de microrganismos. O material da superfície em contato com o leite e seus derivados deve ser atóxico e não pode interagir com o alimento, sendo capaz de resistir às repetidas aplicações de substâncias usadas no processo normal de limpeza.

No geral, os equipamentos a utilizar são: 1 caminhão isotérmico, 4 bombas, 1 silo isotérmico de armazenagem, 1 pasteurizador de soro, 1 sistema de membranas para ultrafiltração, 2 colunas cromatográficas de troca iônica, 1 extrator graesser, 1 coluna cromatográfica de exclusão molecular, 01 concentrador TVR, 01 liofilizador, 01 empilhadeira elétrica, 01 transpalleteira, 01 balança, 01 caldeira geradora de vapor e 1 sistema de refrigeração.

12. CONSTRUÇÃO

De uma forma geral, o projeto da unidade industrial deve levar em consideração a segurança e o conforto dos funcionários no seu interior, ou seja, deve apresentar condições de iluminação, arejamento e índice de ruídos adequados e proporcionar facilidades na higienização, manutenção dos equipamentos, minimizar as probabilidades de contaminações e impedir a entrada de pragas e animais de qualquer espécie. Na elaboração do projeto devem ser

previstos: otimização dos espaços, área para ampliações futuras, áreas para descarte de resíduos longe da unidade de processamento, instalações sanitárias sem comunicação direta com o setor de processamento e meios de controle de insetos, pássaros e roedores no setor de produção.

As recomendações listadas a seguir foram baseadas no Manual de Boas Práticas de Fabricação para a Indústria de Alimentos publicado pela Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos (SBCTA) e complementadas com algumas especificações da indústria de laticínios, mas não reproduzem as regras na íntegra. Pretende-se neste perfil fornecer informações suficientes para alertar o empreendedor quanto aos esforços necessários para atingir as exigências legais e os padrões mínimos de qualidade. Recomenda-se que ao decidir por realizar um investimento como este, o empreendedor procure o auxílio de profissionais da área, informe-se sobre os aspectos legais vigentes e consulte literaturas mais aprofundadas.

13. INSTALAÇÃO DE EQUIPAMENTOS

Os equipamentos devem ser instalados de forma a permitir a circulação de pessoal ao redor, ficando afastados das paredes e de outros equipamentos cerca de 60 cm e também devem estar suspensos 30 cm acima do piso, facilitando a limpeza e manutenção. Os ângulos formados entre a base dos equipamentos, pisos e paredes devem ser arredondados, com raio mínimo de 5 cm.

14. INVESTIMENTOS

O investimento necessário para a implantação da unidade mostrou-se um pouco elevado como pode-se observar na Tabela 5.

Tabela 5 - Investimentos fixos necessários à implantação da unidade

ITEM	VALOR (R\$)
Terreno	28.000,00
Obras	281.462,58
Equipamentos	4.143.350,68
Outros	456.301,56
Total	4.909.114,82

Da Tabela 5 pode-se observar que os equipamentos são os de maior custo no total dos investimentos representando aproximadamente 63% do mesmo, principalmente por serem, muitos deles, importados e de alta tecnologia. Esta é uma característica dos projetos com base tecnológica voltados à biotecnologia e recuperação de biomoléculas (DATAR, 1990). No trabalho de EVANGELISTA et al. (1998), para purificação de β -glucoronidase recombinante a partir de milho transgênico, também foram obtidos altos custos em relação aos equipamentos utilizados.

O capital de giro necessário para o empreendimento proposto neste trabalho é de R\$ 1.604.187,51 uma vez que é considerado 100% das vendas a prazo. O capital a ser financiado pelo BNDES será de R\$ 4.477.956,61.

15. CUSTOS E RECEITAS

Os custos anuais de produção da unidade totalizaram o valor de R\$ 15.038.504,32. Dentre esses custos, os reagentes, as resinas e os impostos são os que mais oneram a produção. Porém, esse valor é compensado por uma receita anual de R\$ 17.723.520,00. A Tabela 6 mostra a participação de cada produto na receita, e a Figura 4 mostra o ponto de equilíbrio da unidade, sendo que este é relativamente baixo, mostrando atratividade para o investimento .

Tabela 6 - Contribuição de cada produto com a receita

PRODUTO	PREÇO (R\$)	QUANTIDADE	RECEITA (R\$)	%
α -lactoalbumina	12.750	862	10.985.400,00	61,98%
β -lactoglobulina	2.550	2642	6.738.120,00	38,02%

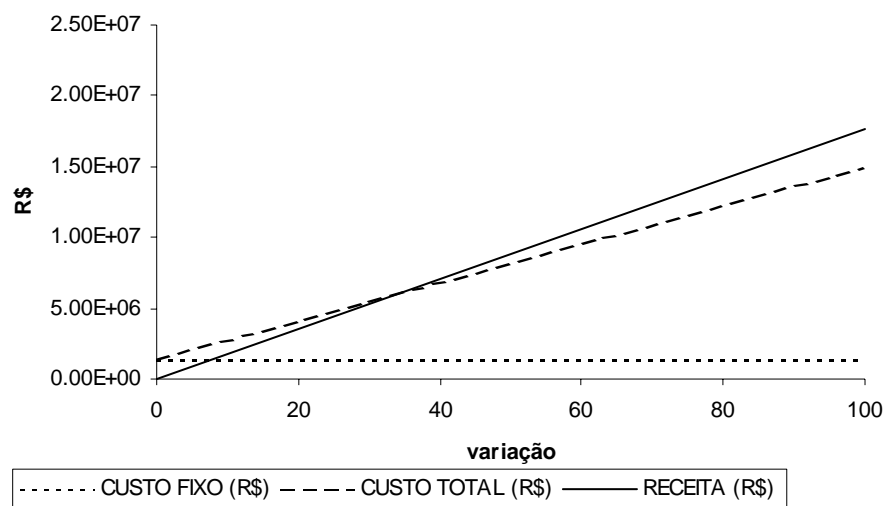


Figura 4 - Ponto de equilíbrio da Unidade

16. LINHAS DE FINANCIAMENTO

Para o presente empreendimento, o BNDES apresenta uma linha de financiamento (FINEM) que custeia 80% dos equipamentos e 60% dos demais investimentos a uma taxa de 14% ao ano. O empréstimo apresentaria dois anos de carência e a amortização da dívida seria de seis anos. O empréstimo terá um valor de R\$ 4 477 956,612.

17. ANÁLISE FINANCEIRA

Nas condições avaliadas, o projeto apresentou os indicadores econômicos mostrados na Tabela 7.

Tabela 7 - Indicadores econômicos do Projeto.

Descrição do indicador	Valor calculado
Tempo de retorno de capital (TRC)	2,83 anos
Ponto de nivelamento (PN)	33,95%
Taxa interna de retorno (TIR)	35,95%
Valor presente líquido (VPL)	R\$ 4.870.244,33

Pode ser verificado na Tabela 7 que o capital investido poderá ser recuperado após 2,8 anos. Observa-se que operando somente com 33,95% da capacidade instalada da planta é possível manter a receita igual ao custo. É desejável que este valor de até 40% (DA SILVA, 2000) .

A taxa interna de retorno (TIR) estabelece uma medida da rentabilidade de um projeto (DA SILVA, 2002). Da tabela podemos concluir que o investimento é totalmente recuperado, com um rendimento de 35,95% ao ano, durante a vida útil do empreendimento. Este valor está muito acima do valor pago pela poupança e por outros tipos de aplicações financeiras do mercado, aproximadamente 20%.

Como a maioria dos projetos agroindustriais, este empreendimento mostrou-se sensível às variações na receita e nos custos, como pode ser observado na Figura 5. A sensibilidade alcançou o valor de zero somente quando a variação foi de 20%, um fato muito interessante para este tipo de projetos.

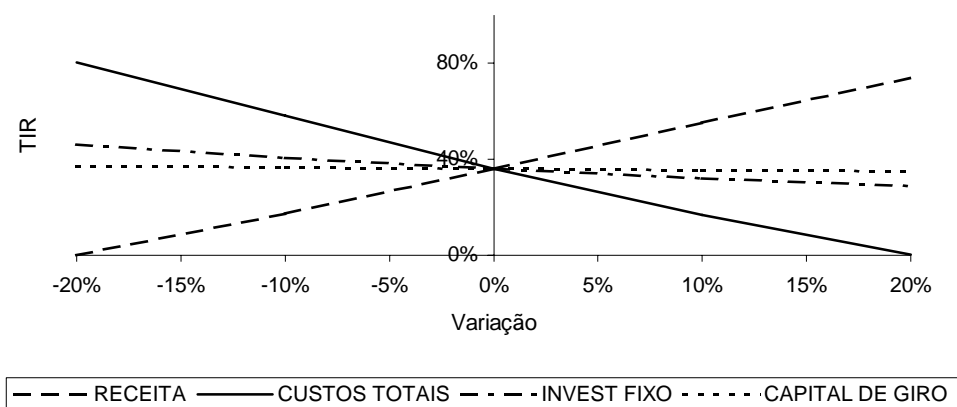


Figura 5 - Análise de sensibilidade do projeto.

18. CONCLUSÃO

Os indicadores econômicos mostraram um elevado grau de atratividade do projeto, uma vez que o TRC foi inferior a três anos e a TIR superior a 35%. Porém, percebe-se também a necessidade de um alto investimento inicial, restringindo de certa forma, os potenciais investidores para tal empreendimento.

A execução de uma análise de mercado mais apurada indicaria com maior confiabilidade o real mercado existente bem como os potenciais consumidores dos produtos ofertados por esta indústria, o que levaria ainda a uma maior certeza sobre os riscos para um empreendedor investir seu capital neste projeto.

19. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANUALPEC. Anuário da Pecuária Brasileira. São Paulo-Brasil: FNP Consultoria & Comercio, 2002. 400p.

BARUFFALDI, R., OLIVEIRA, M. N. Fundamentos de tecnologia de alimentos; São Paulo: Editora Atheneu, 1998, 317p.

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

COIMBRA, J. S. R., GIRALDO-ZUÑIGA, A. D., LUIS A. MINIM, ANTONIO., J. A. MEIRELLES. Uso de Sistemas Aquosos Bifásicos na Extração Líquido – Líquido. **Série Cadernos Didáticos da Editora UFV**, nº 95, 2002.

DA SILVA, C. A. B. Avaliação financeira de projetos com o auxílio de planilhas eletrônicas. **Série Cadernos Didáticos da Editora UFV**, nº 69, 2000.

DATAR, R. **Downstream process economics**, In: Separation processes in biotechnology, edited by Asenjo, J., 1990.

EVANGELISTA, R. L., KUSNADI, A. R. HOWARD, J. A., NIKOLOV, Z. L. Process and economic evaluation of the extraction and purification of recombinant β -glucuronidase from transgenic corn. **Biotechnology Progress**, v. 14, p. 606-614, 1998.

GERBERDING, S.J.; BYERS, C.H. Preparative ion-exchange chromatography of proteins from dairy whey. **Journal of Chromatography**, v. 808, p.141-151, 1998.

GIRALDO ZUÑIGA, A. D., COIMBRA, J. S. R., GOMES, J. C., MINIM. L. A., GARCIA ROJAS, E. E. Propriedades funcionais das proteínas do soro de leite.

Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes. v 57, n.325, p. 36-45, 2002.

SAKSENA, A., ZYDNEY, A. L. Effect of solution pH and ionic strength on the separation of albumin from immunoglobulins by selective filtration. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 43, p 960, 1994.

SARAIVA, S. H. Modelagem, simulação e análise de processo de cromatografia em fase líquida em escala preparativa. Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa para a obtenção do título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos

MADRID, V. A., CENZANO, I., VICENTE, J. M. **Manual de indústrias dos alimentos.** São Paulo- SP: Ed. Livraria Varela. 1996.p 147-169.

MANUAL DE INDÚSTRIAS LÁCTEAS – Equipe Técnica da Alfa-Laval Food, impresso por Praga S.A., Madri, 1993, 333p.

MORR, C., HA, E. W. Whey protein concentrates and isolates processing and functional properties critical reviews. **Food Science and Nutrition**, v.33, n.6, p.431-476, 1993.

MULVIHILL, D. M. Production, functional properties and utilization of milk protein products. **Advances Dairy Chemistry**, volume 1. Elsevier Science publisher, 1992.

PORTARIA 368/97MAA (Ministério de Agricultura e Abastecimento).

USDEC News, Vol. 4, nº 3, fevereiro de 2002

USDEC News, Vol. 5, nº 2, outubro de 2002

<<http://www.anvisa.gov.br>> Acesso em: 15 nov. 2002

<<http://www.cnpq.embrapa.gov.br>> Acesso em: 28 abril. 2003

<<http://www.milknet.com.br>> Acesso em: 02 Maio. 2003

<<http://www.milkpoint.com.br>> Acesso em: 15 abril. 2003

EXTRAÇÃO LÍQUIDO – LÍQUIDO USANDO SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS: UMA REVISÃO

Abraham D. GIRALDO-ZUÑIGA^a, Jane S. R. COIMBRA^{a*}, Luis A. MINIM^a, Antonio J. A. MEIRELLES^b

^a Laboratório de Processos de Separação, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa (UFV), CEP 36571-000 - Viçosa - MG, Brasil, jcoimbra@mail.ufv.br

^b Laboratório de Separações Físicas, Departamento de Engenharia de Alimentos – FEA - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CEP 13081-970-Campinas –SP, Brasil

* A quem devesse ser remetida a correspondência.

RESUMO

O presente trabalho apresenta uma revisão da literatura sobre a extração líquido-líquido usando sistemas aquosos bifásicos (SAB). A extração líquido-líquido convencional, usando soluções aquosas e solventes orgânicos, não é adequada para separar compostos de origem biológica, como proteínas e células, pois a estabilidade destas é baixa em solventes orgânicos. Uma variante da extração líquido-líquido tradicional, compatível com os processos de biosseparações, é a partição em SAB, a qual vem sendo usada com sucesso no isolamento de proteínas e de outros biocompostos. Novos SAB apropriados para o processamento em larga escala, estão sendo desenvolvidos. Por exemplo, polímeros, como maltodextrina e outros derivados de amido e de celulose vem sendo utilizados como uma alternativa ao emprego da dextrana, cujo custo é elevado. Bioligantes específicos são usados para aumentar a seletividade na partição das biomoléculas. Adicionalmente, extratores líquidos, disponíveis no mercado e operados em modo contínuo, têm sido testados na separação de proteínas, obtendo-se resultados satisfatórios.

Palavras-chave: Sistemas Aquosos Bifásicos, Biosseparação, Equipamentos para Extração Líquido-Líquido

1. INTRODUÇÃO

A extração com Sistemas Aquosos Bifásicos (SAB) permite isolar biomoléculas de misturas complexas e oferece vantagens, como curto tempo de processamento e fácil aumento de escala, além de usar um meio adequado para o trabalho com compostos de origem biológica. As fases da maior parte dos SAB são constituídas por 70% a 90% de água [54, 76], o que favorece a estabilidade das biomoléculas durante a separação, quando se compara com sistemas tradicionais, compostos com solventes orgânicos [81]. Recentes melhorias da técnica, com o emprego de novos SAB compostos por polímero + sal, polímero + polímero, copolímeros + sal ou copolímeros + polímero, permitem o seu uso em nível industrial. A extração com SAB foi bem sucedida na separação e purificação de diferentes enzimas e proteínas [76]. Uma discussão detalhada envolvendo aspectos básicos dos SAB assim como diferentes aplicações podem ser encontrados em ALBERTSSON [1], WALTER et al. [137] e ZASLAVSKY [143].

2. TIPOS DE SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS

Os SAB são formados quando dois polímeros ou um polímero e um sal são misturados acima de certas concentrações, ou seja, acima das condições termodinâmicas críticas. São constituídos por duas fases imiscíveis, que promovem a separação de produtos, provenientes ou não da biotecnologia, em condições amenas e em um ambiente adequado, de forma que sejam preservadas as suas principais características. Esses tipos de sistemas resultam da incompatibilidade, em soluções, de dois polímeros, por exemplo polietilenoglicol (PEG) e dextrana (Dex), ou entre um polímero e um sal, como PEG e fosfato de potássio (FFP) [1]. No entanto, o mecanismo de formação de duas fases, ainda não é bem conhecido.

A formação de SAB foi, de acordo com ALBERTSSON [1], primeiramente observada por Beijerink, em 1896, ao misturar ágar, gelatina e água em certas concentrações. A fase superior se tornou rica em gelatina e a inferior em ágar. Beijerink observou também a formação de fases com sistemas ágar + amido + água. Posteriormente, Dobry e Boyer-Kawenoky estudaram de forma sistemática a miscibilidade de pares de polímeros na presença de água ou de solventes orgânicos, observando a ocorrência ou não da separação de fases.

Porém, apenas em 1956, com os trabalhos de ALBERTSSON [1], deu-se o início do emprego de SAB para a separação de biomoléculas. O autor constatou que misturas de duas soluções de polímeros estruturalmente diferentes também poderiam levar à formação de SAB. Essa técnica foi então aplicada para partição de moléculas com atividade biológica, como proteínas, enzimas e células.

Existe uma grande variedade de polímeros hidrófilos, naturais ou sintéticos, capazes de formar fases quando misturados com um segundo polímero ou com um sal.

Os SAB PEG + Dex ou PEG + sais são amplamente utilizados, por se encontrarem disponíveis no mercado em grandes quantidades e não serem tóxicos [121].

Para uso em escala industrial, a Dex apresenta custo muito elevado. Assim, os sistemas PEG + sal têm sido empregados para extração de enzimas em larga escala, pelo reduzido custo, baixa viscosidade [70] e elevada seletividade [54]. SAB salinos (PEG + sal) são formados à temperatura ambiente, sendo a fase superior rica em PEG e a fase inferior rica em sal, como mostrado na Figura 1. Entretanto estes sistemas ainda apresentam algumas limitações, como por exemplo a desnaturação de biomoléculas, quando as concentrações de sal são altas. Para superar as limitações, novos compostos estão sendo usados como substitutos da Dex ou do sal em SAB, para processamento em larga escala. Por exemplo, o hidroxipropil-amido (HPS) forma SAB com PEG com muita facilidade e foi introduzido no mercado com os nomes comerciais de Reppal PES[®] e Aquafase[®] PPT. As propriedades desses sistemas são em muitos casos semelhantes as dos SAB poliméricos PEG + Dex [128]. Um outro sistema, composto por PEG + MD, foi usado para a separação de células de *Lactobacillus acidophilus* H2B20 UFV de um meio fermentado [85], para a partição de albumina de soro bovino (BSA) [5] e para a separação de α -la e de β -lg [118]. A BSA, α -lactoalbumina (α -la) e β -lactoglobulina (β -lg) também foram particionadas em SAB polipropilenoglicol (PPG) 1.400 + MD [117]. SARUBBO et al [110] empregaram um sistema formado por goma de castanheira (CTG) + PEG para a separação de BSA. JOHANSSON et al [62] vem testando SAB gerados por soluções aquosas de somente um composto formado por um copolímero linear de óxido de etileno (EO) e óxido de propileno (PO) hidrofobicamente modificado com grupos mirísticos (C₁₄H₂₉) (HM-EOPO). Este copolímero HM-EOPO, que produz um SAB ao ser misturado com água, apresenta potencial para emprego em biosseparações, pois parte de somente um único polímero e da água para formação das fases e pode ser usado em temperaturas e concentrações de sal moderadas. Adicionalmente, pode-se recuperar o copolímero mediante aquecimento moderado. As partições de BSA, lisozima e ácido láctico nestes sistemas foram também avaliadas. Um número maior de sistemas, com seus respectivos diagramas de fase, está detalhado em ALBERTSSON [1] e ZASLAVSKY [143].

Recentemente foram determinados dados de equilíbrio de fases para SAB compostos por PPG (ou por um copolímero tri-bloco de PEG-PPG) + água + um sacarídeo de baixa massa molecular (glicose ou maltose ou MD), por exemplo PPG + glicose, PPG + maltose, PPG + MD, copolímero PEG-PPG + glicose, copolímero PEG-PPG + maltose e copolímero PEG-PPG + MD [88]. Nestes SAB, foi observado que o aumento da massa molar dos polímeros resultou em aumento na região bifásica. Na Tabela 1 podem ser observados diferentes tipos de sistemas aquosos bifásicos avaliados em literaturas.

KIM e RHA [70] estudando a separação de fases de SAB compostos por PEG e diferentes tipos de sais (sulfato de amônia, FFP, tartarato de sódio, fosfato de sódio e citrato de potássio) aplicaram a teoria da exclusão para análise do mecanismo de formação de fases. Foi verificado que o sal foi excluído da fase polimérica pelo PEG sendo então concentrado no solvente livre de PEG. Observaram também que a separação de fases dos sistemas PEG + sal ocorreu quando a concentração do sal no solvente livre de PEG alcançou sua solubilidade limite e que a solubilidade limite diminuiu com o aumento da massa molecular (MM) do PEG.

A literatura relata que a formação de duas fases, para quase todos os sistemas polímero + polímero + solvente, ocorre, em geral porque uma baixa concentração molar dos polímeros em solução (menor que 0,05 mol/L) leva a um pequeno aumento de entropia durante a mistura. Por outro lado, como cadeias poliméricas têm uma área superficial, por molécula, maior do que a de compostos de baixa MM, as energias de interação entre os dois polímeros se sobrepõem à energia livre de Gibbs do sistema [14, 27].

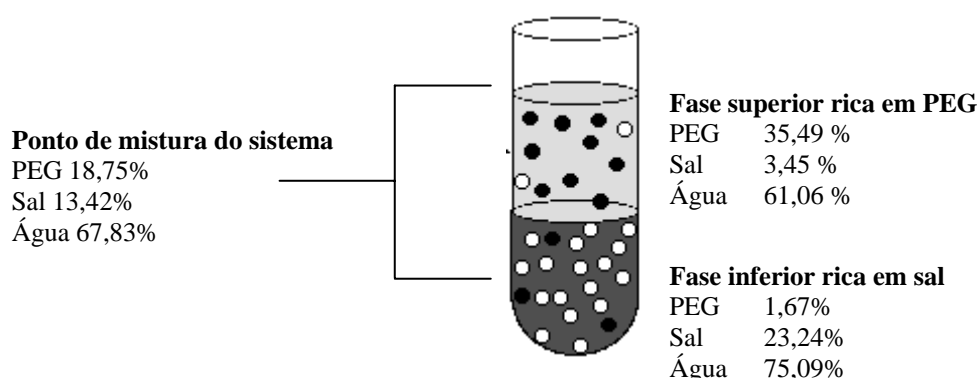


Figura 1 - Composição das fases (% m/m) para um ponto de mistura do sistema PEG1500 + FFP + água, a 25°C e pH 7 [38].

Tabela 1 - Sistemas aquosos bifásicos típicos

Polímero	Polímero	Referência
PEG	Dex	11, 21, 42, 43, 47, 48, 72, 84, 121, 105,130,139, 144,
	MD	85, 123, 118
	Polietilenamida	34
	HPS	125, 132, 135
	Repall PES	15, 22, 134, 135
	Amido modificado	99
	CTG	110
Polipropilenoglicol	MD	117
EOPO	HPS	98
Dex	Goma guar	120,133
	Ucon*	21
	EOPO**	4, 100
	Ficoll	143
Polímero	Sal	
PEG	Fosfato de potássio	1, 11, 23, 24, 25, 32, 39, 44, 48, 49, 50, 53, 56, 66, 87, 92, 93, 105, 109, 116, 119, 121, 136
	Fosfato de sódio	11, 66, 116
	Sulfato de sódio	105, 111
	Sulfato de amônia	64, 140
	Sulfato de magnésio	17, 49, 83
	Carbonato de potássio	140
Polímero	Água	
EO50PO50	Água	62
HM-EOPO	Água	97

*Ucon: copolímero de igual conteúdo de EO e PO

**EOPO: copolímero composto de EO e PO;

3. DIAGRAMAS DE EQUILÍBRIO DE FASES

Os dados de equilíbrio de fases para SAB podem ser representados em diagramas de equilíbrio, em uma dada temperatura e pressão. A representação gráfica dos dados termodinâmicos de SAB é de grande importância para os estudos de separação de biomoléculas pois são usados como uma ferramenta básica de ponto de partida para o desenvolvimento de um processo de extração[65]. Para construção dos diagramas os valores referentes às concentrações dos componentes nas fases em equilíbrio podem ser obtidos a partir de diferentes pontos de misturas dos constituintes do sistema [20, 1]. O tipo de representação para o diagrama de equilíbrio normalmente utilizado na literatura referente a SAB é o diagrama retangular.

A Figura 2 apresenta um diagrama de fases típico para um SAB polímero + polímero. A concentração de um dos componentes é representado no eixo horizontal e o teor do outro componente no eixo vertical. A quantidade de água (ou do terceiro componente) é calculada por

diferença. A curva CEB, que divide a região bifásica da região monofásica, é denominada curva binodal ou curva de equilíbrio. Na região acima da curva binodal há formação de duas fases (região bifásica), e abaixo dela a mistura é totalmente miscível (região monofásica). Supondo que o ponto A represente a composição de uma solução aquosa contendo os polímeros P e Q, após o equilíbrio termodinâmico ter sido atingido, as composições das fases resultantes serão representadas pelos pontos B e C [1].

No ponto crítico (E), as duas fases apresentam composições e volumes idênticos, sendo portanto indistinguíveis. Os segmentos de curva EC e EB representam as fases ricas nos polímeros Q e P, respectivamente. [1].

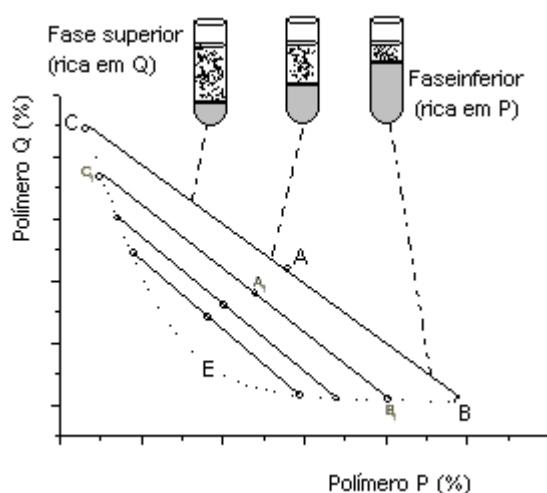


Figura 2 - Diagrama de fases para um sistema polímero-polímero (modificado de [1]).

Todos os sistemas com pontos de mistura localizados sobre o segmento de reta CAB, denominado linha de amarração, possuirão composições finais idênticas da fase superior (rica em Q) e inferior (rica em P). As linhas de amarração unem os pontos que representam as fases no equilíbrio, porém os volumes dessas fases são diferentes já que a variação da composição do ponto de mistura ao longo da linha de amarração produz mudanças no volume das fases. Se a composição for expressa em fração mássica, a razão entre as massas das fases ricas em P e Q será igual à razão entre os comprimentos das linhas AC e AB [143].

Para estudos de separação de fases em SAB há necessidade de uma medida numérica padrão para a composição das fases. Determinou-se empiricamente que o comprimento da linha de amarração, usualmente referido como TLL, é um valor adequado para utilização como tal medida. O valor TLL pode ser calculado a partir das concentrações dos componentes nas fases pela equação 1 [142]:

$$TLL = \{[C(P)_1 - C(P)_2]^2 + [C(Q)_1 - C(Q)_2]^2\}^{0.5} \quad (1)$$

em que $C(P)_n$ e $C(Q)_n$ são, respectivamente, as concentrações dos polímeros P e Q na fase n, sendo $n = \{1,2\}$ [142].

Uma outra característica importante dos diagramas de fases é a inclinação da linha de amarração (STL), calculada pela equação 2. A STL permite inferir a proporção de compostos a serem usados para a formação de duas fases.

$$STL = \Delta C(P)/\Delta C(Q) \quad (2)$$

em que $\Delta C(P) = [C(P)_1 - C(P)_2]$ e $\Delta C(Q) = [C(Q)_1 - C(Q)_2]$.

Na construção dos diagramas de equilíbrio é necessário coletar um número significativo de dados experimentais, o que na prática implica em uma elevação de custos e dispêndio de tempo, necessário para realização dos experimentos. Visando minimizar estes gastos foram desenvolvidos modelos termodinâmicos computacionais nesta área específica, para prever o equilíbrio de fases em sistemas multicomponentes sendo necessários apenas poucos dados experimentais.

Os modelos propostos na literatura para prever o comportamento das fases dos SAB, são baseados na teoria da expansão osmótica do Virial e na teoria "Lattice" [82]. A expansão osmótica do Virial deriva do conhecimento da pressão osmótica do solvente na solução, e tem sido usada para a predição do comportamento de fases dos SAB polímero + polímero e do coeficiente de partição de biomoléculas [20]. EDMON e OGSTON [35] propuseram a expansão osmótica do Virial para prever os diagramas de equilíbrio de fases de misturas aquosas de PEG e Dex. Este modelo foi modificado por KING et al [71] para ser utilizado na predição da separação de biomoléculas. Um outro modelo baseado na teoria "Lattice" é o modelo UNIQUAC (UNIversal QUAsi-Chemical Activity Coefficient), o qual foi empregado por KANG e SANDLER [67, 68] para descrever o comportamento das fases do SAB composto por PEG + Dext + água. Este modelo incorpora o efeito de polidispersão do polímero sobre o comportamento do sistema. Recentemente KABIRI-BADR e CABEZAS Jr. [65] propuseram um modelo termodinâmico, baseado na teoria da expansão osmótica do Virial, para prever o comportamento de SAB polímero + sal, que também inclui o efeito da MM do polímero sobre o comportamento do sistema. Alguns outros modelos termodinâmicos descritos na literatura para predição do equilíbrio em SAB são o UNIFAC e NRTL (Non-Random Two-Liquid). Uma revisão destes e de outros modelos foi feita por CABEZAS Jr. [20].

4. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS SAB

Propriedades físico-químicas de SAB como densidade, viscosidade e tensão interfacial são afetadas pela concentração dos constituintes do sistema. Para SAB poliméricos, as densidades das fases não são muito diferentes da densidade da água, comumente entre (1,0 e 1,1) g/mL. Este fato é devido a uma das características peculiares de SAB, que é o alto conteúdo de água nas fases [66]. Os SAB PEG + sais apresentaram uma diferença de densidades entre as fases na faixa de 8% a 14%.

A Figura 3 apresenta, para SAB PEG 1500 + FFP, as densidades das fases, a 25°C [38]. A fase inferior, rica em FFP, é mais densa que a fase superior, rica em PEG. Houve um aumento das densidades das fases com a elevação da concentração dos constituintes dos sistemas (PEG e sal), sendo que o sistema que apresentou a maior diferença de densidade foi formado por 18% de PEG 1500 e 18 % FFP.

Sistemas contendo proteínas solúveis apresentaram um aumento mais pronunciado na diferença de densidade, o que pode ser atribuído à partição desigual de biomoléculas presentes no sistema [66].

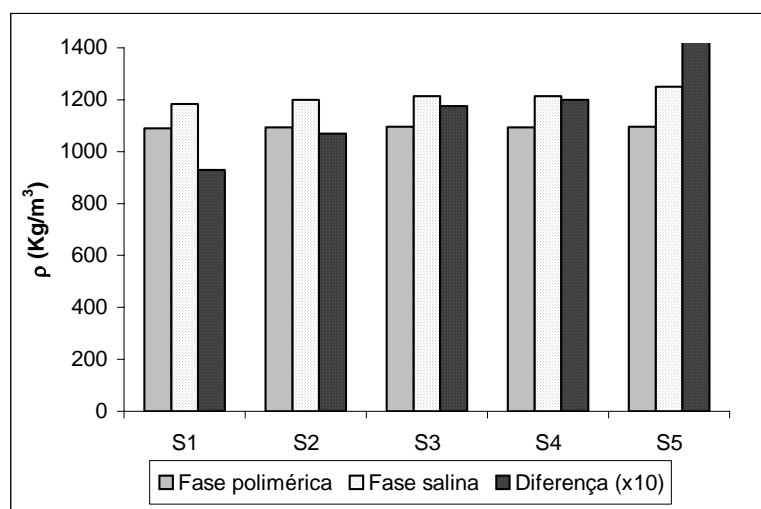


Figura 3 - Densidade das fases para SAB (%PEG 1500, %FFP). S1(14%,14%), S2(14%,16%), S3(14%,18%) S4(16%,16%), S5(18%,18%).

A baixa tensão interfacial (γ) de SAB poliméricos, de ($1,0 \times 10^{-4}$ a 0,1) mN/m, proporciona condições amenas para a extração de biomoléculas, como enzimas e células frágeis [142]. Por exemplo, SAB com diferentes concentrações de PEG e Dex apresentaram dados de tensão interfacial na faixa de ($1,5 \times 10^{-3}$ a 0,35) mN/m [36] e de (5×10^{-4} a 7×10^{-2}) mN/m [108]. Estes valores são relativamente baixos se comparados com sistemas de extração líquido-líquido convencional, compostos por solventes orgânicos, tais como hexano + água, glicerina + hexano e

tolueno + água cujos valores de tensão interfacial situam-se na faixa de (48,5; 34,9 e 35,7) mN/m, respectivamente [30].

Foram obtidos valores de tensão interfacial entre (0,05 a 0,121) mN/m para o SAB PEG + MD [91] e entre (0,28 a 1,01) mN/m para o SAB PEG + FFP [9]. Os autores observaram o aumento da tensão interfacial com o incremento da MM do PEG. ALBERTSSON [1], determinou para SAB polímero + sal, dados de tensão interfacial na faixa de (0,1 a 2,0) mN/m.

MISHIMA et al [86] avaliando a influência da temperatura e da MM do PEG sobre a tensão interfacial de SAB PEG + FFPdibásico, verificaram que o valor desta propriedade, entre $(0,98 \times 10^{-1}$ e 1,26) mN/m, aumentou tanto com a elevação da MM do PEG quanto com o aumento do comprimento da linha de amarração. O efeito da temperatura sobre a tensão interfacial foi insignificante. KIM e RHA [69], também para SAB PEG + FFP, relataram dados de γ variando entre $(1 \times 10^{-3}$ e 0,08) mN/m.

Com relação à viscosidade das fases de SAB, COIMBRA [27] obteve para sistemas 14 % PEG 1550 + 18% FFP (pH 7), valores de 17 cP e 2,6 cP para as fases polimérica e salina, respectivamente. GIRALDO-ZUÑIGA [38], para SAB 18% PEG 1500 + 18% FFP (pH 7), encontrou valores de 25 cP e 2,5 cP para as fases polimérica e salina, respectivamente. Deve-se notar que a viscosidade da fase polimérica é muito maior que a viscosidade da fase salina.

MACHADO [85], obteve para sistemas PEG + MD maiores viscosidades para a fase inferior, rica em MD que para a fase superior, rica em PEG, com diferenças da ordem de 80 cP. Verificou também que um aumento na MM do PEG provocou a elevação da viscosidade de ambas as fases, porém com maior impacto sobre a fase rica em MD. VENANCIO et al [135] relataram elevados valores de viscosidade da fase inferior, rica em HPS, em SAB PEG + HPS em relação aos valores da fase superior. Outros estudos envolvendo viscosidade e densidade de SAB, estão relacionados na Tabela 2. As viscosidades das fases também aumentam quando são incorporados aos sistemas a biomassa contendo os compostos a serem separados [66, 27].

Tabela 2 - Propriedades físicas de SAB

Sistema	Viscosidade (cP)		Densidade (kg/m ³)		Referência
	Fase superior	Fase inferior	Fase superior	Fase Inferior	
PEG + MgSO ₄	14,16 - 28,75	1,25 - 1,50	1071 - 1083	1115 - 1167	111
	17,7 - 153,2	1,77 - 2,97	1065 - 1076	1105 - 1105	17
PEG + FFP	7,19 - 19,88	1,86 - 2,77	1127 - 1150	1087 - 1089	66
PEG + HPS	10 - 11	195 - 298	1020 - 1022	1088 - 1107	135
PEG + MD	6,2 - 12,1	82,1 - 100	1012 - 1058	1059 - 1122	85
	8,06 - 20,6	15,9 - 66,0	1070,5 - 1082,9	1114,6 - 1174,7	103

5. APLICAÇÕES DOS SAB

Os SAB vem sendo empregados com muito sucesso na separação de diversas biomoléculas. Uma listagem de alguns trabalhos publicados pode ser consultada na Tabela 3.

Tabela 3 - Aplicações dos SAB

Composto	SAB	Referência
BSA	PEG + Dex	45
BSA e ovalbumina	PEG + Dex	89
Endopoligalacturonase	PEG + polivinil álcool	141
β -lg, antitripsina, caseína	PEG + FFP, PEG+ MgSO ₄	49
Amiloglucosidase	PEG + Na ₂ SO ₄	111, 96
Fumarase	PEG + FFP	92
Lisozima	PEG + FFP	56, 24
β -galactosidase, lisozima	PEG + Dex	84
α -amilase, bacillus subtilis	PEG + FFP	87
α -la, β -lg	PEG + FFP	23, 25, 38
Penicilina acilase	PEG + FFP	44
α -amilase, amiloglucosidase	PEG + FFP	114
<i>Escherichia coli</i>	PEG + FFP	66
BSA	PEG + HPS	134
Álcool desidrogenase	PEG + HPS	135
BSA	PEG + goma guar	133
BSA	HM + EOPO	62
BSA, lisozima	EO50PO50 + HM- EOPO	97
Acido láctico	EOPO + Dex	100, 101
BSA	PEG + GAC	110
Lignina	PEG + K ₂ CO ₃ , NH ₄ SO ₄	140
α -amilase	PEG + MgSO ₄	17
β -lg, BSA, Caseína	Dex + goma guar	120
Glutenina	PEG + Dex	130
BSA, lisozima	PEG + FFP	24
Xilanase	PEG + FFP	32
α -la, β -lg, BSA	PEG + MD	118
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	PEG + MD	85
Lisina, glisina	PEG +Dex	144

PE62: Co-polímero com 20% de oxido de etileno e 80% de oxido de propileno

A purificação de proteínas em grande escala empregando SAB, por exemplo, constitui uma técnica alternativa e economicamente viável, comparada com os processos tradicionais de purificação de biomoléculas. Algumas aplicações já testadas em escala piloto são mostradas na Tabela 4.

Tabela 4 - Extração de proteínas com SAB

Biomolécula	Sistema	Referência
Pululanase	PEG – Dex	52
Formaldeído desidrogenase	PEG – Dex	74
Fumarase	PEG – FFP	93
β - galactosidase	PEG – FFP	131
α -glucosidase	PEG – FFP	54
Superóxido dismutase	PEG – FFP	18
Lactato desidrogenase	PEG – aquafase®	126

6. DISTRIBUIÇÃO DE BIOMOLÉCULAS EM SAB

Materiais biológicos adicionados em SAB distribuem-se entre as duas fases, sem perda da atividade biológica. A relação entre as concentrações de certa biomolécula na fases 1 e 2 define o coeficiente de partição (K) em sistemas aquosos [1]:

$$K = C_1 / C_2 \quad (3)$$

em que

C_1 = concentração da biomolécula na fase 1 (mg/mL)

C_2 = concentração da biomolécula na fase 2 (mg/mL).

Existem outras relações para expressar o coeficiente de partição. Por exemplo segundo DIAMOND e SHU [33] pode ser definido pela expressão

$$K = K_{amb} + K_{est}. \quad (4)$$

em que K_{amb} e K_{est} representam, as contribuições dos fatores ambiental e de ordem estrutural respectivamente. Dentre os fatores ambientais estão consideradas propriedades do SAB, como tipo e concentração de sais, tipo, concentração e massa molecular do polímero, pH, temperatura e ligantes específicos. ALBERTSSON [1] propôs o modelo mais simples para o cálculo de K, desmembrando-o em:

$$\ln K = \ln K_{el.} + \ln K_{hidrof.} + \ln K_{hifil.} + \ln K_{conf.} + \ln K_{lig} \quad (5)$$

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

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

- Massa molecular (MM) do polímero

A MM 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 [14, 2]. 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. Como visto, por exemplo na Tabela 5, o coeficiente de partição do citocromo c foi pouco afetado (de 0,18 para 0,17) quando a MM da dextrana aumentou, isto é quando foram usados os sistemas PEG 6000 + Dex 40 e PEG 6000 + Dex 500. Já para a β -galactosidase, de maior MM, o coeficiente de partição aumentou de 0,24 para 1,59 nas mesmas condições. Esta tendência de comportamento também pode ser observada na Tabela 6 para diferentes MM de PEG + Dex 500. Polímeros com diferentes MM podem ser usados para otimizar a separação de proteínas de variados tamanhos [2].

Tabela 5- Efeito da MM da Dex sobre o K de proteínas com diferentes MM (SAB 6% PEG 6.000 + 8% Dex)

Proteína	MM (Da)	Dex 40	Dex 70	Dex 220	Dex 500	Dex 2000
Citocromo c	12 384	0,18	0,14	0,15	0,17	0,21
Ovalbumina	45 000	0,58	0,69	0,74	0,78	0,86
Albumina de soro bovino	69 000	0,18	0,23	0,31	0,34	0,41
Desidrogenase lática	140 000	0,06	0,05	0,09	0,16	0,1
Catalase	250 000	0,11	0,23	0,40	0,79	1,15
β -galactosidase	540 000	0,24	0,38	1,38	1,59	1,61
Fosfofructoquinase	800 000	0,01	0,01	0,01	0,02	0,03
Ribulose difosfato carboxilase	800 000	0,05	0,06	0,15	0,28	0,50

Fonte: ALBERTSSON et al [3]

Tabela 6- Efeito da MM do PEG sobre o K de proteínas com diferentes MM (SAB 8% Dex 500 + 6% PEG)

Proteína	MM	PEG 4000	PEG 6000	PEG 20000	PEG 40000
Citocromo c	12 389	0,17	0,17	0,13	0,12
Ovalbumina	45 000	1,25	0,85	0,50	0,50
Albumina de soro bovino	69 000	0,52	0,34	0,14	0,11
Desidrogenase lática	140 000	0,13	0,08	0,05	0,03
Catalase	250 000	0,82	0,38	0,16	0,10

Fonte: ALBERTSSON et al [3]

MACHADO [85], utilizando um sistema PEG + 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 4.000 para 8.000 Da provocou um decréscimo de 70 vezes no valor de K.

GIRALDO-ZUÑIGA et al [37], empregando SAB PEG + 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 o crescimento de K com a elevação da MM do PEG, exceto para PEG 8.000.

- 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 normalmente provoca, 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 [2].

SCHMIDT et al [113] verificaram que o aumento da concentração de PEG de 14% para 20% em um sistema PEG 4.000 + FFP aumentou em aproximadamente 5 vezes o K da α -amilase.

Na avaliação da partição de células microbianas em SAB PEG 4.000 + MD, MACHADO [85] observou que o aumento da concentração de PEG diminuiu 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.

- Potencial hidrogeniônico

O pH altera as cargas da superfície das proteínas e, conseqüentemente, o seu coeficiente de partição [80]. Um exemplo clássico é a desnaturação de proteínas devido à redução de pH. A

distribuição de proteínas desnaturadas em soluções líquidas é diferente daquela obtida em seu estado natural, por apresentarem área superficial significativamente maior que na forma nativa.

SCHMIDT et al [113], constataram o aumento de K da α -amilase de 0,7 para 20 com a elevação do pH de 5,3 para 9,5. Este efeito foi observado também por SARUBBO et al [110].

- Sais

A presença de sais em SAB polímero + polímero, é importante para o sucesso da partição de praticamente todas as espécies de moléculas e partículas celulares [10]. ALBERTSSON et al [2] estudaram com detalhes a influência da adição de diferentes tipos de sais sobre o K de proteínas em SAB PEG + Dex.

A adição de sais, em SAB poliméricos, em concentrações de (0,1 a 0,2) mol/L, gera uma diferença de potencial entre as fases, resultante da preferência dos íons salinos por uma das fases [14]. A presença de cátions e de ânions monovalentes diminuiu o K de proteínas carregadas negativamente nas ordens $\text{Li}^+ < \text{NH}_4^+ < \text{Na}^+ < \text{Cs}^+ < \text{K}^+$ e $\text{F}^- < \text{Cl}^- < \text{Br}^- < \text{I}^-$, respectivamente. Para proteínas carregadas positivamente a ordem acima é invertida. A presença de ânions divalentes fosfato, sulfato e citrato aumentaram o K da proteína relativo aos ânions monovalentes [2].

No caso de células microbianas, para sistemas PEG 400 + 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 [85].

HAN e LEE [47] observaram, para SAB PEG + Dex, que a incorporação de sais de fosfato ocasionou uma redução do K da BSA cuja superfície é carregada negativamente. No entanto o K da lisozima, que é carregada positivamente, aumentou com a adição de fosfato.

Para SAB salinos, HARRIS et al [49] constataram para sistemas PEG + sulfato de magnésio que os valores de K da β -lg, da caseína e da α -antitripsina (AAT) aumentaram com a elevação da concentração de NaCl. Este mesmo comportamento foi também observado por LU e TJERNELD [84] na partição de β -galactosidase.

- Carga dos polímeros

Polietilenoglicóis carregados ionicamente, têm sido usados para direcionar a partição de proteínas. Carregados positivamente, na forma de trimetilamina-PEG (TMA-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. PEG carregados negativamente apresentam uma tendência de atuação inversa [2].

- 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 [2]

HAN e LEE [48] ao empregarem um SAB PEG-palmitato + FFP na distribuição de *Bacillus subtilis* relataram que o microrganismo foi particionado preferencialmente para a fase superior, rica em PEG-palmitato.

BERGGREN et al [15] 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.

- 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 [14].

Os sistemas com constituição próxima da 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 [12, 127].

Para SAB PEG + MD, foi observado um aumento da inclinação das linhas de amarração com a elevação da temperatura do sistema [85]. O mesmo comportamento foi observado para sistemas PEG + sal [117]. 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.

7. PARTIÇÃO DE PROTEÍNAS POR AFINIDADE

Muitas proteínas apresentam interações únicas com pequenas moléculas denominadas ligantes. Estas interações facultam alterações na partição das proteínas levando a aumentos na seletividade do sistema. Este tipo de extração seletiva, chamada de partição por afinidade, que usa ligantes específicos adicionados em uma das fases do SAB ou imobilizados em um dos polímeros formadores do SAB tem sido bastante efetiva na separação de proteína e enzimas [61]. Usualmente somente uma fração do polímero que forma a fase é usada como transportador do ligante [61, 96]. As forças de ligações que ocorrem entre o ligante e a proteína, são basicamente as forças de Van der Waals, hidrofóbicas e eletrostáticas. A interação entre uma proteína e um ligante é usualmente mais complexa do que, por exemplo, a interação enzima-substrato [19].

A atuação do ligante sobre a partição da proteína pode ser observada por meio de mudanças relativas no valor de K da proteína. O coeficiente de partição, com a presença de ligantes, K^* , pode ser definido de acordo com a Equação (6):

$$K^* = K/K_{\text{aff}} \quad (6)$$

Na qual K_{aff} incorpora um fator quantitativo do efeito de partição por afinidade. A Tabela 7 apresenta uma lista de alguns ligantes usados na partição de proteínas por afinidade.

Tabela 7 – Ligantes usados na partição de proteínas por afinidade

Ligante	Proteína	Referência
Nucleotídeos	Desidrogenases, quinases	61
Azul de cibacron	Glucose-6-fosfato, Fosfofructoquinases	60, 41
Triazina	Dehidrogenases, quinases	59
Ácido palmítico	BSA	2, 61
APGP*	β -galactosidases	119
Amido	Glucoamilase	39
NADH	Formato desidrogenase	31
Triazina	Glutamato piruvato transminase	73
Triazina	Lactato desidrogenase	57
Triazina	Piruvatoquinase	73

*APGP: p-aminofenil 1-tio- β -D-galactopiranosídeo

SILVA et al [119] usando o ligante específico APGP, ligado ao PEG para purificar a β -galactosidase de *Kleuveromyces lactis*, obtiveram um índice de recuperação de 83% da enzima na fase superior, rica em PEG, do SAB PEG-APGP + FFP. O uso do ligante APGP aumentou em 1,6 vezes o fator de purificação da enzima.

GRIMONPREZ et al [41], verificaram para a distribuição da enzima fosfofrutoquinase em SAB PEG + Dex que a adição de azul de cibacron, usado como ligante, aumentou a partição da enzima na fase superior, rica em PEG.

8. BIOCONVERSÃO EXTRATIVA EM SAB

SAB tem sido usados também no processo de bioconversão extrativa de enzimas, células e organelas [8, 135]. O catalisador usado na bioconversão é retido em uma das fases e o produto gerado migra para a outra fase. Na grande maioria dos estudos, com diferentes SAB, o catalisador

biológico foi particionado para a fase inferior e o produto para a fase superior. Houve, no entanto, casos que em este modelo não foi seguido, ou seja o produto foi igualmente distribuído entre as fases [79]. A bioconversão extrativa em SAB pode ser conduzida de modo contínuo ou semicontínuo e integrada a outras técnicas de purificação como por exemplo com a ultrafiltração [122]. O uso de SAB integrado com uma unidade de ultrafiltração foi empregado tanto por LARSON et al [79] em uma linha de processamento para a conversão de amido a glucose quanto por TJERNELD et al [124] para conversão de celulose a açucares redutores. Em ambos os casos os açucares foram removidos da fase superior, rica em PEG, do sistema PEG + Dex por ultrafiltração.

A Figura 5 apresenta o esquema proposto por TJERNELD et al [124] para as linhas de conversão de celulose e de amido em glucose, em modo contínuo e em pequena escala. Os autores utilizaram um misturador-separador e uma unidade de ultrafiltração visando a reciclagem de PEG.

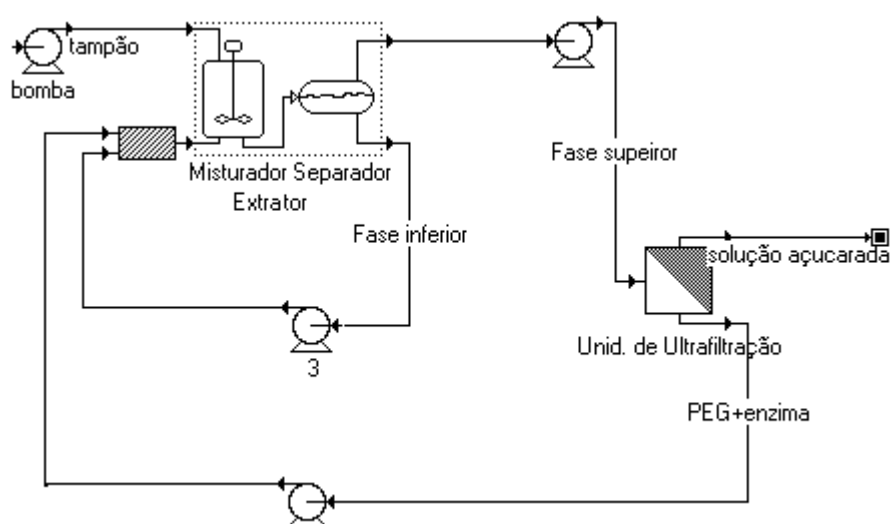


Figura 5 - Bioconversão de celulose em açucares [124].

Outro caso de bioconversão extrativa foi descrito por STRED'ANSKY et al [122], que estudaram a hidrólise de lactose por β -galactosidase em SAB PEG + Dex. Tanto as células de levedura quanto a enzima livre permaneceram em sua maioria na fase inferior, rica em Dex. Os carboidratos produzidos (glicose e galactose) e a lactose foram distribuídos igualmente entre as fases. A partição dos produtos aumentou com a elevação da MM e da concentração dos polímeros envolvidos.

A bioconversão extrativa em SAB permite o reaproveitamento dos catalisadores usados na bioconversão. Por exemplo, TJERNELD et al [124] conduziram a hidrólise enzimática da celulose em SAB, o que facilitou a reutilização da enzima sem perda da atividade biológica. WAN et al [138] converteram o fumarato em malato usando *Brevibacterium ammoniagenes*, obtendo

produtividade maior em SAB que pela técnica de imobilização de células. A Tabela 8 apresenta algumas aplicações envolvendo bioconversão em SAB.

Tabela 8 - Bioconversão em SAB

Bioconversão	Referência
Celulose em açúcares redutores	124
Amido em glucose	51
Lactose em glucose	90
Monosacrídeos em oligosacarídeos	13
Amido em etanol	77
Glucose em etanol	75
Glucose em α -amilase	7
Produção de celulose por <i>trichoderma reesei</i>	95
Produção de amilase por <i>bacillus subtilis</i>	6

9. RECICLAGEM DOS REAGENTES CONSTITUINTES DOS SAB

A quantidade de reagentes químicos consumida, tais como de sais e polímeros, pode determinar a competitividade de extrações com SAB em relação a outras técnicas de bioseparação. Por este fato, a possibilidade de reutilização dos constituintes das fases deve ser considerada ao se efetuar o escalonamento, pois os custos dos componentes das fases aumentam linearmente com a escala de produção [74].

A reciclagem de reagentes tem sido estudada basicamente para SAB compostos por PEG + sais [93, 105]. A reciclagem de PEG pode ser facilmente integrada ao processo, chegando a níveis de recuperação de (90 a 95)% [55]. O PEG pode ser diretamente reutilizado do final de uma etapa intermediária para a primeira etapa de um novo processo de extração [55], sendo esta alternativa a que parece ser economicamente viável [93]. A recirculação dos reagentes constituintes dos SAB pode reduzir os custos do processo, pela diminuição de gastos com reagentes e com o tratamento de efluentes. Segundo PAPAMICHAEL et al [93] em um processo de purificação da enzima fumarase, em duas etapas, a recirculação direta da fase superior da segunda extração para a primeira extração originou uma redução no custo dos reagentes de 43% para a operação descontínua e de 24% para operação contínua. A Figura 4 apresenta um esquema da linha de operação da segunda extração proposta pelos autores.

RITO-PALOMARES et al [104] obtiveram para SAB PEG + FFP uma redução de 25% no custo de reagentes, em operação contínua, com a reciclagem da fase superior rica em PEG durante a recuperação de levedura de cerveja. Verificaram ainda que a eficiência do processo de extração manteve-se inalterada por até 5 ciclos de recirculação.

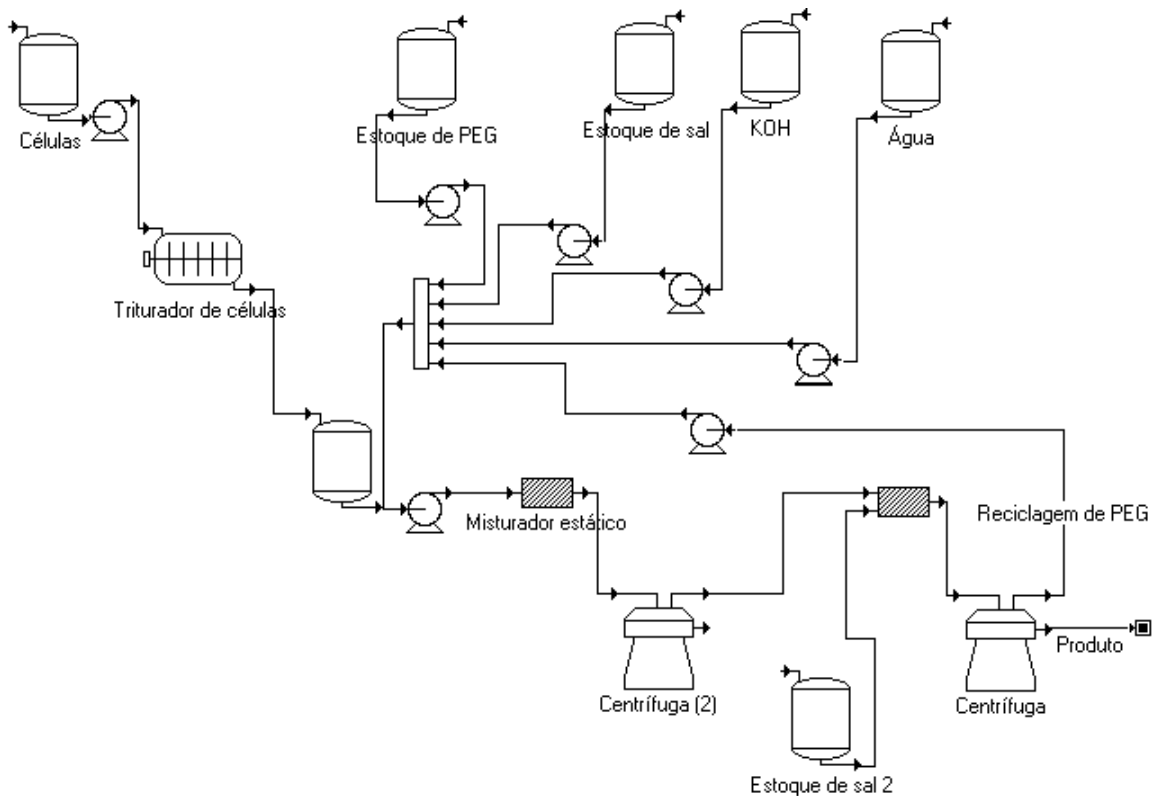


Figura 4 - Esquema de um processo de extração com recirculação de PEG [93].

O descarte de sais é geralmente mais problemático. Em sistemas contendo células, ácido nucléico, proteínas solúveis e insolúveis, a separação de sais da fase primária por técnicas de separação mecânica, tais como centrifugação ou ultrafiltração é muito difícil de ser conduzida eficientemente. A eletrodialise é considerada um método geral para a reciclagem de sais e para a dessalinização da fase rica em PEG [55]. Sais também foram recuperados usando uma mistura álcool alifático + sal + água [40]. Especificamente, para a separação de FFP, um resfriamento abaixo de 6 °C provocou a precipitação do sal, possibilitando a sua reutilização [93].

10. EQUIPAMENTOS CONVENCIONAIS DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO OPERADOS COM SAB

Para a aplicação de SAB na separação de biomoléculas, em larga escala, torna-se necessário o uso de equipamentos em operação contínua. Equipamentos disponíveis no mercado, com emprego na extração líquido-líquido convencional, podem ser utilizados para a extração com SAB. A Tabela 9 apresenta alguns tipos de extratores líquido-líquido que foram operados com SAB. Por exemplo, a coluna do tipo “spray”, como pode ser visto, é uma das mais estudadas por sua extrema simplicidade de construção e de operação. É basicamente constituída por um vaso cilíndrico, na base do qual se instala um distribuidor por onde é introduzida a alimentação da fase dispersa. O distribuidor tem, normalmente, o formato de uma placa com orifícios. As gotas formadas no distribuidor sobem ao longo da coluna, coalescendo no topo da mesma [63, 129].

Tabela 9- Extratores líquido-líquido operados com SAB

Tipo de extrator	Sistema	Referência
“Spray”	PEG + Dex	112
“Spray”	PEG + MD	103
“Spray”	PEG + Dex	106
“Spray”	PEG + Na ₂ SO ₄	106
“Spray”	PEG-HPS	134
“Spray”	PEG + Dex	94
Kunhi	PEG + FFP, PEG+Dex	53
Graesser	PEG + FFP	53, 58,25, 38
Discos rotativos	PEG + FFP	28, 102
York Sheibel	PEG + Na ₂ SO ₄	107
Podbielniac	PEG + Dex, PEG + FFP	53
Westfalia	PEG + FFP	92
Pratos perfurados	PEG + Na ₂ SO ₄	16
Pratos perfurados	PEG + Na ₂ SO ₄	46
Misturador-separador	PEG + FFP	53

BHAWSAR et al [16] estudaram a transferência de massa com a α -amiloglucosidase no sistema PEG + Na₂SO₄, em uma coluna de pratos perfurados. Observaram que o coeficiente de transferência de massa diminuiu com a elevação da concentração das fases e aumentou com a

elevação da vazão da fase rica em PEG, com o número de orifícios e o com o diâmetro dos orifícios nos pratos perfurados.

PORTO et al [102] usando uma coluna de discos rotativos (RDC) para a extração de BSA em SAB PEG + FFP verificaram que o coeficiente de transferência de massa para BSA foi independente da vazão da fase polimérica. Foi observado também que a fração retida da fase rica em PEG no interior do equipamento (“hold-up” da fase dispersa) aumentou com o incremento da vazão da fase polimérica.

Dentre os equipamentos de extração líquido-líquido disponíveis no mercado, o extrator do tipo Graesser (Raining Bucket Contactor) mostrou ser bastante apropriado ao manuseio de SAB [53, 26, 38].

COIMBRA et al. [25, 26] e GIRALDO-ZUÑIGA [38] analisaram o comportamento hidrodinâmico de um extrator Graesser de 100 cm de comprimento por 10 cm de diâmetro interno, operando com o SAB PEG + FFP. O equipamento foi utilizado para separação contínua das proteínas do soro de queijo α -la e β -lg, obtendo-se um resultado satisfatório em baixas velocidades de rotação. A figura 6 apresenta uma montagem experimental de um extrator Graesser.

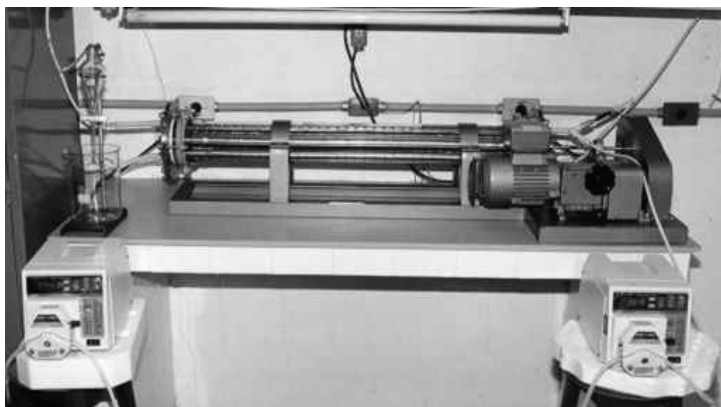


Figura 6 – Figura do Extrator Graesser [38]

11. CONCLUSÕES

A extração líquido-líquido de biomoléculas, usando Sistemas Aquosos Bifásicos apresenta vantagens como baixo custo do material, boa reprodutibilidade e fácil aumento de escala. A distribuição de um biocomposto em SAB pode ser analisada, através do coeficiente de partição (K) que é a razão entre as concentrações do biomaterial nas fases. O grau de separação pode ser alterado por meio da variação de alguns fatores, como a carga elétrica, a hidrofobicidade e a adição de ligantes bioespecíficos dentre outros. Os SAB apresentam um elevado potencial para a separação de biomoléculas, sendo economicamente competitivos na separação de proteínas e componentes celulares.

12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALBERTSSON, P. A . 1986. **Partition of cell and macromolecules**. New York: John Wiley, 346 p.
- [2] ALBERTSSON, P. A., JOHANSSON, G., TJERNELD, F. 1990. Aqueous Two-Phase Separations. In: Juan Asenjo. **Separation Processes in Biotechnology**.NY. p. 287-327.
- [3] ALBERTSSON, P. A., CAJARVILLE, A., BROOKS, D. E., TJERNELD, F. 1987. Partition of proteins in aqueous polymer two-phase systems and the effect of molecular weight of the polymer. **Biochemistry Biophysical Acta**. 926: 87-93.
- [4] ALRED, P.A., KOSLOWSKI, A., HARRIS, M., TJERNELD, F. 1994. Application of temperature-induced phase partitioning at ambient temperature for enzyme purification. **Journal of Chromatography**. 659: 289–298.
- [5] ALVES, J.G.L.F, CHUMPITAZ, L.D.A., FRANCO, T.T, MEIRELES, A.J.A. 2000. Partitioning of whey proteins, bovine serum albumin and porcine insulin in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**. 743: 235-239.
- [6] ANDERSON, E., JOHANSSON, A. C., HAHN-HAGERDAL B. 1985. α -amylase production in aqueous two-phase systems with bacillus subtilis. **Enzyme and Microbial Technology**. 7: 333-338.
- [7] ANDERSON, E., HAHN-HAGERDAL B. 1988. High concentration of PEG as a possible uncoupler of the proton motive force: α -amilase production with bacillus amyloliquefaciens in aqueous two-phase systems and PEG solutions. **Applied Microbiology Biotechnology**. 29: 329-336.
- [8] ANDERSON, E., HAHN-HAGERDAL B. 1990. Bioconversion in aqueous two-phase systems. **Enzyme and Microbial Technology**. 12: 242-254.
- [9] ARQUETE, D. A., COIMBRA, J. S. R., GIRALDO-ZUÑIGA, A. G., MINIM, L. A. 2000. Tensão interfacial para sistemas aquosos bifásicos polímero- polímero. Anais do **XVII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 2:6.9.
- [10] ASENJO, J. A. 1990. **Separation process in biotechnology**. New York: Marcell Dekker,Inc. 287p.
- [11] ASENJO, J. A., SCHMIDT, A. S., HACHEM, F., ANDREWS, B.A. 1994. Model for predicting the partition behavior of proteins in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography**. 668: 47–54.
- [12] BAMBERGER, S., BROOKS, D., SHARP, K., VAN ALSTINE, J., WEBBER, T. 1985. Preparation of phase systems and measurement of their physicochemical properties. In: WALTER, H., BROOKS D. AND FISCHER, D. (EDS). **Partitioning in aqueous two-phase systems: theory, methods, uses and applications to biotechnology**. New York: Academic Press, Inc. p.85-130.
- [13] BARTLETT, T. J., RASTALL, R. A., REES, N. H., ADLARD, M. W., BUCKE, C. 1992. The application of aqueous two-phase systems to oligosaccharide synthesis by α -mannosidase catalysed glycosyl transfer reactions. **Journal Chemistry Technology and Biotechnology**. 55: 73-78.

- [14] BASKIR, J. N., HATTON, T. A., SUTER, U. W. 1989. Protein partitioning in two-phase Aqueous polymer systems. **Biotechnology and Bioengineering**. 34: 541-558.
- [15] BERGGREN, K., JOHANSSON, H. O., TJERNELD, F. 1995. 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.
- [16] BHAWSAR, P. C. M., PANDIT, A. B., SAWANT S. B., JOSHI, J. B. 1994. Enzyme mass-transfer coefficient in a sieve-plate extraction column. **Chemical Engineering Journal**. 55:1-2.
- [17] BLAZQUEZ, G., CAMACHO, F., GONZALEZ-TELLO., ALARCÓN, F. J. 1998. Partition coefficients of α -amylase in aqueous two-phase systems PEG + $MgSO_4 \cdot 7H_2O + H_2O$ at 298 K. **Biochemistry Biophysical Acta**. 1379: 191-197.
- [18] BOLAND, M. J., HESSELINK, P. G., PAPAMICHAEL, N., HUSTTED, H. 1991. Extractive purification of enzymes from animal using aqueous two-phase systems. **Journal of Biotechnology**. 19 (1): 19-24.
- [19] BROCKLEBANK, M. P. 1987. Large scale separation and isolation of proteins. In: King and Cheetham Editors. **Food Biotechnology**. NY, p. 139-192.
- [20] CABEZAS Jr, H. 1996. Theory of phase formation in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**. 680:3-30.
- [21] CARLSSON, M., BERGGREN, K., LINSE, P., VEIDE, A., TJERNELD, F. 1996. Effects of fused tryptophan rich peptides to a recombinant protein a domain on the partitioning in polyethylene glycol-dextran and ucon-dextran aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography**. 756: 107-117.
- [22] CESI, V., NARODOSLAWSKY, M., MOSER, A. 1996. Equilibrium properties of poly(ethylene glycol)-Reppal PES-water system. **Chemistry Biochemical Engineering Quarterly**. 10 (4):183-187.
- [23] CHEN, J. P. 1992. Partitioning and separation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in peg/potassium phosphate two phase systems. **Journal Fer. Bioenging**. 73 (2):140-147.
- [24] CHEN, J., MA, G. X., LI, D. Q. 1999. HPCPC separation of proteins using polyethylene glycol-potassium phosphate aqueous two phase. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**. 29 (1): 371-383.
- [25] COIMBRA, J. R., TÖMMES, J., KULA, M. R. 1994. Continuous separation of whey proteins with aqueous two-phase systems in a graesser contactor. **Journal of Chromatography**. 668 (1): 85-94.
- [26] COIMBRA, J. R., TÖMMES, J., MEIRELLES, A. J., KULA, M.R. 1995. Performance of graesser contactor in the continuous extraction of whey proteins: Mixing, mass transfer and efficiency. **Bioseparation**. 5: 259-268.
- [27] COIMBRA, J. S. R. 1995. **Desempenho de um extrator tipo graesser na separação de proteínas do soro de queijo usando sistemas aquosos bifásicos**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 129p.

- [28] COIMBRA, J. S. R., MOJOLA, F., MEIRELLES, A. J. A. 1998. Dispersed phase hold-up in a perforated rotating disc contactor (PRDC) using aqueous two-phase systems. **Journal of Chemical Engineering of Japan**. 31 (2):277-280.
- [29] COLEBY, J. 1962. Apparatus for countercurrent treatment of immiscible fluids. **United States patent**, Nr. 3.017, 253.
- [30] CONTRERAS, P., OLTEANU, M. 2000. Interfacial tension measurement by rotating meniscus. **Colloids and Surfaces**. 170: 45-50.
- [31] CORDES, A., KULA, M. R. 1986. Process desing for large scale purification of formate dehydrogenase from candidad boidini by affinity partitioning. **Journal of Chromatography**.376: 375-384.
- [32] COSTA, S. A., PESSOA JR, A, ROBERTO, I. C. 1998. Xilanase Recovery: effect of extraction conditions on the aqueous two-phase systems using experimental desing. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 3: 70-72.
- [33] DIAMOND, A. D., HSU, J. T. 1989. Fundamental studies of biomolecules partitioning in aqueous two-phase systems. **Biotechnology and Bioengineering**. 34:1000–1014.
- [34] DISSING, U., MATTIANSSON, B. 1993. Poly(ethylenimine) as a phase-forming polymer in aqueous two-phase systems. **Biotechnology Applied Biochemistry**. 17: 15–21.
- [35] EDMOND, E., OGSTON, P. G. 1968. An approach to the study of phase separation in ternary aqueous systems. **Biochemistry Journal**. 109: 569-578.
- [36] FORCINITI, D., HALL, C., KULA, M, R. 1990. Interfacial tenson of polyethyleneglycol-dextrana-water systems: influence of temperature and polymer molecular weight. **Journal of . Biotechnology**. 16: 279-296.
- [37] GIRALDO-ZUÑIGA, A. D., COIMBRA, J. S.R., MINIM, L. A. 2001. Coeficientes de partição da α -lactoalbumina e β -lactoglobulina em sistemas aquosos bifásicos : influência da massa molecular do polímero. **Ciencia y Tecnologia de Alimentos**. 3 (2): 149-155.
- [38] GIRALDO-ZUÑIGA, A. D. 2000. **Sistemas aquosos polietilenoglicol-sal: separação de α -lactoalbumina e β -lactoglobulina do soro de queijo e hidrodinâmica em um extrator graesser**. Tese (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-Universidade Federal de Viçosa, Brasil, 87p.
- [39] GOUVEIA, T., KILIKIAN B, V. 2000. Bioaffinity extraction of glucoamylase in aqueous two-phase systems using starch as free bioligand. **Journal of Chromatography B**. 743: 241–246.
- [40] GREVE, A. and KULA, M-R.. 1991. Recycling of Salt from the Primary Bottom Phase of a Protein Extraction Process, **Journal of Chemistry Technology and Biotechnology**. 50: 27-42.
- [41] GRIMONPREZ, B., JOHANSSON, G. 1995. Liquid-liquid partitioning of some enzymes, especially phosphofructikinase, from *Saccharomyces cerevisiae* at sub zero temperature. **Journal of Chromatography B**. 68 (10): 55–63.
- [42] GROBMAN, C., ZHU, J., MAURER, G. 1993. Phase equilibrium studies on aqueous two-phase systems containing amino acids and peptides. **Fluid Phase Equilibria**. 82:275-282.

- [43] GROBMAN, C., TINTINGER, R., ZHU, J., GERD, M. 1998. Partitioning of low molecular combination peptides in aqueous two phase systems of poly(ethylene glycol) and dextran in the presence of small amount of K_2HPO_4/KH_2PO_4 buffer at 293k: experimental results and predictions. **Biotechnology and Bioengineering**. 60 (6):699-711.
- [44] GUAN, Y., WU, X. Y., TREFFRY, T. E., LILLEY, T. H. 1992. Studies on the isolation of penicillin acylase from *Escherichia coli* by aqueous two-phase partitioning. **Biotechnology and Bioengineering**. 40:517-524.
- [45] GUNDUZ, U. 2001. Optimization of bovine serum albumin partition coefficient in aqueous two-phase systems. **Bioseparation**. 9: 277-281.
- [46] HAMIDI, A., VAN BERLO, M., LUYBEN, K. C., VANDER WIELEN, A. M. 1999. Flooding characteristics of aqueous two-phase systems in a countercurrent sieve-plate column. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. 74: 244-249.
- [47] HAN, J. H., LEE, C. H. 1997. 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.
- [48] HAN, J. H., LEE, C. H. 1997. Effects of salts and poly(ethylene glycol)-palmitate on the partitioning of proteins and *Bacillus subtilis* neutral protease in aqueous two phase systems. **Colloids and Surfaces**. 9: 109-116.
- [49] HARRIS, D. P., ANDREWS, A.T., WRIGHT, G., PYLE, D. L. ASENJO, J. A. 1997. The application of aqueous two phase systems to the purification of pharmaceutical proteins from transgenic sheep milk. **Bioseparation**. 7: 31-37.
- [50] HASSINEN, C., KOHLER, K., VEIDE, A. 1994. Polyethylene glycol-potassium phosphate aqueous two-phase systems insertion of short peptide units into a protein and its effects on partitioning. **Journal of Chromatography**. 668: 121-128.
- [51] HAYASHIDA, K., KUNIMOTO, K., SHIRAIISHI, F., KAWAKAMI, K., ARAI, Y. 1990. Enzyme hydrolysis of soluble starch in a polyethylene glycol-dextran aqueous two phase systems. **J. Ferment. Bioeng.** 69: 240-243.
- [52] HUSTED, H., KRONER, K. H., MENGE, U., KULA, M. R. 1978. Procedure for the simultaneous large-scale isolation of pullulanase and 1,4- α glucan phosphorylase from *Klebsiella pneumoniae* involving liquid-liquid separations. **Biotechnology and Bioengineering**. 20 (6): 1989-2005.
- [53] HUSTED, H., KRONER, K. H., MENGE, U., KULA, M. R. 1980. Enzyme Purification by liquid-liquid extraction, **Enzyme Engineering**. 5: 45- 47.
- [54] HUSTED, H., KRONER, K. H., MENGE, U., KULA, M. R. 1985. Partition in aqueous two-phase systems, **Trends Biotechnology**. 3 (2):139-144.
- [55] HUSTED, H., KRONER, K.H. and PAPAMICHAEL, N. 1988. Continuous Cross-Current Aqueous Two-Phase Extraction from Biomass-Automated Recovery in Production Scale, **Process Biochemistry**. 23: 129-137.
- [56] ITO, Y., MATSUDA, K., MA, Y., QI, L. 1998. Toroidal coil counter-current chromatography study of the mass transfer rate of proteins in aqueous-aqueous polymer phase system. **Journal of Chromatography**. 802: 277-283.

- [57] JOELSSON, M., JOHANSSON, G. 1987. Sequential liquid-liquid extraction of some enzymes from porcine muscle using polymer bound triazine dyes. **Enzyme and Microbiology Technology**. 9: 233-237.
- [58] JOHANSSON, G., ANDERSSON, M. 1984. Liquid-liquid extraction of glycolytic enzymes from baker's yeast using triazine dye ligands. **Journal of Chromatography**. 291: 175-183.
- [59] JOHANSSON, G., ANDERSSON, M. 1984. Parameters determining affinity partitioning yeast enzymes using polymer-bound triazine dye ligands. **Journal of Chromatography**. 303: 39-51.
- [60] JOHANSSON, G., JOELSSON, M. 1985. Preparation of cibacron blue F3G-A (polyethylene-glycol in large scale for use in affinity partitioning, **Biotechnology and Bioengineering**. 27: 621-625.
- [61] JOHANSSON, G. 1998. Affinity partitioning of proteins using aqueous two-phase systems. In: Janson-Ryder Editors. **Protein Purification, principles, high resolution methods and application**. NY. 695p.
- [62] JOHANSSON, H. O., PERSSON, J., TJERNELD, F. 1999. Thermoseparating water- polymer system: A novel one-polymer aqueous two-phase system for protein purification. **Biotechnology and Bioengineering**. 66: 247-257.
- [63] JOSHI, J. B., SAWANT, S. B., RAGHAV-RAO, K. S. M., PATIL, T. A., ROSTAMI-JAFARABAD, K. M., SIDKAR, S. K. 1990. Continuous counter current two-phase aqueous extraction. **Bioseparation**. 3: 311-324.
- [64] JUSTIZ, O. H., LAFUENTE, R. F., TERRENI, M., GUIBAN, J. M. 1998. Use of aqueous two-phase systems for in situ extraction of water soluble antibiotics during their synthesis by enzymes immobilized on porous supports. **Biotechnology and Bioengineering**. 59: 73-79.
- [65] KABIRI-BADR, M., CABEZAS Jr, H. 1996. A thermodynamic model for the phase behavior of salt-polymer aqueous two-phase systems. **Fluid Phase Equilibria**. 115: 39-58.
- [66] KAUL, A., PEREIRA, R. A. M., ASENJO, J. A., MERCHUK, J. C. 1995. Kinetics of phase separation for polyethylene glycol-phosphate two-phase systems. **Biotechnology and Bioengineering**. 48: 246-256.
- [67] KANG, C.H., SANDLER, S. I. 1987. Phase behavior of aqueous two-polymer systems. **Fluid Phase Equil.** 38: 245-251.
- [68] KANG, C.H., SANDLER, S. I. 1988. Effects of polydispersity on the phase behavior of aqueous two-phase polymer systems. **Macromolecules**. 21: 3088-3091.
- [69] KIM, C. W., RHA, C. Y. 2000. Interfacial tension of polyethylene glycol/potassium phosphate aqueous two phase systems. **Phys. Chem. Liquid**. 38: 25-43.
- [70] KIM, C., RHA, C. 2000. Phase separation of polyethylene glycol/salt aqueous two-phase systems. **Phys. Chem. Liquid**. 38: 181-191.
- [71] KING, R. S., BLANCH, H. W., PRAUSNITZ, J. M. 1988. Molecular thermodynamics of aqueous two-phase systems. **AIChE. Journal**. 34: 1585-1587.

- [72] KONDO, A., URABE, T., HIGASHITANI, K. 1994. Bioconversions in an aqueous two-phase system using enzymes immobilized on ultrafine silica particles. **Biotechnology Progress**. 77: 700-703.
- [73] KOPPERSCHLAGER, G., LORENZ, G., USBECK, E. 1983. Affinity partitioning in aqueous two-phase systems to the investigation of triazine dye interactions. **Journal of Chromatography**. 259: 97-105.
- [74] KRONER, K. H., HUSTED, H., KULA, M. R. 1994. Evaluation of crude dextrana as phase forming polymer for the extraction of enzymes in aqueous two-phase systems in large scale. **Biotechnology and Bioengineering**. 24: 1015-1045.
- [75] KUHN, I. 1980. Alcoholic fermentation in aqueous two-phase systems. **Biotechnology and Bioengineering**. 22: 2393-2398.
- [76] KULA, M. R., KRONER, K. H., HUSTED, H. 1982. Purification of enzymes by liquid-liquid extraction. **Adv. Biochem. Engn.** 24: 73-118.
- [77] LARSSON, M., MATTIASSON, B. 1984. Novel process technology for biotechnological solvent production. **Chem. Ind.** 12: 428-431.
- [78] LARSSON, M., MATTIASSON, B. 1988. Characterization of aqueous systems based on polydisperse phase forming polymers: enzymatic hydrolysis of starch in PEG-starch two-phase systems. **Biotechnology and Bioengineering**. 31: 979-983.
- [79] LARSSON, M., ARASARATNAM, V., MATTIASSON, B. 1989. Integration of bioconversion and downstream processing-starch hydrolysis in an aqueous two-phase systems. **Biotechnology and Bioengineering**. 33: 558-566.
- [80] LEHNINGER, A. L. 1976. **Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blucher, p.126-145.
- [81] LI, M., ZHU, Q. Z., MEI. 1997. Partitioning of amino acids by aqueous two-phase systems combined with temperature-induced phase formation. **Biotechnology Progress**. 13 (1): 105-108.
- [82] LI, M., ZHU, Q. Z., WU, Y., LIN D. 1998. Measurement of phase diagrams for new aqueous two-phase systems and prediction by a generalized multicomponent osmotic virial equation. **Chemical Engineering Science**. 53 (15):2755-2767.
- [83] LI, C., FAN, O, Y., BAI, J. H. 2000. Extractive cultivation of *Lactococcus lactis* using a polyethylene glycol/MgSO₄ center dot 7H₂O aqueous two-phase system to produce nisin. **Biotechnology Letters**. 22 (10): 843-847.
- [84] LU, M., TJERNELD, F. 1997. Interaction between tryptophan residues and hydrophobically modified dextran effect on partitioning of peptides and proteins in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography**. 766: 99-108.
- [85] MACHADO, F. L. C. 1999. **Equilíbrio de fases para sistemas aquosos bifásicos (SAB) compostos por polietilenoglicol - maltodextrina - água**. Tese (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)- Universidade Federal de Viçosa, Brasil, 87p.
- [86] MISHIMA, K., MATSUYAMA, K., EZAWA, W., TARUTA, Y., TAKARABE, S., NAGATANI, M. 1998. Interfacial tension of aqueous two phase systems containing poly(ethylene glycol) and dipotassium hydrogenphosphate. **Journal of chromatography B**. 711:313-318.

- [87] MISTRY, S. L., KAUL, A., MERCHUK, J. C., ASENJO, J. A. 1996. Mathematical modelling and computer simulation of aqueous two-phase continuous protein extraction. **Journal of Chromatography**. 741: 151-163.
- [88] MONTEIRO, F. E. S. 2001. **Equilíbrio de fases em sistemas aquosos bifásicos poliméricos**. Viçosa, MG: UFV, 2001. Tese (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-Universidade Federal de Viçosa, Brasil, 99 p.
- [89] NERLI, B. B., ESPARIZ, M., PICÓ, G. A. 2001. Thermodynamic study of forces involved in bovine serum albumin and ovalbumin partitioning in aqueous two-phase systems. **Biotechnology and Bioengineering**. 72: 468-474.
- [90] NGUYEN, A. L., GROTHE, S., LUONG, H. T. 1988. Application of pullulan in aqueous two-phase systems for enzyme production, purification and utilization. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 27: 341-346.
- [91] OLIVEIRA, C. C., COIMBRA, J. S. R., GIRALDO-ZUÑIGA, A. D., MINIM, L. A. 2000. Sistemas aquosos polímero-sal: dados de tensão interfacial. Anais do **XVII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 2:6.7.
- [92] PAPAMICHEL, N., BORNER, B., HUSTEDT, H. 1991. Continuous aqueous phase extraction of proteins: automated on-line monitoring of fumarase activity and protein concentration. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. 50: 457-467.
- [93] PAPAMICHAEL, N., BOERNER, B., HUSTED, H. 1992. Continuous aqueous phase extraction of proteins: Automated processing and recycling of process chemicals. **J. Chem. Tech. Biotechnol.** 54 (1): 47-55.
- [94] PATIL, T. A., ROSTAMI-JAFARABAD, K. SAWANT, S. B., JOSHI, J. B. 1991. Enzyme mass transfer coefficient in aqueous two-phase systems using a packed bed extraction column. **Can. J. Chem. Eng.** 69: 548-556.
- [95] PERSSON, J., TJERNELD, F., HAHN-HAGERDAL, B. 1984. Semicontinuous cellulase production in a new aqueous two-phase system using with *Trichoderma reesei* Rutgers C30. **Enzyme Microbiology and Technology**. 6: 415-418.
- [96] PERSSON, L. O., OLDE, BJORN. 1988. Synthesis of atp-polyethylene glycol and Atp-dextran and their use in the purification of phosphoglycerate kinase from spinach chloroplast using affinity partitioning. **Journal of Chromatography**. 457: 183-193.
- [97] PERSSON, J., JOHANSSON, H.O., TJERNELD, F. 1999. Purification of protein and recycling of polymers in a new aqueous two-phase system using two thermoseparating polymers. **Journal of Chromatography**. 864: 31-48.
- [98] PERSSON, J., KAUL, A., TJERNELD, F. 2000. Polymer recycling in aqueous two-phase extractions using thermoseparating ethylene oxide-propylene oxide copolymers. **Journal of Chromatography B**. 743: 115-126.
- [99] PIETRUSZKA, N., GALAEV, I. YU., KUMAR, A., BRZOZOWSKI, Z. K., MATTIASSON, B. 2000. New polymers forming aqueous two-phase polymer systems. **Biotechnology Progress**. 16: 408-415.
- [100] PLANAS, J., VARELAS, V., TJERNELD, F., HAHN-HAGERDAL, B. 1998. Amine-based aqueous polymers of the simultaneous titration and extraction of lactic acid in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**. 711(1): 265-275.

- [101] PLANAS, J., KOZLOWSKI, A., HARRIS, J. M., TJERNELD, F., HAHN-HAGERDAL, B. 1999. Novel polymer-polymer conjugates for recovery of lactic acid by aqueous two-phase extraction. **Biotechnology and Bioengineering**. 66 (4): 211-218.
- [102] PORTO, A. L. F., SARUBBO, L. A., LIMA, J. L., AIRES-BARROS, M. R., CABRAL, J. M. S., TAMBOURGI, E. B. 2000. Hydrodynamics and mass transfer in aqueous two-phase protein extraction using a continuous perforated rotating disc contactor. **Bioprocess Engineering**. 22 (3): 215-218.
- [103] RAGHAV-RAO, K. S. M. S., SZLAG, D., SIKDAR, S. K., JOSHI, J. B., SAWANT, S. B. 1991. Protein extraction in a column using a polyethylene glycol-maltodextrin two-phase polymer systems. **Chem. Eng. J.** 46: 75-81.
- [104] RITO-PALOMARES, M., HUDDLESTON, J. G., LYDDIATA, A. 1994. PEG-phosphate aqueous two-phase partitioning polymer recycling in practical implementation. **Trans I. Chem.** 72: 11-13.
- [105] RITO-PALOMARES, M., NEGRETE, A., ENRIQUE, G., SERRANO-CARREON, L. 2000. Aroma compounds recovery from mycelial cultures in aqueous two-phase processes. **Journal of Chromatography B**. 743: 403-408.
- [106] ROSTAMI –JAFARABAD K., SAWANT, S.B., JOSHI, J.B., SIKDAR, S. K. 1992. Enzyme and protein mass transfer coefficient in aqueous two-phase systems. Spray extraction columns. **Chem. Eng. Sci.** 47: 57-68.
- [107] ROSTAMI –JAFARABAD K., PATIL, T. A., SAWANT, S.B., JOSHI, J. B. 1992. Enzyme and protein mass transfer coefficient in aqueous two-phase systems. Yor-Scheibel extraction column. **Chem. Eng. Sci.** 47: 69-73.
- [108] RYDÉN, J AND ALBERTSSON, P.A. 1971. Interfacial Tension of Dextran-Polyethylene Glycol-Water Two Phase Systems, **J. Coll. Interf. Sci.** 37:219-222.
- [109] SARMENTO, M. J., PIRES, M. J., CABRAL, J. M. S. 1994. Liquid-liquid extraction of a recombinant protein, cytochrome b₅, with aqueous two phase systems of polyethylene glycol and potassium phosphate salts. **Journal of Chromatography**. 668: 117-120.
- [110] SARUBBO , L. A., OLIVEIRA , L. A., PORTO , A. L. F., DUARTE , H. S., CARNEIRO-LEAO, A. M. A. LIMA-FILHO , J. L., CAMPOS-TAKAKI, G. M., TAMBOURGI, E. B. 2000. New aqueous two-phase system based on cashew-nut tree gum and poly(ethylene glycol). **Journal of Chromatography B**. 743: 79-84.
- [111] SAVE, S. V., PANGARKAR, V. G., KUMAR, S. V. 1993. Intensification of mass transfer in aqueous two-phase systems. **Biotechnology and Bioengineering**. 41:72-78.
- [112] SAWANT, S. B., SIKDAR, S. K., JOSHI, J. B. 1990. Hydrodynamics and mass transfer in two-phase aqueous extraction using spray columns. **Biotechnology and Bioengineering**. 36: 109-115.
- [113] SCHMIDT, A. S., VENTON, A. M., ASENJO, J. A. 1994. Partitioning and purification of α -amylase in aqueous two-phase systems. **Enzyme and Microbial Technology**. 16: 131-142.
- [114] SCHMIDT, A. S., ANDREWS, B. A., ASENJO, J. A. 1996. Correlations for the partition behavior of proteins in aqueous two-phase systems: effect of overall protein concentration. **Biotechnology and bioengineering**. 50: 617-626.
- [115] SMITH, J. M., VAN NESS, H. C., ABBOTT, M. M. 1996. **Introdução à termodinâmica da engenharia química**. Quinta edição. McCraw-Hill, Inc, p. 697.

- [116] SEBASTIÃO, M. J., CABRAL, J. M. S., BARROS, M. R. 1994. Partitioning of recombinant *fusarium solani pisi cutinase* in polyethylene glycol-aqueous salt solution two-phase systems. **Journal of Chromatography**. 668: 139-144.
- [117] SILVA, L. H. M. 2000. **Equilíbrio de fases em sistemas aquosos bifásicos: polímero/polímero e polímero/sal**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 113p.
- [118] SILVA, L. H. M., MEIRELLES, A. J. A. 2000. Bovine serum albumin, α -lactalbumin and β -lactoglobulin partitioning in polyethylene glycol/maltodextrin aqueous two phase systems. **Carbohydrate Polymers**. 42: 279-282.
- [119] SILVA, M.A.E., PELLOGIA, C., PIZA, F. A.T., FRANCO, T. T. 1997. Purification of three different microbial β -galactosidase by partitioning in aqueous two phase systems. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 17 (3): 219-223.
- [120] SIMONET, F., GARNIER, C., DOUBLIER, J. L. 2000. Partition of proteins in the aqueous guar/dextran two-phase system. **Food Hydrocolloids**. 14: 591-600.
- [121] SINHA, R., SINGH, S. P., AHMED, S., GARG, S. K. 1996. Partitioning of *Bacillus alkaline* protease in aqueous two-phase systems. **Bioresource Technology**. 55:163-166.
- [122] STRED'ANSKY, M., TOMASKA, M., TOMASKA, A., RTURDIK, E. 1994. Lactose hydrolysis in an aqueous two-phase systems by whole-cell β -galactosidase of *kluveromyces marxianus*: partition and separation characteristics. **Journal of Chromatography**. 668: 179-183.
- [123] SZLAG, D.C., GIULIANO, K.A. 1988. A low cost aqueous two-phase systems for enzyme extraction. **Biotech. Techniques**. 4: 277-282.
- [124] TJERNELD, F., PERSSON, I., ALBERTSSON, P. A., HAHN-HAGERDAL, B. 1985. Enzymatic hydrolysis of cellulose in aqueous two-phase systems. **Biotechnology and Bioengineering**. 27: 1044-1050.
- [125] TJERNELD, F., BERNER, S., CAJARVILLE, A., JOHANSSON, G. 1986. New aqueous two-phase system based on hydroxypropyl starch useful in enzyme-purification. **Enzyme and Microbial Technology**. 8 (7): 417-423.
- [126] TJERNELD, F., JOHANSON, G., JOELSSON, M. 1987. Lactate dehydrogenase on large-scale. **Biotechnology and Bioengineering**. 30: 809-816.
- [127] TJERNELD, F., JOHANSON, G. 1990. Aqueous two-phase systems for biotechnical use. **Bioseparation**. 1: 225-263.
- [128] TJERNELD, F. 1992. Aqueous two-phase partitioning on an industrial scale. In: Harris, J. Editor. **Poly(ethyleneglycol)chemistry: biotechnical and biomedical applications**. Plenum Press, 423p.
- [129] TREYBAL, R. E. 1968. **Extracción en fase líquida**. Mexico: UTEHA, 729 p.
- [130] TRUUST, H., JOHANSSON, G. 1996. Fractionation of wheat proteins by counter-current distribution using aqueous two-phase systems containing propionic acid. **Journal of Chromatography B**. 680: 71-80.
- [131] VEIDE, A., SMEDS, A. L., ENFORS, S. 1983. A process for large scale isolation of β -galactosidase from *E.coli* in aqueous two-phase systems. **Biotechnology and Bioengineering**. 25: 789-1800.

- [132] VENÂNCIO, A., TEIXEIRA, J. A., MOTA, M. 1993. Evaluation of crude hydroxypropyl starch as a bioseparation aqueous-phase-forming polymer. **Biotechnology Progress**. 9 (6): 635-639.
- [133] VENÂNCIO, A., ALMEIDA, C., DOMINGUES, L., TEIXEIRA, J. A. 1995. Protein partition on a derivative guar gum based aqueous two-phase system. **Bioseparation**. 5 (5): 253-258.
- [134] VENÂNCIO A, TEIXEIRA, J. A. 1995. Protein mass-transfer studies on a spray column using the peg-reppal pes 100 aqueous 2-phase system. **Bioprocess Engineering**. 13(5): 251-255.
- [135] VENÂNCIO, A., ALMEIDA, C., TEIXEIRA, J. A. 1996. Enzyme purification with aqueous two-phase systems: Comparison between systems composed of pure polymers and systems composed of crude polymers. **Journal of Chromatography B**. 680: 131-136.
- [136] VIDEIRA, M., BARROS, M. R. A. 1994. Liquid-liquid extraction of clavulanic acid using an aqueous two-phase systems of polyethylene glycol and potassium phosphate. . **Journal of Cromatography**. .668: 237-240.
- [137] WALTER, H., BROOKS, D. E., FISHER, D. **Partitioning in Aqueous Two-Phase systems**. Academic Press, N.Y. 1985.
- [138] WAN, Y. L., HUSTED, H., KULA, M. R. 1988. Partition of *brevibacterium ammoniagens* cells in an aqueous two phase systems and their use for the conversion of fumarase. **Biotechnology and Biochemistry**. 10: 173-182.
- [139] WIEGEL, D., RITCHER, O., ARNOLD, K. 1994. Partitioning of chemically modified low-density lipoprotein in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography**. 668: 107-116.
- [140] WILLAUER, H. D., HUDDLESTON, J. G., LI, M., ROGERS. R, D. 2000. Investigation of aqueous biphasic systems for the separation of lignins from cellulose in the paper pulping process. **Journal of Chromatography B**. 743: 127-135.
- [141] WU, Y., PEREIRA, M., VENÂNCIO, A., TEIXEIRA, J. 2001. Separation of endopolygalacturonase using aqueous two-phase partitioning. **Journal of Chromatography**. 929: 23-29.
- [142] ZASLAVSKY, B. Y. 1992. Bioanalytical applications of partitioning in aqueous polymer two-phase systems. **Analytical Chem**. 15: 765-773.
- [143] ZASLAVSKY, B. Y. 1995. **Aqueous two phase partitioning**. New York: Marcel Dekker, 696p.
- [144] ZASLAVSKY, A., GULYAEVA, N., ZASLAVSKY, B. 2000. Peptides partitioning in an aqueous dextran-polyethylene glycol two phase systems. **Journal of Chromatography B**. 743: 271-279.

AGRADECIMENTOS:

Os autores agradecem ao CNPq/PADCT II/QEQ (62.0167/97) e à FAPEMIG pelo suporte financeiro e à CAPES/PEC-PG pela concessão da bolsa de estudo de Abraham Damian Giraldo Zuñiga.

PROPRIEDADES FUNCIONAIS E NUTRICIONAIS DAS PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE

Functional and Nutritional Properties of Whey Proteins

Abraham D. Giraldo-Zuñiga
Jane S. Reis Coimbra
José Carlos Gomes
Luis Antonio Minim
Edwin E. Garcia Rojas.

Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), Universidade Federal de
Viçosa (UFV), CEP 36571 –000 – Viçosa - MG, Brasil.

RESUMO

No passado o soro de leite era basicamente empregado para alimentação animal. Hoje o uso de concentrados e isolados protéicos do soro é abundante em diferentes setores da indústria de alimentos, sendo adicionado em produtos cárneos, de panificação, na fortificação de cereais, bebidas nutricionais, queijos, produtos farmacêuticos, na microencapsulação de lipídeos do leite e em produtos extrusados a base de milho, batata e arroz, dentre outros. O aumento da sua utilização na indústria de alimentos deve-se ao fato das proteínas do soro constituírem o maior grupo de ingredientes funcionais, que apresentam capacidade para formação de espumas, de gelificação, emulsificação e de retenção de água, além de excelentes propriedades nutricionais . Esta revisão aborda considerações sobre as proteínas do soro de leite, as suas principais propriedades funcionais, biológicas e nutricionais assim como suas aplicações na área alimentícia.

Palavras chave: Soro de leite, proteínas, propriedades funcionais, propriedades nutricionais.

1. Introdução

O soro de leite é um subproduto da indústria de queijos, de cor amarelo-esverdeada, obtido pela coagulação do leite. O seu sabor, ligeiramente ácido ou doce, e a sua composição dependem do tipo e do processo de fabricação do

queijo, respectivamente. A composição do soro é de aproximadamente 93% de água, 5% de lactose, 0,9% de proteínas, 0,3% de gordura, 0,2% de ácido láctico e pequenas quantidades de vitaminas (BEM-HASSAN e GHALY, 1994).

A produção mundial do soro de leite é de aproximadamente 120 milhões de toneladas anuais (ANUALPEC, 2001), o que gera em torno de 720.000 toneladas de proteínas. No Brasil estes números são de aproximadamente 3 milhões de toneladas de soro e 240 mil kg de proteínas, o que justifica o interesse crescente na utilização comercial deste subproduto, embora o aumento da produção de soro de leite cause sérios problemas de poluição, quando este é descartado diretamente no solo ou em leitos de rios (FRIEDMAN, 1975).

Com o correr dos anos, o soro de leite deixou de ser processado somente para sua simples comercialização evoluindo para sua transformação em uma variedade de produtos com valor agregado muito superior ao do soro *in natura*. Em particular os concentrados protéicos de soro (WPC), têm mercado assegurado por conferirem excelentes propriedades funcionais e valor nutricional aos variados produtos alimentícios aos quais podem ser adicionados. A utilização de tecnologias não convencionais no processamento do soro aumentam a faixa de aplicação e o valor comercial dos WPC. A ultrafiltração, microfiltração, nanofiltração e osmose reversa dentre outras permitem remover certos componentes do soro líquido que afetam desfavoravelmente suas propriedades funcionais, como lipídios, lactose, proteínas insolúveis e microrganismos (HANEMAAIJER, 1985).

A presença de proteínas no soro torna-o um material adequado para uso na alimentação humana. Estas proteínas são compostas por aminoácidos essenciais em proporções equilibradas e têm uma alta digestibilidade (RENNER, 1989; TOSI et al., 1997).

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

2. Propriedades funcionais dos produtos de soro

O termo “funcionalidade” tem sido aplicado para se referir às propriedades não-nutritivas que conferem aos alimentos maior conveniência no manuseio, melhor aparência na apresentação e melhor aceitação pelos consumidores. A maioria das propriedades funcionais influenciam o caráter sensorial de um alimento, em especial a textura (SGARBIERI, 1998). As proteínas do soro estão sendo usadas em uma grande variedade de alimentos e constituem o maior grupo de ingredientes funcionais, com capacidade para formação de espumas, gelificação, emulsificação e capacidade de retenção de água, além das propriedades nutricionais (MORR e HÁ, 1993; IBANOGLU e KARATAS, 2001) .

2.1. Solubilidade

A solubilidade das proteínas é determinada por três fatores principais: grau de hidratação, densidade e distribuição de cargas ao longo da cadeia e presença de substâncias não-protéicas como fosfatos , carboidratos e lipídios, que podem apresentar efeito estabilizante. Para que uma proteína se solubilize, deve interagir com o solvente por meio de pontes de hidrogênio, dipolo-dipolo, e interações iônicas. A solubilidade é função principalmente do pH, força iônica, tipo de solvente e temperatura (FENNEMA, 1993). A insolubilidade completa das proteínas produz um precipitado, que ocorre quando várias moléculas do polipeptídeo se aproximam de tal forma, que produzem agregados de proteína suficientemente grandes, visíveis a olho nú e que podem ser centrifugados em baixa força. Estes agregados são formados por ajuste do pH no ponto isoelétrico da proteína, com a adição de sal, uso de certos solventes ou combinação destes com a temperatura (ARAÚJO, 1999). Em valores de pH superiores ou inferiores ao do ponto isoelétrico, a proteína apresenta cargas positivas ou negativas e as moléculas de água podem interagir com estas cargas, contribuindo assim para a solubilização (FENNEMA, 1993).

Do ponto de vista prático, os dados sobre as características de solubilidade são muito úteis para determinar as condições ótimas de extração e purificação de proteínas bem como proporciona igualmente um bom índice para as possíveis aplicações dos ingredientes protéicos frente a diferentes condições de processamento.

As proteínas de soro de leite são altamente solúveis, especialmente quando comparadas ao caseinato de sódio e à proteína da soja (FENNEMA, 1993). A solubilidade é uma propriedade funcional determinante para produtos fluidos e semifluidos.

Em bebidas prontas para ingestão, uma adequada solubilidade dos compostos protéicos evita a floculação ou sedimentação protéica, melhorando tanto a aparência quanto a textura do produto. Em sopas e molhos prontos, a ocorrência de coagulação, sedimentação ou separação associada à presença de proteínas insolúveis é altamente indesejável.

No leite, bem como em bebidas com sabor de chocolate, baunilha ou café, um pH neutro produz as melhores características de sabor. Tanto as caseínas quanto as proteínas de soro são solúveis nestes sistemas alimentares e a escolha entre estas duas alternativas é feita em função de outras propriedades, tais como valor nutritivo, sabor e custo. Em refrigerantes de fruta e do tipo cola ou ainda em misturas de sucos de fruta, um pH ácido realça o sabor. Enquanto as proteínas de soro são solúveis em soluções ácidas, a proteína de soja e as caseínas tendem a precipitar neste meio.

Em testes com concentrados protéicos de soro, sem pectina e com pectina, pode ser observado a real influência do pH da solução sobre a solubilidade das proteínas. A Tabela 1 mostra os percentuais de solubilidade para 2 diferentes valores de pH.

Tabela 1* – Solubilidade de Concentrado protéico de soro (WPC) e mistura de WPC-pectina a 60 °C e diferente pH.

	Solubilidade (%)	
	pH 4,6	pH 7,0
WPC	74,2	99,0
WPC-Pectina	78,9	89,1

(*Mishra et al. (2001))

2.2. Retenção de água e viscosidade

A capacidade de retenção de água envolve uma interação entre a proteína, ou alimento protéico, com a água. A maior ou menor afinidade da proteína para com a água também influencia outras propriedades como textura, viscosidade,

gelificação e emulsificação. A atração hidrofílica pode ser medida em termos do grau de hidratação (massa de água/g de proteína) e da habilidade do produto para captar água espontaneamente (esponjamento). Os termos mais freqüentes encontrados na literatura para se referir à capacidade de uma proteína, ou alimento protéico, de absorver e de reter água são capacidade de ligar água, de reter água, de absorver água (SGARBIERI, 1996).

O fator de principal influência sobre o comportamento viscoso dos fluídos protéicos é o diâmetro aparente das moléculas (ou partículas dispersas). Este diâmetro depende: a) das características intrínsecas da molécula protéica, tais como massa molecular, tamanho, volume, estrutura, assimetria, cargas elétricas e facilidade de deformação. Estas características podem ser modificadas por fatores ambientais como por exemplo o pH, a força iônica e a temperatura (DEMETRIADES e McCLEMENTS, 2000, BHARGAVA e JELEN, 1995); b) das interações proteína-solvente, que afetam o enchimento e a solubilidade e c) das interações proteína-proteína, que determinam o tamanho dos agregados. A existência de interações proteína-lipídio também podem ter um impacto significativo sobre as propriedades reológicas do sistema (PATINO et al., 2000).

BOURAOUI et al. (1997) estudando a reologia de uma pasta composta de surimi de salmão, sal e WPC concluíram que a adição de WPC contribuiu para melhorar as propriedades reológicas da pasta cujo comportamento foi o de um fluido não newtoniano. Um outro estudo das propriedades reológicas de géis formado com WPC e β -lg, revelou que o WPC participou na formação e no reforço dos géis produzidos com β -lg. As propriedades mecânicas do gel formado com a mistura de WPC e β -lg melhoraram, evidenciando um efeito sinérgico, quando a razão da mistura foi de 2:1 (β -lg:WPC). Observou-se também que um aumento da fração de WPC na mistura levou a um decréscimo na viscosidade do gel da mistura (RENARD et al., 1999).

BHARGAVA e JELEN (1995) avaliando o efeito do congelamento sobre as propriedades funcionais das proteínas de soro relataram que o congelamento de soluções de WPC não afetou significativamente a viscosidade da solução e a firmeza do gel formado. Os autores concluíram que o congelamento é uma técnica alternativa de conservação para estocagem de soluções de WPC.

2.3. Gelificação

Uma das propriedades mais importantes dos concentrados protéicos do soro é a de formar géis (MANGINO, 1992). A formação de gel de proteínas globulares é o resultado de um processo de aglutinação induzido pela alteração de determinadas condições, como uma mudança de temperatura (VERHEUL e ROEFS, 1998). Sob condições específicas, as proteínas de soro formam géis não-reversíveis. Mudanças no pH da solução, concentração e tipo de sais ou condições de aquecimento também alterarão as propriedades de aglutinação e a formação de géis das proteínas do soro (VERHEUL e ROEFS, 1998).

A capacidade de formação de géis pelas proteínas do soro de leite pode ser influenciada por vários fatores, como concentração das proteínas, temperatura, tratamento térmico, pH, força iônica e presença de íons covalentes (VARDHANABHUTI et al. 2001). Por exemplo, géis compostos por soluções de proteína com concentração entre (3 e 5)% e temperaturas entre (55 e 70)°C, são mais translúcidos e mais macios. Géis mais opacos são formados em maiores concentrações de proteínas (10%) aquecidas em temperaturas mais altas, (90 a 100)°C. Em condições de acidez elevada, os géis são opacos, úmidos e fracos. Em soluções neutras ou de pH mais altos, os géis são translúcidos e de maior elasticidade (USDEC, 1997). Em pH neutro onde as principais proteínas estão carregadas negativamente, os géis são formados em baixas forças iônicas (concentração de NaCl de aproximadamente 0,05 mol/dm³ ou menor). Quando a força iônica aumenta para 0,2 mol/dm³ a aparência do gel varia de translúcido para branco opaco (VERHEUL e ROEFS, 1998). Estes mesmos autores observaram que com a elevação da concentração de NaCl a estrutura do gel tornou-se mais grosseira e com poros muito grandes. Também verificaram um aumento no coeficiente de permeabilidade do gel com a elevação da concentração do sal. O coeficiente de permeabilidade diminuiu com o incremento da concentração das proteínas do soro para todas as concentrações de sal testadas, o que indica que os poros do gel são menores quando maior quantidade de proteína está presente.

A propriedade funcional de gelificação das proteínas do soro, também pode ser influenciada pelas variantes genéticas de β -Ig. Géis de soluções protéicas contendo a variante β -Ig A podem diferir significativamente daqueles contendo a

β -lg B. Embora géis de soluções de WPC a baixas concentrações de sal, formados com variantes de β -lactoglobulina A e B sejam semelhantes, quando a concentração do sal é incrementada a variante B da β -lg forma géis mais rígidos e com maior facilidade para quebrar do que o gel formado com a variante A (BIKKER et al., 2000).

Micropartículas de géis de proteína de soro mantêm o nível de umidade de produtos de panificação e embutidos, conferem opacidade a bebidas e produtos lácteos e melhoram a textura e as qualidades gustativas em produtos com teor de gordura reduzido, produtos de panificação, queijo, iogurte, pudins, manjares, em carnes e frutos do mar picados (USDEC, 1997).

2.4. Emulsificação e retenção de gordura

Os isolados protéicos do soro são usados na indústria de alimentos como emulsificantes, sendo que entre seus maiores componentes encontram-se as proteínas globulares que podem formar cadeias protéicas devido a interações iônicas e hidrofóbicas (DEMETRIADES e McCLEMENTS, 2000).

As proteínas de soro contêm grupos hidrofílicos e hidrofóbicos, e tem desempenho funcional semelhante aos emulsificantes tradicionais como a gema do ovo, em molhos tipo maionese, com a vantagem de possuir um menor teor de colesterol. Os WPC são usados freqüentemente em sistemas contendo alimentos em emulsão, pela sua habilidade de estabilizar emulsões de óleo em água. A α -la e a β -lg são adsorvidas na interface óleo-água, formando assim emulsões estáveis (YE e SINGH, 2000).

A presença de sais como CaCl_2 em soluções de WPC, usados para formar emulsões, aumentam o tamanho médio da partícula, a concentração de proteína na superfície e causam uma diminuição na estabilidade da emulsão. O íon Ca^{2+} produz aglutinação de proteínas do soro em solução, levando a um decréscimo na capacidade de emulsificação (YE e SINGH, 2000). A adição de um polissacarídeo como a pectina, formando um complexo solúvel proteína-pectina, mostrou maior estabilidade da emulsão assim como uma alta atividade de emulsificação, igual a 94% (MISHRA et al., 2001)

SUNDER et al. (2001) estudando as características físico-químicas de emulsões óleo-água com misturas de proteína do soro e fosfolípidios observaram

que as emulsões contendo proteínas do soro mostraram emulsificaram em altas temperaturas, apresentaram maior quantidade de gotas aglutinadas e conseqüentemente um incremento na consistência e que altas quantidades de proteínas melhoram o comportamento da emulsão. As emulsões exibiram comportamento newtoniano.

As propriedades de retenção de gordura dos produtos de soro estão associadas às suas características de emulsificação que é o resultado da presença de simultânea de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos.

2.5. Espuma e aeração

A capacidade de uma proteína formar espuma refere-se à expansão de volume da dispersão protéica com a incorporação de ar por batimento, agitação ou aeração. É uma propriedade funcional de interfase que depende da natureza da proteína, da solubilidade e do estado de desnaturação da proteína, da presença de sais e de outros aditivos utilizados no processamento dos alimentos (SGARBIERI, 1996).

A formação de espuma é semelhante à formação de emulsão, só que neste caso as proteínas de soro têm a função de estabilizar a interface em torno da micela de ar. Estas propriedades são de importância crucial na fabricação de coberturas aeradas e glaceadas, sorvete e frozen yogurt. IBANOGLU e KARATAS (2001) observaram que a formação de espumas de um isolado protéico é influenciada significativamente por altas pressões .

A propriedade de formar espuma é usualmente representada por dois parâmetros, espumabilidade e estabilidade da espuma. A estabilidade da espuma diz respeito à retenção do volume máximo de espuma formada em função do tempo de repouso e é geralmente medida pela liberação de fluido da espuma (SGARBIERI, 1996). Em estudo feitos com WPC em combinação com pectina, foi observado, conforme mostrado na Tabela 2, que a estabilidade da espuma aumentou com a adição de pectina (Mishra et al., 2001).

Tabela 2 – Estabilidade da espuma formada por WPC e mistura de WPC-pectina, a 30 °C e diferentes valores de pH.

	Estabilidade da espuma (%)	
	pH 4,6	pH 7,0
WPC	27,9	24,7
WPC-Pectina	40,1	35,3

(*MISHRA et al. (2001))

Em outro estudo observou-se que a presença de CaCl_2 aumentou o volume da espuma formada na presença de β -lg. O aumento da concentração de α -la elevou também o volume da espuma (IBANOGLU e IBANOGLU, 1999).

2.6. Sabor

Na forma pura, as proteínas de soro caracterizam-se por um sabor muito suave. O soro realça sabores já existentes ou acrescenta o seu próprio sabor ao produto final. O aquecimento de proteínas de soro resulta na formação de sulfetos voláteis. Aminoácidos livres são convertidos a componentes de sabor pelo calor e por meio da interação química com outros compostos. Por exemplo os WPC usados na padronização do teor de proteínas no leite, não afetam significativamente a qualidade sensorial do leite nas faixas usadas para a padronização de proteínas (RATTRAY e JELEN, 1996).

WPC usados na fabricação de massas para macarrão contribuíram favoravelmente para o aumento do valor protéico da massa, além de serem bem aceitados pelo consumidor. Os testes mostraram que é possível usar concentrações de WPC de até 18% sem alterar o sabor das massas (TOSSI et al, . 1997).

3. Propriedades nutricionais das proteínas do soro

As proteínas são nutrientes essenciais aos organismos animal e humano e devem estar presentes na alimentação em quantidades adequadas. Além do aspecto quantitativo deve-se levar em conta o aspecto qualitativo das proteínas, isto é, o seu valor nutritivo (LEHNINGER, 1976).

O valor nutritivo de uma proteína dependerá da sua composição, digestibilidade, da biodisponibilidade dos seus aminoácidos essenciais, da ausência de toxicidade e/ou de propriedades antinutricionais. As proteínas simples são compostas de aproximadamente 20 aminoácidos, nove dos quais são considerados essenciais, isto é, têm que estar presentes na dieta em quantidades e proporções definidas, uma vez que o organismo humano não possui capacidade de sintetizá-los, a partir de outras substâncias. Tais aminoácidos são a histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina (SGARBIERI, 1996). As dietas deficientes em um ou vários aminoácidos essenciais não permitem um crescimento adequado e podem conduzir a um aumento na mortalidade e a transtornos cerebrais com dificuldades no aprendizado (FENNEMA, 1993). As proteínas do soro são compostas por aminoácidos essenciais em proporções equilibradas e têm uma alta digestibilidade (RENNER, 1989; TOSI et al., 1997).

As proteínas do soro de leite apresentam um dos mais altos índices de valor biológico em comparação a outras fontes de proteínas, tais como ovos, leite, carne bovina, soja e caseína. O teor de aminoácidos essenciais das proteínas do soro é maior do que quaisquer outras fontes, contem níveis elevados de leucina e lisina em comparação ao isolado protéico de soja ou clara de ovo desidratada, ainda possui uma boa fonte de aminoácidos contendo enxofre, tais como a cisteína e metionina (RICHARDS, 2002). Estas proteínas avaliadas segundo o método "Protein Digestibility Corrected Amino Acid Scoring" (PDAACS), alcança o valor de 1,0 em função de sua excelente digestibilidade e pelo fato de fornecer ou superar a quantidade recomendada de cada aminoácido essencial. Também, quando são usados outros métodos de determinação de qualidade protéica, como o Índice de Eficiência Protéica (PER), o soro obtém excelentes pontuação na escala. Quanto mais elevado o valor de PER, melhor a qualidade da proteína. A caseína que é a proteína de referência apresenta valor PER de 2,5. Proteínas com valor PER acima de 2,5 são consideradas proteínas de alta qualidade. A proteína do soro, tem um PER maior do que 3,0, sendo então considerada uma excelente proteína do ponto de vista nutricional (USDEC, 1997).

As proteínas do soro são completas pois contêm, em quantidades variáveis e na proporção correta, os aminoácidos que o organismo humano necessita.

Quase todos os aminoácidos presentes no soro superam as doses diárias mínimas de nutrientes recomendadas pela Organização Mundial de Saúde (FAO/WHO, 1985), tanto para crianças ente 2 e 5 anos de idade quanto para adultos, como observado na Tabela 3. Para adultos, as proteínas do soro contêm mais que o dobro dos padrões recomendados pela FAO/WHO.

Tabela 3 – Teor de aminoácidos essenciais de proteínas de soro e necessidades nutricionais de adultos e crianças.

Aminoácidos	Adulto (mg)	Criança 2 a 5 anos (mg)	Soro (mg)
Histidina	16	19	20
Isoleucina	13	28	59
Leucina	19	66	103
Lisina	16	58	88
Metionina	17	22	41
Fenilalanina	19	63	62
Treonina	9	34	68
Triptofano	5	11	24
Valina	13	35	59

Fonte: modificado de GLASS e HEDRICK, 1976 ; FAO, 1985

Os WPC tem mostrado um PER maior do que o do leite em pó. Existem evidências, em estudos com animais, de que as proteínas do soro produzem imunomodulação, aumentando a resistência ao câncer. Estas proteínas apresentam o único inconveniente da presença de β -lg que tem resposta alergênica para lactentes e que é a proteína presente em maior quantidade no soro (RATTRAY e JELEN, 1996)

Na Figura 3 as proteínas de soro são comparadas com outros tipos de proteínas, incluindo, soja, amendoim, milho e glúten de trigo, onde pode-se observar que o PER das proteínas do soro só é menor do que o do ovo de galinha.

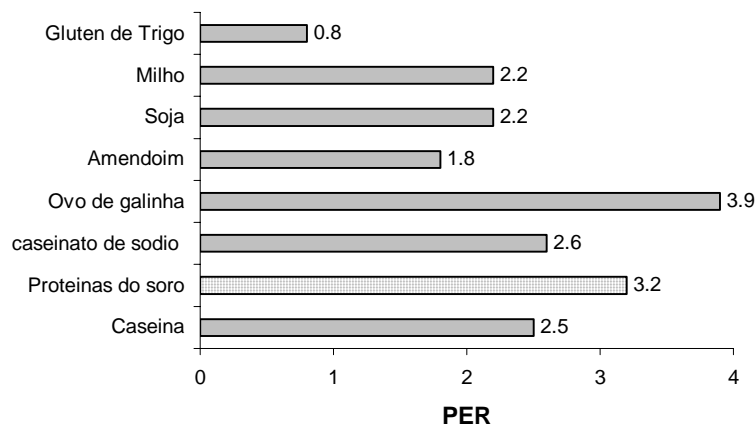


Figura 3 - Índice de Eficiência Protéica (PER) para diferentes proteínas de origem animal e vegetal (USDEC, 1997) .

A digestibilidade da proteína é outro fator importante na determinação do valor nutritivo de uma proteína. É avaliada pela razão entre o teor de nitrogênio absorvido e o teor de nitrogênio ingerido com a dieta, expresso em porcentagem. As proteínas do soro têm uma alta digestibilidade e complementam os aminoácidos essenciais (RATTRAY e JELEN 1996). O valor biológico também é elevado, maior que o da caseína e próximo do da proteína do ovo, como mostrado na Tabela 4.

Tabela 4 – Parâmetros biológicos das proteínas do soro

	Proteínas do soro	Caseína	Proteínas do ovo
Coeficiente de Eficácia Protéica (PER)	3,2	2,5 – 3,0	3,9
Utilização Líquida da Protéica (NPU)	95	79	94
Valor Biológico (VB)	100	85	94
Digestibilidade	97	97	97

Fonte: LINDEN e LORIENT, 1996

O soro contém a maior parte das vitaminas hidrossolúveis presentes no leite. É particularmente rico em vitamina B, suprimindo uma quantidade apreciável das necessidades humanas de vitaminas B₂, B₅ e B₆ (LINDEN e LORIENT, 1996). Na Tabela 5 pode-se apreciar os conteúdos de vitamina do soro comparado com as necessidades diárias.

Tabela 5 – Conteúdo de vitaminas do soro e necessidades diárias

	Concentração (mg/mL)	Necessidades diárias (mg)
Tiamina (vit. B ₁)	0,38	1,5
Riboflavina (vit B ₂)	1,2	1,5
Acido nicotínico (vit. B ₃)	0,85	10-20
Acido pantotênico (vit. B ₅)	3,4	10
Piridoxina (vit. B ₆)	0,42	1,5
Cobalamina (vit. B ₁₂)	0,03*	2*
Acido ascórbico (vit. C)	2,2	10-75

* expresso em µg.

Segundo a USDEC (2002), a redução da incidência de câncer, o realce de propriedades imunológicas, a fortificação dos ossos e a diminuição do colesterol sanguíneo, podem ser considerados como alguns benéficos nutracêuticos atribuídos aos derivados do soro.

4. Características das Proteínas do soro

As proteínas do soro correspondem a 20% das proteínas do leite sendo que a α -lactoalbumina e a β -lactoglobulina representam de (70 a 80)% do total das proteínas do soro. No soro são encontradas também a albumina de soro bovino, imunoglobulinas, protease-peptonas, lactoferrina, lactoperoxidase e outras enzimas (MORR E HÁ, 1993). A Tabela 6 apresenta algumas características físico-químicas das proteínas presentes no soro de leite.

Tabela 6* – Características físico-químicas das proteínas do soro de leite

Proteína	Concentração (g/L)	Massa Molecular (KDa)	Ponto Isoelétrico
β -lactoglobulina	2 - 4	18,3	5,2
α -lactoalbumina	1 - 1,5	14,2	4,2 - 5,1
Imunoglobulinas	0,4 -1,0	146 - 900	5,5 - 8,3
Albumina do soro	0,3 – 0,6	66 - 69	4,7- 4,9
Protease-peptone	0,5	4 - 20	-
Lactoferrina	0,05	78 - 92	8,0 – 9,0
Lactoperoxidase	0,06	78 - 89	9,6

*Modificado de MORR e HÁ (1993) e McKENZIEY (1970)

4.1. β -lactoglobulina (β -lg)

A β -lg é a proteína presente em maior quantidade no soro. Corresponde a cerca de 50% do total das proteínas do soro, apresenta polimorfismo genético (A, B, C e D), é constituída por 162 resíduos de aminoácidos estruturados de acordo com a posição do aminoácido: Asp (10), Asn(5), Thr(8), Ser(7), Glu(6), Gln(9), Pro(8), Gly(4), Ala(15), Cys(5), Val(9), Met(4), Ile(10), Leu(22), Try(4), Phe(4), Lys(15), His(2), Trp(2), Arg(3). A seqüência de aminoácidos da β -lg A difere em duas posições, Asp (64) e Val (118), da seqüência da β -lg B (MORR e HÁ, 1993; WALSTRA e JENNESS, 1987; CHEFTEL et al., 1989).

Foi a primeira proteína do leite a ser cristalizada, sendo extensivamente estudada e caracterizada. A β -lg é uma proteína globular típica, relativamente rica em aminoácidos sulfurados. Os resíduos de cisteína são capazes de reagir com os grupamentos sulfídricos da κ -caseína em certas condições de tratamento térmico, podendo afetar significativamente a coagulação do leite pela renina e a estabilidade da estrutura micelar da caseína; é responsável pelo aparecimento do sabor de cozido em leites aquecidos (WALSTRA e JENNESS, 1987; CHEFTEL et al., 1989).

Esta proteína é termolábil. Apresenta mudanças conformacionais reversíveis em temperaturas menores que 70°C. Temperaturas elevadas podem provocar sua desnaturação e polimerização irreversível ou um significativo aumento na susceptibilidade de degradação desta proteína por pepsina e quimiotripsina. É considerada também um excelente agente de gelatinização (MORR e HÁ, 1993)

A estrutura globular da β -lg é resistente a ação de ácidos e enzimas proteolíticas presentes no estômago. Essa estabilidade confere uma função biológica a esta proteína no transporte do retinol (pro-vitamina A) do estômago para o intestino. Todavia ainda não é conhecido o mecanismo pelo qual a β -lg remove o retinol dos glóbulos de gordura, onde normalmente ficam alojados. Outras funções fisiológicas que podem estar associadas com a β -lg são a capacidade de se ligar a ácidos graxos livres e o estímulo para a síntese da glutathiona, um tripeptídeo anticarcinogênico produzido no fígado capaz de evitar a formação de tumores intestinais (FOX e McSWEENEY, 1998; DE WIT, 1998).

A β -lg sendo uma proteína de grande valor nutritivo e elevadas solubilidade e estabilidade pode ser usada para a fortificação de bebidas e sucos de frutas. Preparados enzimáticos hidrolisados com β -lg são usados como suplemento para convalescentes, já que muitos peptídios da β -lg podem ser absorvidos diretamente pelo intestino. Também a partir de hidrolisados de β -lg são preparados leites com baixo conteúdo de fenilalanina, utilizados na alimentação de lactantes com fenilcetonúria, uma enfermidade de origem genética que provoca a não-metabolização de fenilalanina e pode causar, entre outros problemas, deficiência mental (GRASSELLI et al., 1997).

4.2. α -lactoalbumina (α -la)

A α -la, uma proteína globular, constitui cerca de 22% do total de proteínas do soro (LINDEN e LORIENT, 1996). Apresenta 2 variantes genéticas (A e B) e uma seqüência de aminoácidos similar a lisozima. Entre os 123 resíduos de aminoácidos da α -la 54 são idênticos aos da lisozima [Asp(9), Asn(12), Thr(7), Ser(7), Glu(8), Gln(5), Pro(2), Gly(6), Ala(3), Cys(8), Val(6), Met(1), Il(8), Leu(13), Try(4), Phe(4), Lys(12), His(3), Trp(4), Arg(1)]. Por muitos anos foi considerada a proteína do soro mais estável ao calor, até ser evidenciado que é bastante susceptível à desnaturação pelo calor. RUEGG et al. (1977) relataram tanto a desnaturação da α -la a 65,2°C e pH 6,7 quanto a reversibilidade da desnaturação sob resfriamento (entre 80% e 90%). DE WIT et al. (1983) observaram que a α -la foi desnaturada entre (62 e 63)°C e que 90% foi renaturada em pH 6,5. Este alto grau de renaturação foi provavelmente o responsável pela suposição da aparente resistência ao calor atribuída à α -la. CHAPLIN e LYSTER (1986) verificaram que soluções de α -la aquecidas a 77°C e imediatamente resfriadas, levaram a 10% de desnaturação irreversível. Com o aquecimento desta mesma solução a 95°C e manutenção da temperatura por 15 minutos, somente 40% da proteína foi renaturada.

Devido ao fato do íons Ca^{2+} , Zn^{2+} e outros íons metálicos serem passíveis de ligação com a α -la, esta proteína é desnaturada em temperaturas mais altas, já que proteínas não ligadas a metais são desnaturadas em temperaturas de aquecimento relativamente mais baixas e não tem capacidade de se renaturar. A associação com íons metálicos facilita a renaturação da proteína após uma

desnaturação pela ação do calor. Os íons cálcio, por exemplo, unem-se em regiões da estrutura da α -la ricas em resíduos de ácido aspártico (BERNAL e JELEN, 1984).

A α -la é rica em triptofano, aproximadamente 6% em peso, adequa-se muito bem para a nutrição humana, é apropriada para o preparo de alimentos infantis, e é quiçá a de mais baixo custo com estas características (GRASSELLI et al., 1997)

Uma das principais funções fisiológicas da α -lac está relacionada com a sua participação na síntese da lactose nas glândulas mamárias. A associação da α -la com a enzima galactosiltransferase, complexo lactose sintetase, catalisa preferencialmente a adição da galactose na molécula de glicose (SGARBIERI, 1996).

A partir da α -la, obtém-se peptídios contendo triptofano, que são precursores da serotonina, uma substância que regula a vigília e o sonho. A hidrólise da α -la também gera um peptídio formado pela união seqüencial dos aminoácidos tirosina, glisina, leucina e fenilalanina (Tyr-Gly-Leu-Phe), que é uma exorfina ou morfina exógena pois possui ação opiácea. Este composto tem potencial para emprego no tratamento de distúrbios psicossomáticos (GRASSELLI et al., 1997).

4.3. Albumina de soro bovino (BSA)

Essa proteína, com 582 resíduos de aminoácidos, apresenta uma estrutura similar ao encontrada à da albumina do soro sanguíneo. É a única com grande cadeia polipeptídica entre as proteínas do soro, sendo formada por Asp(39), Asn(12), Asx(3), Thr(34), Ser(28), Glu(59), Gln(19), Glx(1), Pro(28), Gly(16), Ala(46), Cys(35), Val(36), Met(4), Ile(14), Leu(61), Tyr(19), Phe(27), Lys(59), His(17), Trp (2) e Arg(23). Possui um grupo sulfidrila livre na posição 34 (N-terminal) e 17 pontes dissulfeto intramolecular. A molécula tem forma elíptica e é dividida em três domínios (MORR e HÁ, 1993; FOX e McSWEENEY, 1998).

A BSA é capaz de se ligar a ácidos graxos insolúveis, e provavelmente, é um componente importante na formação de glutathiona no fígado, um peptídeo que aumenta a capacidade de resposta imunológica de indivíduos HIV soro positivos e de ação anticarcinogênica e antimutagênica. A união com os ácidos graxos

estabiliza a molécula de proteína contra a desnaturação térmica (GUMPEN et al., 1979; DE WIT, 1998). Assim como outras proteínas do soro (β -Ig e lactoferrina), apresenta concentrações consideráveis de cisteína e glutamil cisteína, importantes precursores da biossíntese da glutatona (McINTOSH et al., 1995).

A BSA é solúvel em água até 35% a 3°C, no entanto precipita entre 40°C e 45 °C e sofre desnaturação acida em pH 4 devido à repulsão dos resíduos de aminoácidos carregados positivamente, ao longo da cadeia polipeptídica (DE WIT, 1989)..

4.4. Imunoglobulinas

As imunoglobulinas representam uma classe especial de proteínas de elevada massa molecular encontrada no soro sanguíneo e em outros fluidos do organismo. No colostro bovino tem a finalidade de conferir imunidade passiva aos bezerros, protegendo-os contra doenças até que seu próprio sistema imunológico de defesa seja ativado (SGARBIERI, 1996).

No soro de leite, são encontradas em pequenas quantidades três classes de imunoglobulinas (IgG, IgA, IgM), embora essa concentração seja maior no colostro. A IgG é a que está em maior quantidade no leite bovino, cerca de 75% do conteúdo total das imunoglobulinas do leite, enquanto a IgA é a de maior teor no leite humano. Todas as classes de imunoglobulinas podem ser encontradas na natureza na forma de monômeros ou polímeros, tendo como estrutura básica quatro cadeias polipeptídicas, duas leves e duas pesadas, ligadas covalentemente por pontes de dissulfeto. A IgG é um monômero ou correspondente a estrutura básica da imunoglobulina; IgA é um dímero formado por duas unidades (4 cadeias polipeptídicas) ligadas por duas estruturas o componente secretor (SC) e de junção e a IgM é um pentâmero formado por cinco unidades (20 cadeias polipeptídicas) ligadas pelos componentes de junção (FOX e McSWEENEY, 1998). Estas proteínas são termolábeis e suas propriedades funcionais e tecnológicas não foram ainda determinadas (KINSELLA e WHITEHEAD, 1990).

As imunoglobulinas desnaturam a temperatura maiores do que a α -la e β -Ig, porém na presença de outras proteína do soro, elas são extremamente

sensíveis à temperatura, o que é provocado pela interação com β -lg e BSA via pontes dissulfeto (DE WIT, 1989).

4.5. Protease-peptona

Os três componentes da molécula de protease-peptona foram reclassificados como fragmentos de β -caseína. Estes fragmentos de proteína contêm baixas concentrações de resíduos aminoácidos de enxofre e aromáticos que não são precipitados pelo aquecimento do leite a 95°C por 20 minutos em pH 4,6. Além de estarem presentes no leite, fragmentos de β -caseína adicionais, são provavelmente formados pela ação da renina usada na produção de queijo (MORR e HÁ, 1993).

4.6. Lactoferrina

As transferrinas compreendem um grupo específico de metaloproteínas, e entre elas a lactoferrina, proteína encontrada no leite, suco pancreático, lágrimas e leucócitos. Normalmente apresenta concentrações entre (0,02 a 0,35) g/L no leite bovino, enquanto teores bem superiores são observados em leite humano, (2 a 4) g/L. A concentração de lactoferrina no leite humano reduz ligeiramente durante a lactação, mas aumenta da mesma forma no leite bovino (KINSELLA e WHITEHEAD, 1989; FOX e McSWEENEY, 1998).

Essa glicoproteína liga-se fortemente aos íons ferro indicando que pode apresentar duas funções biológicas importantes: absorção de ferro, tornando-o mais biodisponível, e proteção contra infecção entérica em neonatais (FOX e McSWEENEY, 1998). O complexo ferro-lactoferrina é muito resistente à proteólises e estável até pH 2. Em razão da concentração da lactoferrina ser consideravelmente maior no leite humano do que no leite bovino e pela maior resistência às infecções das crianças amamentadas com leite materno, atribuída às substâncias antimicrobianas como a lactoferrina, há um grande interesse em usar essa proteína para suplementar formulações lácteas infantis. A concentração da lactoferrina também aumenta quando ocorre a mastite, podendo-se atribuir a ela um efeito protetor sobre as glândulas mamárias (LINDEN e LORIENT, 1996; FOX e McSWEENEY, 1998).

A lactoferrina inibe irreversivelmente o crescimento de um grande número de microorganismos principalmente bactérias com necessidade metabólica do ferro, como consequência da sua potente afinidade pelo íon ferro. Sua ação é mais potente durante a fase de crescimento exponencial (LINDEN e LORIENT, 1996).

4.7. Lactoperoxidase

A lactoperoxidase representa cerca de (0,5 a 1,0) % das proteínas do soro. É uma heme proteína constituída por duas subunidades idênticas (FOX e McSWEENEY, 1998).

Além de ser utilizada como um indicador na avaliação do processo de pasteurização, a lactoperoxidase é importante na tecnologia de leite e derivados pois pode ser usada como um indicador da infecção pela mastite e pode causar oxidação de lipídeos insaturados além do complexo lactoperoxidase-tiocianato-água oxigenada ter ação bactericida sobre um grande número de germes patogênicos e um efeito bacteriostático sobre certos Gram⁺ tais como os *streptococcus lactis* e os *lactobacillus thermophilus* (LINDEN e LORIENT, 1996). A ativação deste complexo, principalmente onde não há um programa eficaz de resfriamento do leite, pode promover um maior controle no desenvolvimento de bactérias mesófilas e psicotróficas do leite, principalmente as espécies *Listeria*, *Staphylococcus*, *Campylobacter*, *Salmonella* e *Bacillus cereus* (SANTOS et al., 1999).

Determinadas ações fisiológicas tem sido atribuídas a lactaperoxidase, como: proteção nas glândulas mamárias contra a mastite e na prevenção ou redução de infecções entéricas em alguns animais (DE WIT, 1998; FOX e McSWEENEY, 1998).

5. Aplicações dos produtos do soro em alimentos

O soro é uma fonte altamente representativa de proteínas com excelentes propriedades funcionais, sendo adicionado como ingrediente em muitos produtos alimentícios tradicionais assim como apresenta potencial para aplicações no desenvolvimento de novos produtos (MISHRA, 2001, DECKER, 2001). Os concentrados protéicos derivados das proteínas do soro, principalmente aqueles com baixos teores de lactose, minerais e lipídeos apresentam uma boa

capacidade espumante/emulsificante. Concentrados de proteínas de soro, com baixo teor de lipídeos, podem substituir com relativo sucesso as proteínas da gema de ovo, em alguns produtos aerados, como por exemplo, os merêngues (DE WIT, 1998).

O soro de leite líquido, WPC ou o isolado protéico de soro (WPI) podem ser usados na padronização de proteínas do leite. As proteínas do soro têm uma alta digestibilidade e complementam os aminoácidos essenciais (RATTRAY e JELEN 1996).

O uso de WPC em concentrações de (8 a 10)% em combinação com amido de mandioca (1-5)% melhorou significativamente a textura final de salsichas de porco com baixo teor de gordura (LYONS et al., 1999).

O soro de leite também tem sido usado na produção de queijos, visando aumentar o rendimento e melhorar suas características nutricionais (HINRICHS, 2001), assim como na microencapsulação de lipídios (KEOGH et al., 1999) e em alimentos extrusados a base de milho, batata e arroz (ONWULATA et al., 2001). O aumento da sua utilização na indústria de alimentos deve-se ao fato das proteínas do soro constituírem o maior grupo de ingredientes funcionais, que apresentam capacidade para formação de espumas, de gelificação, emulsificação e de retenção de água, além de excelentes propriedades nutricionais (MORR e HÁ, 1993; IBANOGLU e KARATAS, 2001).

Na Tabela 7 são apresentadas outras aplicações do soro de leite na indústria de alimentos.

Tabela 7* - Alguns exemplos de aplicação das proteínas do soro em produtos alimentícios

Aplicação	Efeito funcional ou nutricional
Produtos de panificação	Cria emulsões estáveis, atua tão bem quanto a gema de ovo, porém com menor teor de colesterol do que a gema de ovo em pó.
Mistura para sorvete	
Molhos tipo maionese	
Produtos cárneos e frutos do mar	Gelificação (géis prendem grandes quantidades de água). Ajuda a lubrificar e confere ao produto a textura lisa e cremosa típica de gorduras.
Produtos lácteos (sobremesas como flans, iogurtes, etc..)	Realça o sabor natural de queijo e de outros derivados do leite. No iogurte enriquece o valor nutricional, além de melhorar a textura, flavor, viscosidade e as propriedades nutracêuticas.
Massas alimentícias tipo macarrão	Melhor textura e gosto. Produz firmeza por meio de interações proteína-glúten.
Molhos para saladas e sopas	Retenção de água, aumento de viscosidade, melhoria da textura do produto
Preparados secos para molhos e outras misturas	Aumenta a viscosidade e melhora a textura.
Bebidas nutricionais	Melhora a qualidade nutricional e aumenta a viscosidade.
Merengue, bolos, produto de confeitaria e outras sobremesas congeladas	Auxilia a manter a estabilidade da espuma e melhora a capacidade de aeração.
Produtos nutricionais, incluindo formulas infantis	Melhora o perfil nutricional do produto, permite o enriquecimento do perfil vitamínico e a fortificação com minerais.
Salgadinhos e snacks	Confere o sabor de manteiga.
Carnes processadas	Realça o sabor natural da carne.
Salsicha	Melhora o rendimento e as propriedades nutricionais.
Produtos de extrusão	Melhora a expansão e textura.
Microencapsulação de gorduras do leite	Redução da gordura livre.

(*modificado de FOX e MCSWEENEY (1998), USDEC (1997), GASPAR et al. (1998), ONWULATA et al. (2001) e KEOGH et al. (1999)).

Agradecimentos: Os autores agradecem ao PADCT/CNPq, e ao PEC-PG pela bolsa de estudo concedida a Abraham Damian Giraldo Zuñiga

6. Referências Bibliográficas

ANUALPEC. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2001. 579p.

ARAUJO, J.M.A ., **Química de Alimentos - Teoria e Prática**, editora UFV. 1999. P.275-309.

BHARGAVA, A. JELEN, P. Freezing of whey protein concentrate solutions and its effect on protein functionality indicators. **Int. Dairy Journal**. V.5, p.533-541, 1995.

- BEM-HASSAN, R. M., GHALY, A. E. Continuous propagation of *kluyveromyces fragilis* in cheese whey for pollution potential reduction. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.47, p.89-105, 1994.
- BERNAL, V and JELEN, P. Effect of calcium binding on thermal denaturation of bovine α -lactalbumin. **J. Dairy Sci.** v. 67, p 24-32, 1984.
- BIKKER, J. F., ANEMA, S. G., LI, Y., HILL, J. P. Rheological properties of acid gels prepared from heated milk fortified with whey protein mixtures containing the A, B and C variants of β -lactoglobulin. **International Dairy Journal**, v. 10, p. 723-732, 2000.
- BOURAOUI, M. M., FICHTALI, J., PINDER, K. L., NAKAI, S & BOWEN, B.D. Viscous properties of salmon surimi paste. **Journal of Food Engineering**. V. 34, p. 441-452, 1997.
- CHAPLIN, L and LYSTER, R. L.J. Irreversible heat denaturation of bovine α -lactalbumin. **J. Dairy Sci.** v. 53, p 249, 1986.
- CHEFTEL, J.C.; CUQ, J.L. & LORIENT, D. Las proteínas de la leche. IN: **Proteínas alimentarias. Bioquímica. Propiedades funcionales. Valor nutricional- Modificaciones química.** Zaragoza, Espanha: Ed Acribia 1989. p. 179-220.
- DECKER, K. Putting proteins to work. **Food Product Desing**, v.1, p.39-59, 2001
- DEMETRIADES, K., McCLEMENTS, J. D. Influence of sodium dodecyl sulfate on the physicochemical properties of whey protein-stabilized emulsions. **Colloids and Surfaces**. V. 161, p. 391-400, 2000.
- DE WIT, J. N. KLARENBECK, G., and HONTELEZ, E. Evaluation of functional properties of whey protein concentrate and whey proteins isolates. **Neth. Milk Dairy J.** v. 37. 59-68, 1983..
- DE WIT, J. N. **Functional properties of whey proteins, in Developments in dairy Chemistry**, Vol 4, Elsevier applied Science, New York, 1989, 285p.
- DE WIT, J. N. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. **Journal of Dairy Science**. 81(3): 597-608, 1998.
- FAO/WHO/ONU. Energy and protein requirements. Report of the joint FAO/WHO/ONU expert consultation. Technical reports series 724. FAO, WHO, and the United Nations University, Geneva, Switzerland. 1985.
- FENNEMA, O. R. Aminoácidos, péptidos y proteínas. IN: **Química de los alimentos.** Zaragoza, Espanha: Ed Acribia 1993. p. 275-414.
- FOX, P. F. & McSWEENEY, P. L. H. **Dairy chemistry and biochemistry.** London, England: Ed. Blackie Academic & Professional. 1998. 478 p.

- FRIEDMAN, M. **Protein nutritional quality of foods and feeds**. New Jersey: Marcel Decker, 1975. 674p.
- GASPAR, A., BARROS, G. C., SILVA, A. T., SCHMELSER-NAGEL, W. Utilização de concentrado protéico de soro de leite para redução calórica na fabricação de salsicha tipo Viena. **Revista Nacional da Carne**, v. 18, p. 19-24, 1998
- GLASS, L. and HEDRICK, T. I. Nutritional composition of sweet and acid type dry wheys. Major factors including aminoacids. **J. Dairy Sci.** v. 60, p. 185-189, 1976.
- GRASSELLI, M., NAVARRO, A., FERNANDEZ, H. L., MIRANDA, M. V., CAMPERI, I., OSVALDO CASCONI. Que hacer con el suero de queso. **Ciencia Hoy**, v.43, n.1, p.27-35, 1997.
- GUMPEN, S., HEGG, P. O., MARTENS, M. Thermal stabilization of fatty acid-serum albumin complexes studied by differential scanning calorimetry. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 574, 189, 1979.
- HANEMAAIJER, J. H. Microfiltração in whey processing. **Desalination**, v. 53, p. 143-155, 1985.
- HINRICHS, J. Incorporation of whey proteins in cheese. **International Dairy Journal**, v. 1, p. 495 –503. 2001.
- IBANOGLU, E., KARATAS, S. High pressure effect on foaming behaviour of whey protein isolate. **Journal of Food Engineering.** v.47, p. 31-36, 2001.
- IBANOGLU, E., IBANOGLU, S. Foaming behaviour of EDTA-treated α -lactalbumin. **Food Chemistry.** v .66, p. 477-481, 1999.
- KEOHJ, M. K., O'KENNEDY, B. T. Milk fat microencapsulation using whey proteins. **International Dairy Journal**, v. 9, p.657-663, 1999.
- KINSELLA, J. E. & WHITEHEAD, D. M. Proteins in whey: Chemical, physical, and functional properties. **Advances in Food and Nutrition Research**, 33, 343-438, 1990.
- LEHNINGER, A. L. **Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blucher. 1976. p.126-145
- LINDEN, G., LORIENT, D. Lactosueros. IN: **Bioquímica Agroindustrial. Revalorização alimentaria de la produção agrícola**. Zaragoza, Espanha: Ed Acibia 1996. p. 215-229.

- LYONS, P. H., KERRY, J. F., MORRISEY, P. A., BUCK, D. J. The influence of added whey protein/carrageenan gels and starch on the textural properties of low fat pork sausage. **Meat Sciences**. v. 51, p. 43-52, 1999.
- MADRID , V. A., CENZANO, I., VICENTE, J. M. **Manual de indústrias dos alimentos**. São Paulo- SP: Ed. Livraria Varela. 1996.p 147-169.
- MANGINO, M. E. Gelation of whey protein concentrates. **Food Technology**, January, p. 114-117, 1992.
- McKENZEY, H. A. Milk proteins, Chemistry and molecular biology, v. 1, Academic Press, New York, 1970.
- McINTOSH, G. H., GRANTS, T., TROZLVSI Dairy proteins protect against dimethylhydrazine-induced intestinal cancers in rats. **Journal of Nutrition**. 125 (4): 809-816, 1995.
- MISHRA, S., MANN, B., JOSHI, V. K. Functional improvement of whey protein concentrate on interaction with pectin. **Food Hydrocolloids**. v. 15, p. 9-15, 2001.
- MORR, C., HA, E. W. Whey protein concentrates and isolates processing and functional properties critical reviews. **Food Science and Nutrition**, v.33, n.6, p.431-476, 1993.
- MULVIHILL, D. M. Production, functional properties and utilization of milk protein products. **Advances Dairy Chemistry**, volume 1. Elsevier Science publisher, 1992.
- ONWULATA, C. I., SMITH, P. W., KONSTANCE, R. P., HOLSINGER, V. H. Incorporation of whey products in extruded corn, potato or rice snacks. **Food Research International**. v.34, p.679-687, 2001.
- PATINO, J. M. R. , GARCIA, J. M. N., NIÑO, M. R. R. Protein-lipid interactions at the oil-water interface. **Colloids and Surfaces B**. v. 21, p. 207-216, 2001.
- RATTRAY, W AND JELEN, P. Protein standardization of milk and dairy products. **Trends in Food science & Technology** v.7, n.7, p. 227-234, 1996.
- RENARD, D., ROBERT, P., FAUCHERON, S., SANCHEZ, C. Rheological properties of mixed gels made of microparticulated whey proteins and β -lactoglobulin. **Colloids and Surfaces B**. v. 12, p. 113-121, 1999.
- RICHARDS, N. S. P. S. Soro lácteo perspectivas industriais e proteção ao meio ambiente. **Food Ingredients**, nº 17, Mar/Abr, 2002.
- RUEGG, M., MOOR, U., and BLANC, B., A calorimetric study of thermal denaturation of whey protein in simulated milk ultra filtrate. **J. Dairy Res.**, v. 44, p 509, 1977.

- SANTOS, E. S.; CARVALHO, E. P., ABREU, L. R. Psicotróficos: conseqüências de sua presença em leite e queijos. **Bol. SBCTA**, 33 (2): 129-138, 1999.
- SGARBIERI, V. C. Proteínas do leite e derivados. IN: **Proteínas em alimentos protéicos. Propriedades. Degradações. Modificações**. São Paulo- SP: Ed. Livraria Varela. 1996.p 139-157
- SGARBIERI, V. C. Propriedades funcionais de proteínas em alimentos. **Bol. SBCTA**, 32 (1): 105-126, 1998.
- SUNDER, A., SCHERZE, I., MUSCHIOLIK, G. Physico-chemical characteristics of oil-in-water emulsions based on whey protein-phospholipid mixtures. **Colloids and Surfaces B**. v. 21, p. 75-85, 2001.
- TOSI, E., CAZOOPLY., CATALANO, O . Uso de la harina de triticales y suero de leche ultrafiltrado em polvo para la fabricación de pastas frescas. **Alimentaria**, v.39, p.39-41,1997.
- USDEC Características, Funções e novas aplicações das proteínas de soro e suas novas frações. **Food Ingredients**, nº 17, Mar/Abr, 2002.
- USDEC. **Manual de referência para produtos de soro dos EUA**. U.S. Dairy export council®, Arlington, VA 22201-3001 U.S.A, 1997.
- VARDHANABHUTI, B., FOEGEDING, E. A., MCGUFFEY, M, K., DAUBERT, C. R., SWAISGOOD, H. E. Gelation properties of dispersions containing polymerized and native whey proteins isolate. **Food Hydrocolloids**, v.15, p. 165-175, 2001.
- VERHEUL, M., ROEFS, S. P. F. Structure of whey protein gels, studied by permeability, scanning electron microscopy and rheology. **Food Hydrocolloids**, v.12, p. 17-24, 1998.
- WALSTRA, P. & JENNESS, R. **Química y física lactológica**. Zaragoza, Espanha: Ed Acribia 1987. p. 84-106
- YE, A., SINGH, H. Influence of calcium chloride addition on the properties of emulsions stabilized by whey protein concentrate. **Food Hydrocolloids**, v.14, p. 337-346, 2000.

REVISÃO: TÉCNICAS USADAS NO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS

Abraham D. Giraldo Zuñiga
José A. Marques Pereira
Jane S. Reis Coimbra
Luis A. Minim
Edwin E. Garcia Rojas

Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), Universidade Federal de Viçosa (UFV), CEP 36571 –000 – Viçosa - MG, Brasil.

RESUMO

A presente revisão da literatura teve por objetivo mostrar as diferentes técnicas que podem ser empregadas no processo de purificação de biomoléculas. Além da seleção e combinação de técnicas de separação para o desenvolvimento da estratégia de purificação foram abordadas a precipitação, a centrifugação, a tecnologia de membranas (osmose reversa, ultrafiltração, diálise e microfiltração), a extração líquido-líquido usando sistemas aquosos bifásicos, as técnicas cromatográficas (troca iônica, interação hidrofóbica, fase reversa, exclusão molecular, leito expandido), as separações bioseletivas (cromatografia por afinidade, precipitação por afinidade, partição de proteínas por afinidade em sistemas aquosos bifásicos) e novas técnicas de separação (leito móvel simulado, micelas reversas e cromatografia em contracorrente). Verificou-se que as técnicas cromatográficas estão presentes em todos os processos de purificação de biomoléculas, embora ainda existam restrições técnicas e econômicas na aplicação de alguns tipos de cromatografia em escala preparativa.

1. INTRODUÇÃO

O interesse crescente pelos processos de purificação de biomoléculas deve-se principalmente ao desenvolvimento da biotecnologia e à demanda das indústrias farmacêutica e química por produtos com alto grau de pureza. A indústria de alimentos também apresentou aumento no uso de biomoléculas, como enzimas e proteínas, principalmente em cervejarias e em processos de fermentação.

O objetivo deste trabalho de revisão é mostrar os diferentes tipos de técnicas que podem ser usadas nas etapas do processo de purificação e as técnicas promissoras que podem ser aplicadas na purificação de biomoléculas.

2. PROCESSO DE PURIFICAÇÃO

O esquema básico para a separação de biomoléculas foi sugerido por pesquisadores liderados pelo químico Arthur B. Little em 1917 (CUSSLER e DING, 1995). Esse comitê considerou que as separações químicas poderiam ser classificadas como “operações unitárias”, que incluíam destilação, adsorção, filtração, etc. Os pesquisadores argumentaram que a inclusão da destilação foi baseada em idéias comuns, já que era usada para purificar óleo cru ou para fazer conhaque. A tal inclusão gerou grande polêmica, pois outros cientistas consideravam impossível o uso da destilação para muitos materiais biológicos. Foi questionado que somente alguns compostos de baixo peso molecular poderiam ser destilados, tais como os aromas. Entretanto, a destilação não serviria para a separação de antibióticos, hormônios e proteínas. Em 1986, BELTER sugeriu que cada separação fosse considerada como quatro passos seqüenciais, ou seja, clarificação ou remoção de compostos insolúveis, isolamento do produto ou concentração, purificação intermediária e polimento. Essa foi a melhor estratégia para a purificação de biomoléculas, sendo utilizada em processos biotecnológicos como base para o desenvolvimento de processos de purificação de proteínas, enzimas, células e hormônios. Tal estratégia também mostrou-se eficiente no desenvolvimento de novas rotas ou esquemas de purificação em nível de pesquisa de laboratório e industrial (CUSSLER e DING, 1995).

2.1 SELEÇÃO E COMBINAÇÃO DE TÉCNICAS DE SEPARAÇÃO PARA DESENVOLVER A ESTRATÉGIA DE PURIFICAÇÃO

No esquema proposto por BELTER (1986) a purificação de biomoléculas exige o emprego de muitas técnicas, devendo-se buscar a mais apropriada para cada estágio de separação. Assim, são empregadas técnicas diferentes na remoção de compostos insolúveis ou clarificação, no isolamento do produto ou captura, na purificação intermediária e no polimento (Tabela 1). Por exemplo, para

o isolamento e purificação de enzimas são usadas técnicas como homogeneização, centrifugação, filtração, evaporação e cromatografia (BUCKE, 1983). As técnicas cromatográficas estão presentes em todos os processos de purificação. Com a utilização dessas em seqüência é possível purificar uma única enzima das muitas presentes num extrato celular. Por essa razão, NIVEN afirmou que a cromatografia representava o estado da arte na purificação de proteínas (1995).

A disponibilidade de diferentes técnicas cromatográficas com diferentes propriedades fornece combinação poderosa para a purificação de qualquer biomolécula (PHARMACIA., 1999). A quantidade e tipo de técnicas usadas dependerão da natureza e das características das amostras, assim como do grau de pureza desejado no produto final (PASECHNIK e PHLS, 1995).

Tabela 1- Técnicas de separação que podem ser usadas nas diferentes etapas do processo de purificação

Técnica de separação	Estágios ou etapas			
	Clarificação	Captura ou primeira purificação	Purificação intermediária	Polimento
Precipitação	★	★	★	
Centrifugação	★			
Homogenização	★			
Filtração	★			
Cristalização			★	
Sistemas aquosos bifásicos	★	★	★	
Cromatografia de troca iônica		★★★	★★★	★★★
Cromatografia com ligante específico (afinidade)		★★★	★★★	★★
Cromatografia por interação hidrofóbica		★★	★★★	★
Cromatografia por exclusão molecular			★	★★★
Diafiltração				★
Ultrafiltração				★
Cromatografia em fase reversa			★★	★★★

Fonte: MATEJTSCHUK et al. (1998), BROCKLEBANK (1990) e PHARMACIA... (1999).

Na escolha de técnicas cromatográficas, comumente, são empregados os critérios de recuperação, resolução, velocidade e capacidade (Tabela 2).

Tabela 2 - Parâmetros característicos das técnicas usadas no processo de purificação

Técnica	Capacidade	Velocidade	Resolução	Rendimento
Cromatografia por troca iônica	Alta -Média	Alta	Alta – Média	Médio
Cromatografia por interação Hidrofóbica	Média	Alta	Média	Médio
Focalização Isoelétrica	Baixa	-	Alta	Médio
Cromatografia por afinidade	Média- baixa	Alta	Muito Alta	Baixo
Cromatografia por exclusão molecular	Muito baixa	Média	Alta – baixa	Médio

Fonte: Adaptado de HARRIS e ANGAL (1995) e PHARMACIA... (1999).

3. TÉCNICAS USADAS NO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS

A purificação de determinada biomolécula envolve uma série de etapas convenientemente ordenadas, visando a obtenção do máximo de rendimento e pureza, além de custos compatíveis com os de mercado.

3.1. PRECIPITAÇÃO

A precipitação e conseqüente recuperação de proteínas solúveis, mediante a adição de reagentes ou de soluções, constitui técnica simples e rápida para a concentração de proteínas (TEOTIA et al., 2001). É muito empregada pelas indústrias como operação inicial no processo de purificação, reduzindo em grande parte o volume do meio racional para estágios posteriores (GLATZ, 1998). Essa técnica geralmente não é utilizada na recuperação de células presente em meios muito diluídos (CHISTI, 1998).

Algumas aplicações desta técnica são mostradas na Tabela 3.

Tabela 3 - Aplicações da precipitação com diferentes tipos de agentes precipitantes

Proteína	Agente precipitante	Referência
β-amilase	Alginato	TEOTIA et al., 2001
Lactoperoxidase	CMC	LALI et al., 2000
α-amilase	Alginato	SARDAR et al., 1998
Xilanase	Alginato	GUPTA et al., 1994
Endopoligalacturonase	Alginato	GUPTA et al., 1993
Proteínas do soro de leite exceto a β-Ig	Cloreto de ferro	KUWATA et al., 1985
Glicerol fosfato desidrogenase	(NH ₄) ₂ SO ₄	BENTLEY et al., 1973
Lisozima	Ácido poliacrílico	STERNBERG e HERSHBERG, 1974
Álcool oxidase	Polietilenoglicol	JANSSEN e RUELIUS, 1968

3.2. CENTRIFUGAÇÃO

As centrífugas são muito usadas em processo de escala piloto ou comercial para separar sólidos, desde caseínas, glutinas, leveduras, bactérias e células até meios fermentados contendo enzimas funcionais, anticorpos e proteínas terapêuticas. Diversas centrífugas comerciais estão disponíveis no mercado, que no entanto é dominado por dois fabricantes principais, a Westfalia separator AG (Oelde, Germany) e a Alfa Laval Separation (Tumba, Sweden) (MIDDELBERG e O'NEILL, 1998). Dentre outras aplicações, essa operação é utilizada na recuperação de isolados protéicos, proteínas dos processos de lavagem, separação de leveduras e clarificação de óleo animal (WESTFALIA, 2001). Além de ocupar pequena área na planta, as vantagens da centrifugação incluem: agilidade na separação, boa capacidade para retirar água, baixo custo de operação e capacidade para separar a maior parte de materiais celulares.

3.3. TECNOLOGIA DE MEMBRANAS

Os sistemas de separação por membranas foram usados durante muito tempo nos processos da indústria química, sendo depois empregados pela indústria de alimentos. As aplicações típicas na indústria de alimentos incluem a purificação da água, a concentração e a clarificação de sucos de frutas, de produtos lácteos, de bebidas alcoólicas e no tratamento de águas (SING e

HELDMAN, 1993). Nos sistemas de separação por membrana, o fluido contendo dois ou mais componentes é colocado em contato com uma membrana que permite a passagem seletiva de alguns componentes mais rápida do que de outros. A natureza física e química das membranas, por exemplo, o tamanho do poro e a distribuição do tamanho do poro, afetam diretamente a separação (Tabela 4).

Tabela 4 - Aplicação das diferentes membranas na separação de vários compostos

Compostos	Massa (Da)	Molecular Tamanho (nm)	Compostos retidos			
			OR	UF	MF	D
Leveduras	e	$10^3 - 10^4$			X	
Fungos						
Bactérias		$300-10^4$		-	X	X
Colóides		$100-10^3$		X	X	X
Vírus		30-300		X	X	X
Proteínas	$10^4 - 10^6$	2-10		X		X
Polissacarídeos	$10^4 - 10^6$	2-10		X		X
Enzimas	$10^4 - 10^6$	2-5		-	X	X
Antibióticos	$300 - 10^3$	0,6-1,2		-		-
Açúcares Simples	200 - 400	0,8-1,0		X		
Ácidos Orgânicos	100 - 500	0,4-0,8		X		
Íons Inorgânicos	10 - 100	0,2-0,4		X		

Fonte: FANE e RADOVICH (1990).

OR = Osmose Reversa, F = Ultrafiltração, MF = Microfiltração, D = Diálise

Os processos da tecnologia de membrana, divididos em osmose reversa (OR), ultrafiltração (UF), microfiltração (MF) e diálise (D) oferecem vantagens na recuperação de bioprodutos. Tais vantagens, segundo FANE e RADOVICH (1990), envolveu a facilidade no escalonamento dos equipamentos, o processo ocorre em temperaturas moderadas, o estresse químico e físico pode ser minimizado, elevada estabilidade e a concentração e a purificação pode ser obtidas em uma única etapa.

As membranas empregadas pela osmose reversa (OR) são caracterizadas pelo tamanho de corte de massa molecular de aproximadamente 100 Da, cujo processo envolve pressões 5 a 10 vezes maiores que a ultrafiltração (ROSENBERG, 1995). Na técnica de ultrafiltração (UF) a faixa de pressão varia de 70 a 700 kPa e o tamanho dos poros de 0,001 a 0,02 m, com ponto de corte

de 1000 a 80000 Da (SING e HELDMAN, 1993). A ultrafiltração está emergindo gradativamente como processo de biosseparação importante para a purificação e polimento de bioprodutos como drogas terapêuticas, enzimas, hormônios, anticorpos, etc. (SAKSENA e SIDNEY, 1994). A microfiltração (MF) constitui extensão da UF, porém as membranas apresentam tamanho de poro maior. As macromoléculas passam através da membrana, ficando retidos os colóides e as células (FANE e RADOVICH, 1990). O tamanho do poro varia de 0,2–2,0 μm , pode separar de forma seletiva as partículas com massa molecular acima de 200 kDa (ROSENBERG, 1995).

3.4. EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO USANDO SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS

A extração líquido-líquido convencional usando solução aquosa e solventes orgânicos não é adequada para separar biomoléculas (como proteínas), devido sua baixa estabilidade em solventes orgânicos (SUBRAMANIAM, 1998). A alternativa adequada para os processos tradicionais de biosseparações é a partição em sistemas aquosos bifásicos (SAB), que vem sendo usada com sucesso no isolamento de proteínas e de outros materiais de origem biológica (KULA et al., 1982, ALBERTSSON 1986). Os SAB resultam da incompatibilidade de dois polímeros em soluções, por exemplo polietilenoglicol (PEG) e dextrana ou entre um polímero e um sal (como PEG e fosfato de potássio). A incompatibilidade ocorre em função da concentração desses compostos (ALBERTSSON 1990; COIMBRA, 1995). A alta concentração de água (de 65% a 90%), em tais sistemas favorece a estabilidade das proteínas durante a separação, quando comparados com sistemas tradicionais compostos com solventes orgânicos (LI et al., 1997). Os sistemas PEG-sal têm sido usados para extração de enzimas em larga escala (HUSTED et al., 1985) por apresentarem baixo custo e elevada seletividade das proteínas α -lactoalbumina e β -lactoglobulina (COIMBRA et al., 1995; GIRALDO-ZUÑIGA et al., 2001). Outra vantagem dos SAB é reciclagem dos seus componentes (RITO PALOMARES et al., 1994). Extensa revisão de literatura sobre o assunto pode ser encontrada em COIMBRA et al. (2002).

3.5. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

As separações cromatográficas consistem na partição do soluto entre uma fase móvel e outra estacionária. Comumente, a fase estacionária é sólida, sendo formada por matriz de partículas empacotadas em coluna de forma tubular. A fase móvel que contém a mistura de componentes a serem separados passa através da coluna. A alimentação é introduzida na coluna como um pulso e os componentes individuais são separados devido sua distribuição diferencial entre as fases (DORSEY et al., 1998). Separações com altas resoluções podem ser obtidas pela mudança gradual na fase móvel, mediante o emprego de eluição em gradiente (NIVEN, 1995).

3.5.1 Cromatografia de Troca Iônica

Na cromatografia de troca iônica, a separação ocorre de acordo com a carga das biomoléculas. Foi constatado que esse é o método de purificação de proteínas mais comumente empregado. Além disso, é utilizada com muita efetividade pelas indústrias de bioquímica fina e farmacêutica, para o escalonamento dos processos de isolamento de proteínas (GERBERDING e BYERS, 1998).

Muitos tipos de adsorventes e colunas empregadas na cromatografia troca iônica encontram-se disponíveis no mercado. Como exemplo tem-se o sistema BioPilot da Pharmacia®, capaz de operar coluna preparativa (HR 50/10) com vazão de 30 mL/min e alimentação da amostra de até 4 g por ciclo (PASECHNIK e PHLS, 1995). Os processos em nível industrial que utilizam esse tipo de cromatografia para purificar as proteínas do soro de leite são o BiPRO® e os processos *Vistec* e *Spherosil* (ETZEL, 1995; MORR e HA, 1993). Algumas outras aplicações da cromatografia de troca iônica estão compiladas na Tabela 5.

Tabela 5 - Aplicações da cromatografia de troca iônica na separação de biomoléculas.

Biomolécula	Tipo de Resina	Referência
β -galactosidase	Accel Plus QMA®	PEREIRA, 1999
α -la, β -lg e BSA	Q-sepharose®, S-Sepharose®	GERBERDING E BYERS, 1998
α -la e imunoglobulina	S-Sepharose, Fractogel EMD, S-Hyper D-F	HAHN et al., 1998
β -lg	Celite –trans-retinal	HEDDLESON et al., 1997
BSA	Accel Plus QMA®	ARAÚJO, 1996
β -lactoglobulina	Celite –trans-retinal	WANG e SWAISGOOD, 1993
β -caseína	Mono S®	HOLLAR et al., 1991
α -la e β -lg	Mono Q®	MANJI et al., 1985

α -la: alfa-lactoalbumina, β -lg: betalactoglobulina e BSA: Albumina do soro bovino

3.5.2 Cromatografia por Interação Hidrofóbica (CIH)

A cromatografia por interação hidrofóbica (CIH) foi desenvolvida nos anos 1970 (RASSI et al., 1990) para a separação de proteínas, mediante o uso de colunas empacotadas com resinas de agarose modificada. Em 1980 foram desenvolvidas novas micropartículas para serem empregadas como fase estacionária, tornando possível a utilização da CIH mediante a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

A CIH, usada para separar proteínas com hidrofobicidade diferentes, é ideal para ser empregada na etapa de captura de biomoléculas ou no estágio de purificação intermédia (PHARMACIA BIOTECH, 1999). Fosfato de amônio ou sais de sulfato são efetivos para promover interações hidrofóbicas. Essa técnica em combinação com sistemas aquosos bifásicos também tem mostrado bons resultados na extração de proteínas a partir de um meio de células não clarificado (BROCKLEBANK, 1987).

Algumas aplicações da CIH podem ser observadas na Tabela 6.

Tabela 6 - Aplicações da CIH na separação de biomoléculas

Composto	Referência
α -amilase	LAUER et al., 2000
Estrogênio	HYDER et al., 1985
β -amilase	MILLER et al., 1985
Albumina e γ -globulina do soro humano	GOHEEN e MATSON, 1985
Lipoxidase	KATO et al., 1985
Glucose isomerase	KATO et al., 1986
Glucosidases	JOSIC et al., 1986

3.5.3 Cromatografia de Fase Reversa (CFR)

Mediante a utilização de cromatografia de fase reversa podem ser obtidas separações com elevada rapidez, ou seja, 20 segundos em alguns casos (MAA e HORVÁTH, 1988). O tempo rápido de separação auxilia o monitoramento de bioprocessos, que requer análises periódicas dos compostos mediante HPLC. A CFR é considerada técnica de alta resolução para a análise de proteínas, mas o seu uso em escala preparativa é limitado devido a não preservação que a integridade estrutural das proteínas (RASSI et al., 1990). Desta forma, a CFR é muito usada nos laboratórios de pesquisa, em laboratórios de análise de alimentos e no controle de qualidade. No entanto, pode ser empregada em processos de purificação de compostos biofarmacêuticos em grande escala.

As fases estacionárias usadas na CFR são estáveis em ampla faixa de pH (1 a 13) e adequadas para a separação de peptídios e proteínas. As fases móveis típicas empregadas são misturas orgânicas-aquosas, contendo metanol, isopropanol e acetonitrila dentre outros como modificadores orgânicos (TWEETEN e TWEETEN, 1986).

3.5.4 Cromatografia por Exclusão Molecular

Na cromatografia por exclusão molecular (CEM) a separação ocorre de acordo com o tamanho efetivo das moléculas. A coluna é recheada com material inerte cujo tamanho dos poros é controlado. As moléculas pequenas podem penetrar na maioria dos poros apresentando maior tempo de retenção, enquanto as maiores são excluídas de todos os poros. Assim, moléculas grandes movem-se rapidamente através da coluna e as pequenas são eluídas lentamente pela fase móvel (COLLINS et al., 1997, IRVINE, 1997).

A CEM é empregada há mais de quatro décadas como técnica de separação, dessalinização para estimar a massa molecular de peptídios e proteínas (IRVINE, 1997). O desenvolvimento de diferentes tipos de géis e a existência de colunas comerciais empacotadas contribuíram para melhorar a resolução das separações e também para diminuir o tempo de análise. Tal fato provocou rápido aumento no uso da CEM como técnica de separação e purificação de macromoléculas. A CEM também é usada para separar

monômeros, dímeros, trímeros, imunoglobulinas, anticorpos, produtos de reações de mistura complexa e diversas outras aplicações (RICKER e SANDOVAL, 1996).

3.5.5 Cromatografia em Leito Expandido

Na adsorção em leito expandido as partículas não são empacotadas firmemente na coluna (BRUCE et al., 1999). Esse tipo de cromatografia exige apenas uma etapa para purificar a proteína desejada a partir de meio “in natura”, sem precisar de clarificação inicial do meio, concentração ou purificação inicial (PHARMACIA..., 1999).

A fase estacionária do leito expandido é equilibrada, na forma expandida, com o tampão de equilíbrio (Figura 1). A amostra contendo as células é aplicada, no sentido de baixo para cima (2), no leito estabilizado. Desta forma, a proteína de interesse e alguns contaminantes adsorvem na resina, enquanto as células saem pela parte superior da coluna. O tempo para que a proteína alvo seja adsorvida depende do fluxo de aplicação da amostra, bem como da quantidade de resina utilizada na expansão (BRUCE et al., 1999). Após a aplicação da amostra, a resina é lavada de baixo para cima (3), com o tampão de lavagem, para remoção dos restos celulares e das proteínas não adsorvidas pela resina. A etapa de eluição da proteína de interesse (4) é efetuada de cima para baixo, ou seja, após sedimentação do leito. Em seguida, a coluna é limpa e regenerada para um novo uso (5). O propósito dessa tecnologia é combinar as etapas de clarificação e adsorção em uma só, a fim de aumentar o rendimento e diminuir o tempo de processo, os custos, etc.

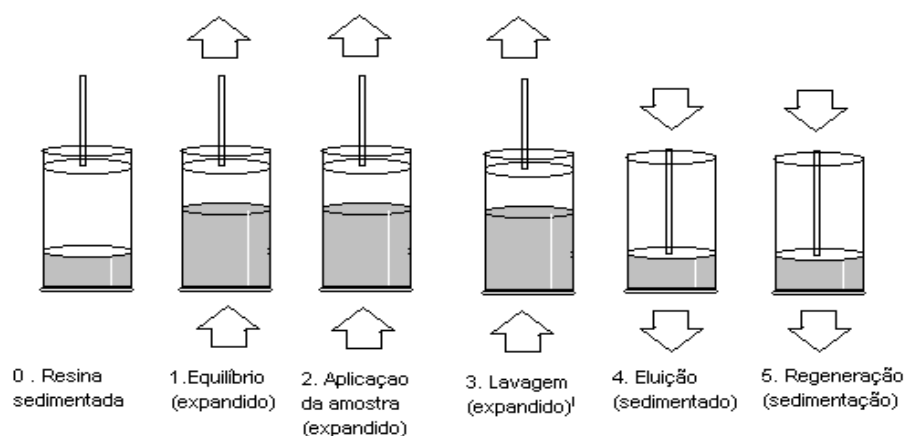


Figura 1 - Etapas de um sistema de purificação em leito expandido

A cromatografia em leito expandido pode substituir as etapas de clarificação e concentração do produto (PHARMACIA BIOTECH, 1999), que representam grande problema para as indústrias farmacêuticas.

3.6. SEPARAÇÕES BIOSELETIVAS

3.6.1 Cromatografia por Afinidade Química

A forma mais comum de efetuar separações bioseletivas é a cromatografia por afinidade. Pesquisas de dados da literatura revelam que dentre os métodos cromatográficos existentes, a cromatografia por afinidade é a segunda técnica mais comumente usada na purificação (CLONIS, 1990). Nessa técnica, os compostos (com afinidade pelo ligante) são imobilizados em matriz cromatográfica mediante ligação seletiva reversível do ligante com a molécula de interesse (NIVEN, 1995). É ideal para a captura ou purificação intermediária de biomoléculas, podendo ser usada sempre que houver ligante adequado para a proteína de interesse (PHARMACIA BIOTECH, 1999).

A especificidade oferecida pela cromatografia por bioafinidade pode ser aproveitada para conseguir biosseparações com elevado grau de seletividade (HEDDLESON et al., 1997). Para aumentar a eficiência dessa técnica, o material de suporte não deve ligar as proteínas não desejadas. Os sistemas de bioafinidade são os mais poderosos métodos de separação disponíveis, devido ao alto grau de resolução, capacidade e seletividade que se pode obter. Por essa razão são freqüentemente usados em escala preparativa para a purificação comercial de produtos farmacêuticos, de pesquisa e para a remoção de contaminantes específicos como as proteases (PHARMACIA BIOTECH., 1999).

3.6.2 Filtração por afinidade

O uso de interações por bioafinidade não se restringe apenas às colunas cromatográficas. Vários tipos de suporte podem ser usados para aumentar a seletividade de técnicas com baixa resolução na separação de biomoléculas, mediante a introdução de elementos de afinidade. Por exemplo na filtração por afinidade o ligante é anexado ao suporte que pode ser retido pela membrana de filtração. Em processo de dois estágios, o meio a ser purificado é misturado com o adsorvente e os contaminantes não ligados à matriz são removidos por filtração,

enquanto o complexo enzima-ligante permanece no retentado. A enzima é logo eluída e recuperada do permeado mediante segundo processo de filtração. LUCAS et al (1998) empregaram membranas de ultrafiltração modificadas com polietileno para separar seletivamente a proteína α -lactoalbumina a partir de concentrado protéico de soro de leite. Observaram separação seletiva de α -lactoalbumina, que ficou retida na membrana.

3.6.3 Precipitação por afinidade

A precipitação biosseletiva é possível mediante a utilização de ligantes específicos, que induzem a precipitação das proteínas de interesse ou pela imobilização de ligantes em transportadores poliméricos, os quais podem ser precipitados. Essa técnica apresenta alta seletividade e vem sendo usada com muito sucesso na purificação de diversas enzimas e proteínas (TEOTIA et al., 2001).

3.6.4 Separação de Proteínas por Afinidade em Sistemas Aquosos Bifásicos

Muitas proteínas apresentam interações únicas com pequenas moléculas, permitindo a alteração da partição e a obtenção de seletividade, cujo efeito é denominado de partição por afinidade. A extração seletiva com ligantes específicos imobilizados em um dos polímeros tem sido bastante efetiva (JOHANSSON e ANDERSSON, 1984).

A partição por afinidade usando ligante específico pode ser limitada somente a uma das fases do SAB, anexado ao principal polímero dessa fase. Usualmente, apenas uma fração do polímero que forma essa fase é usada como transportador do ligante (JOHANSSON, 1998; PERSSON et al., 1988).

SILVA et al. (1997) usaram o ligante específico APGP, acoplado ao PEG para purificar a enzima de *Kleuveromyces lactis*. Conseguiram recuperar 83% da enzima na fase superior do SAB composto por PEG-APGP/fosfato.

4. NOVAS TÉCNICAS DE SEPARAÇÃO

4.1 LEITO MÓVEL SIMULADO (LMS)

Uma série de colunas de adsorção (doze colunas, por exemplo), contendo adsorvente apropriado. As colunas são conectadas a recipientes que contêm a

alimentação e o eluente, que recebem as correntes de saída do produto através de linhas controladas por um conjunto de válvulas de posições múltiplas. Esse conjunto de válvulas controladoras permite que sejam alternados, em intervalos de tempo regulares, os pontos de entrada da alimentação, do eluente e das correntes de saída. O sistema troca portanto as posições entre os pontos de entrada e saída, simulando assim o escoamento em contra-corrente (STRUBE et al., 1997).

Em 1961 a United Oil Products (UOP) patenteou processo que permitia a simulação do movimento de um sólido por meio de conexão adequada entre as colunas (Figura 2). Esses sistemas cromatográficos contínuos têm sido utilizados em escala industrial, principalmente nas indústrias petroquímicas (Processos SORBEX e PAREX, desenvolvidos pela UOP) e de processamento de açúcares (LUDEMANN-HOMBOURGER et al., 2000). Na atualidade, o sistema de leito móvel simulado é empregado com muito sucesso nos processo de separação nas indústrias de alimentos e de química fina (AZEVEDO e RODRIGUES, 2000).

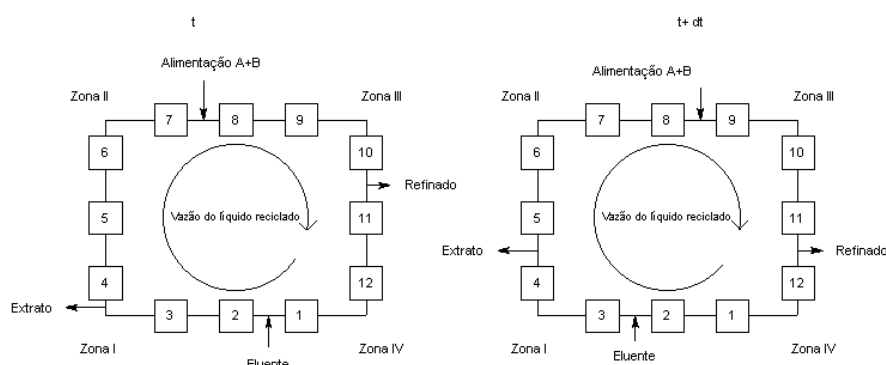


Figura 2 - Princípio do LMS de 12colunas (Fonte: LUDEMANN-HOMBOURGER ET AL., 2000).

O sistema de leito móvel simulado apresenta vantagens econômicas, por diversas razões, a relação aos outros sistemas cromatográficos em batelada. Trata-se de processo contínuo que permite a separação de mistura de compostos similares, possibilitando alta produção e baixo consumo de solvente. Em geral nesse tipo de sistema o volume de adsorvente necessário é aproximadamente 25% do requerido pela cromatografia em batelada (GOTTSCHLICH et al., 1996). No caso de enzimas, o LMS foi utilizado por HUANG et al. (1986) para a

purificação de tripsina a partir de extrato de pâncreas de porcos e por GOTTSCHLICH et al. (1996) para o estudo da purificação de quimotripsina bovina. GOTTSCHLICH e KASCHE (1997) também empregaram o LMS para a purificação de anticorpos monoclonais. Mais recentemente, AZEVEDO e RODRIGUES (2000) separaram frutose e glucose presentes em suco de caju, obtendo pureza ao redor de 90% de cada açúcar.

4.2 MICELAS REVERSAS

A extração líquido-líquido usando micelas de fase reversa, constitui nova técnica de separação que apresenta alta seletividade e facilidade no escalonamento, podendo ser operada continuamente (JARUDILOKRUL et al, 2000). A capacidade dos sistemas com micelas de fase reversa para extrair seletivamente a proteína alvo numa mistura de compostos, ainda não está completamente esclarecida. No entanto, sabe-se que pode ser influenciada por fatores como pH, tipo e concentração do sal, tipo de solvente, temperatura e concentração do surfactante e incorporação do ligante (ASHRAFIZADEH e KHOSHKBARCHI, 1998).

Na Tabela 7 são mostradas outras aplicações de extração com micelas de fase reversa

Tabela 7 – Aplicações das micelas reversas na extração de biomoléculas

Composto	Referência
BSA	ZHANG et al 2000
α -quimiotripsina	ASHRAFIZADEH e KHOSHKBARCHI, 1998
Lisozima, ribonuclease e citocromo c	JARUDILOKKUL et al., 2000
α -quimiotripsina	RABIE e VIERA, 1998
Lisozima, ribonuclease e citocromo c	POPPENBORG et al., 2000
Lisozima	JARUDILOKKUL et al., 2000b

4.3. CROMATOGRAFIA EM CONTRACORRENTE

A cromatografia em contracorrente originou-se dos estudos pioneiros de ITO et al. (1998), que construíram o primeiro equipamento no Japão. Esse foi projetado para separar partículas em suspensão ou solutos em solução com solvente, mediante campo de aceleração centrífuga. Pode ser definida como

técnica cromatográfica que emprega duas fases líquidas imiscíveis, sendo uma dessas distribuída longitudinalmente em tubo vazio de maneira uniforme. A outra passa através dos tubos, sendo misturada com a primeira fase (SHIBUSAWA et al., 1998). A fase estacionária e a fase móvel são líquidas, por exemplo para a separação de proteínas são usados, mais comumente, os sistemas aquosos bifásicos compostos de dois polímeros ou de um polímero e um sal (FOULCAULT e CHEVOLOT, 1998). Existem também outros sistemas de solventes usados na área de produtos naturais, ou seja, o sistema ternário composto por clorofórmio/metanol/água e o quaternário composto por hexano/acetato de etila/metanol/água.

A técnica da cromatografia em contracorrente foi aplicada com muito sucesso na separação de muitas biomoléculas, devido a alta capacidade de recuperação e facilidade no manuseio das amostras. Por exemplo OWEN e CHASE (1997) separaram lisozima através de cromatografia em contracorrente, utilizando um equipamento contínuo de quatro estágios. Estes pesquisadores conseguiram uma purificação contínua, com 95% de rendimento e 66% de pureza.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os avanços em biotecnologia representam potencial para a indústria de alimentos no desenvolvimento de novos produtos e processos. Esse desenvolvimento incluiria a purificação de biomoléculas, tais como enzimas e proteínas, a partir de meios complexos como os de fermentação ou de efluentes industriais. Assim, torna-se necessário o conhecimento das técnicas empregadas no processo de purificação de biomoléculas, sobretudo as técnicas cromatográficas. No entanto, deve-se considerar que ainda existem restrições técnicas e econômicas na aplicação de algumas destas técnicas, sobretudo em escala preparativa, mas isto não tem impedido que muitos laboratórios utilizem a cromatografia para a produção de substâncias com atividade biológica, de custo elevado no mercado, o que justificaria o emprego das técnicas cromatográficas na produção de alguns miligramas de substâncias com atividade biológica. Para que a purificação de biomoléculas de baixo valor comercial, em grande escala possa

ser economicamente viável novos desenvolvimentos na engenharia de processo e nas técnicas de separação devem ser realizados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALBERTSSON, P. A.; JOHANSSON, G.; TJERNELD, F. Aqueous two-phase separations. In: SEPARATION processes in biotechnology. New York: Juan Asenjo, 1990. p. 287-327.

ARAÚJO, M. O . D. **Adsorção de albumina de soro bovino em resinas trocadoras de íons**, Campinas, SP: FEQ, UNICAMP, 1996. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1996, 85p.

ASHRAFIZADEH, S.; KHOSHKBARCHI, M. Modeling and experimental data for the reverse micellar extraction of proteins using new surfactant. **Separation Science and Technology**, v. 33, p.2579-2595, 1998.

AZEVEDO, D. C. A.; RODRIGUES, A. Obtainment of high-fructose solutions from cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice by simulated moving-bed chromatography. **Separation Science and Technology**, v. 35, p. 2561-2581, 2000.

BENTLEY, P., DICKINSON, F. M., JONES, I. G. Purification and properties of rabbit muscle L-glicerol 3-phosphate dehydrogenase. **Biochem. Journal**. v. 135, p. 853-859, 1973.

BROCKLEBANK, M. P. Large scale separation and isolation of proteins. In: FOOD biotechnology, 1987a. p. 139-192.

BROCKLEBANK, M. P. Downstream processing plant and equipment. In: SEPARATION processes in biotechnology. New York: Juan Asenjo, 1990. p. 617-740.

BRUCE, L.J.; GHOSE, S.; CHASE, H.A. The effect of column verticality on separation efficiency in expanded bed adsorption. **Bioseparation**, v.8, p. 69-75, 1999.

BUCKE, C. The biotechnology of enzyme isolation and purification. In: PRINCIPLES of biotechnology. New York, 1983. p. 151-171.

CHISTI, Y. Strategies in downstream processing. In: BIOSEPARATION and bioprocessing a handbook., 1998. v. 2, p. 3-30.

- CLONIS, Y. D. Process affinity chromatography. In: SEPARATION processes in biotechnology. New York, 1990. p. 401-445.
- COIMBRA, J. S. R.; GIRALDO-ZUÑIGA, A. D.; LUIS A. M.; ANTONIO, J.A. MEIRELLES. **Uso de sistemas aquosos bifásicos na extração líquido-líquido**. Viçosa: UFV, 2002. (Série Caderno Didático, n. 95) (No prelo).
- COIMBRA, J. R.; TÖMMES, J.; MEIRELLES, A.J.; KULA, M.R. Performance of graesser contactor in the continuous extraction of whey proteins: Mixing, mass transfer and efficiency. **Bioseparation**, v. 5, p. 259-268, 1995.
- COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas: Unicamp, 1997. 279 p.
- CUSSLER, E.L.; DING, H. Bioseparation, especially using hollow fibers. In: BIOSEPARATION processes in foods. New York, 1995. p. 1-55.
- DORSEY, J. G.; COOPER, W.T.; SILES, A. A.; FOLEY, J. P.; BARTH, H.G. Liquid chromatography: theory and methodology. **Anal. Chem.**, v. 70, p. 59-64, 1998.
- ETZEL, M.R. Whey protein isolation and fractionation using ion exchangers. In: BIOSEPARATION processes in foods. New York, 1995. p. 389-415.
- FANE, A. G.; RADOVICH, A. M. Membrane Systems. In: **Separation processes in biotechnology**, edited by Asenjo, N.Y, 1990, p. 209-262.
- FOUCAULT, A.P.; CHEVOLOT, L. Counter current chromatography: instrumentation solvent selection and some recent applications to natural product purification. **Journal of Chromatography A**, v.808, p.3-22, 1998.
- GERBERDING, S.J.; BYERS, C.H. Preparative ion-exchange chromatography of proteins from dairy whey. **Journal of Chromatography**, v. 808, p.141-151, 1998.
- 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. **Cienc. Tecnol. Aliment.**, v. 3, n. 3, p. 149-155, 2001.
- GLATZ, C. E. **Precipitation**. In: Bioseparation and bioprocessing a handbook, Volume II. edited by Subramaniam, 1998. p. 329-356.
- GOHEEN, S. C., MATSON, R. S. Purification of human serum gamma globulins by hydrophobic interaction high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 326, p. 235-241, 1985.
- GOTTSCHLICH, N., WEIDGEN, S. E KASCHE, V. Continuoous biospecific affinity purification of enzymes by simulated moving-bed chromatography: theoretical

- description and experimental results. **Journal of Chromatography**, v.719, p. 267-269,1996.
- GOTTSCHLICH, N. E KASCHE, V. Purification of monoclonal antibodies by simulated moving-bed chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 765, p.201-207, 1997.
- GUPTA, M. N., GUOQIANG, D., MATTIASSON, B. Purification of endo-polygalacturonase by affinity precipitation using alginate. **Biotechnol. Appl. Biochem**, v. 18, p. 321-324, 1993.
- GUPTA, M. N., GUOQIANG, D., MATTIASSON, B. Purification of xylanase from *trichoderma viride* by precipitation with an anionic polymer eudragist S100. **Biotechnol. Tech**, v. 8, p. 117-122, 1994.
- HAHN, R., SHULZ, P. M., SCHAUPP, C., JUNGBAUER, A. Bovine whey fractionation based on cation-exchange chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 795, p.277-287, 1998.
- HARRIS, E. L., ANGAL, S. **Protein purification methods: a practical approach**. Press, Oxford, 1995. 317p.
- HEDDLESON, R. A., ALLEN, J. C., WANG, Q. W., SWAISGOOD, H. E. Purity and yield of beta-lactoglobulin isolated by an N-retinyl-Celite bioaffinity column. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n.7, p. 2369-2373, 1997.
- HOLLAR, C. M., LAW, A. J. R., DALGLEISH, D. G., ROWN, R. J. Separation and quantification of major casein fractions using cation-exchange fast protein liquid chromatography. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p.2403, 1991.
- HUANG, S.Y., LIN, C.K., CHANG, W.H. E LEE, W.S. Enzyme purification and concentration by simulated moving bed chromatography: an experimental study. **Chemical Engineering Communications**. 45, p. 291-295 1986.
- HUSTED, H., KRONER, K. H., MENGE, U., KULA, M.R. Partition in aqueous two-phase systems, **Trends Biotech**, v.3, n.2, p.139-144, 1985.
- HYDER, S. M., WIEHLE, R. D., BRANDT, D. W., WITTLIN, J. L. High performance hydrophobic interaction chromatography of steroid hormone receptor. **J. Chromatogra**. v.327, p. 237-246, 1985
- IRVINE, G. B. Size-exclusion high-performance liquid chromatography of peptides: a review. **Analytica Chimica Acta**, v.352, p. 387-397, 1997.
- ITO, Y., MATSUDA, K., MA, Y., QI, L. Toroidal coil counter-current chromatography study of the mass transfer rate of proteins in aqueous-aqueous polymer phase system. **Journal of Chromatography A**, v. 802, p. 277-283, 1998.

- JANSSEN, F. W., RUELIUS, H. W. Alcohol oxidase, a flavoprotein from several basidiomycetes species: crystallization by fractional precipitation with polyethylene glycol. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 151, p. 330-342, 1968.
- JARUDILOKKUL, S., POPPENBORG, L. H., STUCKEY, D. C. Selective reverse micellar extraction of three proteins from filtered fermentation broth using response surface methodology. **Separation Science and Technology**. v. 35, p. 503-517, 2000.
- JARUDILOKKUL, S., PAULSEN, E., STUCKEY, D. C (b). Lysozyme extraction from egg white using reverse micelles in a graesser contactor: mass transfer characterization. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 69, n.6, p.618-626, 2000.
- JOHANSSON, G., ANDERSSON, M. Liquid –liquid extraction of glycolytic enzymes from baker's yeast using triazine dye ligands. **Journal of Chromatography**, v. 291, p. 175-183, 1984.
- JOHANSSON, G. Affinity partitioning of proteins using aqueous two-phase systems. In: **Protein Purification, principles, high resolution methods and application**. Ed. Janson-Ryder. 695p, 1998.
- JOSIC, D., SHUTT, W., RENSWOUDE , J. V., REUTER, W. High performance liquid chromatographic methods for antibodies, glycosidases and membrane proteins. **Journal of Chromatography**, v. 353, p. 13-18, 1986.
- KATO, Y., KITUMARA, T., HASHIMOTO, T. Preparative high performance hydrophobic interaction of proteins on TSK gel phenyl-%PW. **Journal of Chromatography**, v. 333, p. 202-210, 1985.
- KATO, Y., KITUMARA, T., HASHIMOTO, T. New resin based hydrophobic support for high performance hydrophobic interaction chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 360, p. 260-265, 1986.
- KULA, M. R., KRONER, K. H., HUSTED, H. Purification of enzymes by liquid-liquid extraction. **Adv. Biochem. Engn**, v. 24, p.73-118, 1982.
- KUWATA, T., PHAM, A., NAKAI, S. Elimination of β -lactoglobulin from whey to simulated human milk protein. **J. Food Science**. v. 50, p 605-609, 1985.
- LALI, A., ARUNA, N., JOHN, R., THAKRAR, D. Reversible precipitation of proteins on carboxymethyl cellulose. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 777-785, 2000.
- LAUER, I., BONNEWITZ, B., MEUNIER, A., BEVERINI, M. New approach for separating *Bacillus subtilis* metalloprotease and α -amylase by affinity chromatography and for purifying neutral protease by hydrophobic chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 737, p. 277–284, 2000.

- LI, M., ZHU, Q. Z., MEI. Partitioning of amino acids by aqueous two-phase systems combined with temperature-induced phase formation. **Biotechnology Progress**, v.13, n.1, p.105-108,1997.
- LUCAS, D., RABILLER-BAUDRY, M., MILLESIME, L., CHAUFER, B., DANUFIN, G. Extraction of α -lactalbumin from whey protein concentrate with modified inorganic membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 148, p. 1-12, 1998.
- LUDEMANN-HOMBOURGER, O., NICOUD, R. M., BAILLY, M. The "VARICOL" process: a new multicolumn continuous chromatographic process. **Separation Science and Technology**. v. 35, p.1829-1862, 2000.
- MAA, Y. F., HORVÁTH, C, S. Rapid analysis of proteins and peptides by reversed- phase HPLC with polymeric micropellicular sorbents. **Journal of Chromatography**, v. 445, p. 71-86, 1988.
- MANJI, B., HILL, A., KAKUDA, Y., IRVINE, D. M. Rapid separation of milk proteins by anion exchange chromatography. **Journal of Dairy Science**. v. 68, p.3176-3179, 1985.
- MATEJTSCHUK, P., BAKER, R. M., CHAPMAN, G. E. Purification and characterization of monoclonal antibodies. In: **Bioseparation and Bioprocessing** a Handbook, Volume II. edited by Subramaniam, 1998. p. 234-253.
- MIDDELBERG, A. P, J., O'NEILL, B. K. Harvesting Recombinant Protein Inclusion Bodies. In: **Bioseparation and Bioprocessing** a Handbook, Volume II. edited by Subramaniam, 1998. p. 81-129.
- MILLER, N, T., FEIBUSH, B., KARGER, B. L. Wide-pore silica-based ether bonded phases for separation of proteins by high performance hydrophobic interactions and size exclusion chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 316, p. 519-536, 1985.
- MORR, C., HA, E. W. Whey protein concentrates and isolates processing and functional properties critical reviews. **Food Science and Nutrition**, v.33, n.6, p.431-476, 1993.
- NIVEN, G. W. Separation processes for biotechnology in the food industry. In: **Food processing: recent developments**. Elsevier Science. N.Y, 1995, p. 143-195.
- OWEN. R, CHASE. H. A. Direct purification of lysozyme using continuous expanded bed adsorption. **Journal of Chromatography A**, v. 757, p. 41-49, 1997.
- PASECHNIK, V. A., PHLS, J, M. Large-scale extraction and purification of enzymes and other proteins. In: **Handbook of Enzyme Biotechnology**. Edited by Wiseman. N.Y. 1995. p.31-82.

- PEREIRA, J. A. M. **Adsorção de *beta-galactosidase de Scopulariopsis sp.* em resina trocadora de íons objetivando a purificação e a ampliação de escala**, Campinas, SP: FEQ, UNICAMP, 1999. Dissertação (Doutorado), Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1999, 138p
- PERSSON, L. O., OLDE, BJORN. Synthesis of atp-polyethylene glycol and Atp-dextran and their use in the purification of phosphoglycerate kinase from spinach chloroplast using affinity partitioning. **Journal of Chromatography**, v. 457, p. 183-193, 1988.
- PHARMACIA BIOTECH, **Protein purification handbook**, Sweden, 97p, 1999.
- POPENBORG, L. H., BRILLIS, A. A., STUCKEY, D. C. The kinetic separation of protein mixtures using reverse micelles. **Separation Science and Technology**. v. 35, p.843-858, 2000.
- RABIE, H. R., VIERA, J, H. A simple model for reverse micellar extraction of proteins. **Separation Science and Technology**. v. 33, p.1181-1193, 1998.
- RASSI, E, AZ, LEE, A, L., HORVÁTH, C. Reversed-phase and hydrophobic interaction chromatography of peptides and proteins. In: Separation processes in biotechnology. Edited by Asenjo, 1990. p.447-494.
- RICKER, R. D., SANDOVAL, A. A. Fast, reproducible size-exclusion chromatography of biological macromolecules. **Journal of Chromatography**, v. 743, p.43-50, 1996.
- RITO-PALOMARES, M., HUDDLESTON, J. G., LYDDIATA, A. PEG-phosphate aqueous two-phase partitioning polymer recycling in practical implementation. **Trans I. Chem**, v. 72, p. 11-13, 1994.
- ROSENBERG, M. Current and future applications for membrane processes in the dairy industry. **Trends in Food Science & Technology**. v. 6, p. 12-16, 1995.
- SAKSENA, A., ZYDNEY, A. L. Effect of solution pH and ionic strength on the separation of albumin from immunoglobulins by selective filtration. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 43, p 960, 1994.
- SARDAR, M., GRUPTA, M. N. Alginate beads as an affinity material for α -amylases. **Bioseparation**, v. 7, p. 159-165, 1998.
- SHIBUSAWA. Y, KIHIRA S, ITO Y. One-step purification of proteins from chicken egg white using counter current Chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 709, p. 301-305, 1998.

- SILVA, M.A.E.; PELLOGIA, C.; PIZA, F. A.T.; FRANCO, T. T. Purification of three different microbial β -galctosidase by partitioning in aqueous two phase systems. **Ciênc. Tecnol. Alimen**, v. 17, n. 3, p. 219-223, 1997.
- SINGH, R. P.; HELDMAN, D. R. **Introduction to food engineering**. 2nd ed. San Diego, USA: Academic Press. 1993. 499p.
- STERNBERG, M., HERSHBERGER, D. Separation of protein with polyacrylic acids. . **Biochim. Biophys. Acta**, v. 342, p. 195-206, 1974.
- STRUBE, J., ALTENHONER, U., MEURER, M., SCHMIDT-TRAUB, H., SCHULTE, M. Dynamic simulation of simulated moving bed chromatographic processes for the optimization of chiral separations. **Journal of Chromatography**, v. 769, p. 81-92, 1997.
- SUBRAMANIAM, G. **Bioseparation and Bioprocessing**. New York, 1998. v.2, 474p.
- TEOTIA, S., KHARE, S. K., GUPTA, M. N. An efficient purification process for sweet potato beta-amylase by affinity precipitation with alginate. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 792–795, 2001.
- TWEETEN, K. A., TWEETEN, T. N. Reversed-phase chromatography of proteins on resin-based wide-pore packings. **Journal of Chromatography**, v. 359, p. 111-119, 1986.
- WANG, Q. W., SWAISGOOD, H. E. Characteristics of beta-lactoglobulin binding to the all –trans-retinal moiety covalent immobilized on celite(Tm). **Journal of Dairy Science**, v. 76, n.7, p.1895-1901, 1993.
- WESTFALIA. <http://www.gea-westfalia.be/> **2001** (capturado em 01 de dezembro do 2001).
- ZHANG.T., LIU, H., CHEN, J. Affinity-based reversed micellar bovine serum albumin (BSA) extraction with unbound recative Dye. **Separation Science and Technology**, v. 35, p.143-151, 2000.

3. Conclusões Gerais

Diante dos resultados obtidos no presente estudo pode-se concluir:

- 1 - A técnica de cromatografia de troca iônica utilizando a resina Accell Plus QMA® e com diferentes gradientes mostrou ser efetiva na adsorção seletiva e conseqüentemente na separação das proteínas α -la e β -lg do soro de queijo.
- 2 - Utilizando como fase móvel uma solução salina de fosfato de potássio 1,37 M, é possível promover a dessorção das proteínas α -la e β -lg da resina. Obteve-se uma recuperação da ordem de 71% e 81% para α -la e β -lg, respectivamente.
- 3 - A estratégia de purificação desenvolvida mediante a integração das técnicas de cromatografia de troca iônica, sistemas aquosos bifásicos e a cromatografia de exclusão molecular foi eficiente na separação e purificação das proteínas α -la e β -lg a partir de uma solução de isolado protéico de soro de queijo. As purezas obtidas mediante este processo foram de 97% para β -lg e 93% para α -la.
- 4 - Uma análise financeira preliminar permitiu observar que o projeto de implantação de uma unidade de purificação de proteínas de soro de queijo com uma capacidade para processar 5904 litros de soros por dia têm um elevado grau de atratividade. Apresentou uma taxa de retorno de capital inferior a três anos e uma taxa interna de retorno superior a 35%.