

**ADENILSON ABRANCHES MONTEIRO**

**SÍNTESE DE HIDROXIAPATITA E SUA APLICAÇÃO NA  
SEPARAÇÃO DE  $\beta$ - LACTOGLOBULINA E DE  $\alpha$ -  
LACTOALBUMINA DO SORO DE LEITE**

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

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2008**

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

T

M775s Monteiro, Adenilson Abranches, 1971-  
Síntese de hidroxiapatita e sua aplicação na separação de

2008  $\beta$ -lactoglobulina da  $\alpha$ -lactoalbumina do soro de leite /  
Adenilson Abranches Monteiro. – Viçosa, MG, 2008.  
xvi, 63f.: il. ; 29cm.

Orientador: Sebastião César Cardoso Brandão.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f. 58-63.

1. Proteína do soro de leite. 2. Hidroxiapatita - Absorção  
e Adsorção. 3. Proteína do soro de leite - Centrifugação.  
4. Cromatografia a líquido. 5. Proteína do soro de leite -  
Filtração. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 660.2842

**ADENILSON ABRANCHES MONTEIRO**

**SÍNTESE DE HIDROXIAPATITA E SUA APLICAÇÃO NA  
SEPARAÇÃO DE  $\beta$ - LACTOGLOBULINA E DE  $\alpha$ -  
LACTOALBUMINA DO SORO DE LEITE**

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

APROVADA: 9 de junho de 2008.

---

Prof. Antônio Fernandes de Carvalho  
(Co-Orientador)

---

Prof. Sebastião Tavares de Rezende  
(Co-Orientador)

---

Prof<sup>a</sup>. Jane Sélia dos Reis Coimbra

---

Prof. Juraci Alves de Oliveira

---

Prof. Sebastião César Cardoso Brandão  
(Orientador)

Dedico este trabalho,

À Rosilene, pelo carinho, e a nossos filhos Clara,  
Lívia e Gabriel, pela alegria de constituir uma  
família feliz, amo vocês!

Ao meu Pai, Ademir Monteiro “in memoriam” que  
sonhou com este momento ... Saudades!

À minha mãe e meus irmãos, pelos exemplos e  
constante estímulo,

Ao Daniel Falkoski, exemplo de amizade e  
paciência. Existem amigos que são como irmãos.  
Deus lhe abençoe!!

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por manter sempre o meu caminho iluminado.

À minha mãe, Dolores, exemplo de coragem e determinação, que permitiu, juntamente com a família, que alcançasse vãos mais ambiciosos em minha vida.

Ao meu pai, Ademir Monteiro, por me ensinar o valor do trabalho e das coisas simples da vida.

À minha esposa, Rosilene, meus filhos, Clara, Lívia e Gabriel, em meio a tantas viagens souberam entender as minhas ausências ... amo vocês!!!

Aos meus irmãos, Ademir (Mirim), Ademilson, Adailson, Dorinha, Dóris, Dorilene, Dorenice, Doraliza e Dorilayne, pela amizade, confiança e lealdade.

Ao Professor Sebastião César Cardoso Brandão, pela orientação e exemplo de profissionalismo.

Ao Professor Sebastião Tavares de Rezende, pela co-orientação e pela disponibilização do Laboratório para a execução de muitas etapas deste trabalho.

Ao Professor Antônio Fernandes, pela co-orientação e amizade.

Ao Daniel Falkoski, pela amizade, exemplo de paciência, sabedoria e humildade. Com você aprendi mais sobre a vida do que sobre ciência.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade concedida para a realização desse curso.

À CEDAF/UFV que acreditou e permitiu a concretização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

A Professora Maria Goreti Oliveira de Almeida, por disponibilizar o Laboratório de Enzimologia para a execução de muitas etapas cruciais deste trabalho.

Ao Professor Juracy de Miranda Castro, pelas correções e sugestões que certamente contribuíram muito para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao Professor Maurício Fontes, pelas análises de difração raio X.

A Professora Andréa Borges, pelo fornecimento do padrão de hidroxiapatita utilizado na pesquisa.

Aos amigos dos Laboratórios de Análises de Leite e Derivados: Maurício, Ana Cláudia, Lívia, Maria Patrícia, Luana, Juliana, Yara, Fabiana e Cláudia pela

amizade e pela companhia nas horas difíceis.

Às amigas: Ana Clarissa, Emiliane, Patrícia Bernardes, Gerusa e Mirella pelos estudos e aprendizados juntos.

À Patrícia Pinheiro, pela ajuda nas interpretações dos espectros de infravermelho da hidroxiapatita e principalmente pela amizade.

À Angélica, Solange, Liliane, Camila, Fabrícia, Eduardo e Sr. Fausto, pela amizade e paciência a mim conferida no BIOAGRO.

A Fraternidade Pequena Via, pelas orações e amizades.

A Maíra Nicolau de Almeida, pela compreensão, exemplo de serenidade e amizade.

E finalmente, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução desse trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

## **BIOGRAFIA**

ADENILSON ABRANCHES MONTEIRO, filho de Ademir Tadeu Monteiro e Dolores Abranches Monteiro, nasceu na cidade de Viçosa, Minas Gerais, em 17 de abril de 1971, casado com Rosilene Cardoso Barbosa Monteiro, três filhos: Clara, Lívia e Gabriel.

Em fevereiro de 1995, formou-se Tecnólogo em Laticínios pela Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Em abril de 1998, concluiu-se o curso de Pós Graduação: Especialização – Didática - Fundamentos Teóricos da Prática Pedagógica, na Faculdade São Luís, Jaboticabal, São Paulo, Brasil.

Em fevereiro de 2005, formou-se em Bacharel em Ciência e Tecnologia de Laticínios pela Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Iniciou o Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos em agosto de 2005, em nível de Mestrado, na Universidade Federal de Viçosa. Submetendo-se à defesa de dissertação em 9 de junho de 2008.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	viii
LISTA DE QUADROS .....	x
RESUMO .....	xi
ABSTRACT .....	xiii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1. Soro de leite .....	3
2.2. Proteínas do soro .....	4
2.2.1. A $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) .....	6
2.2.2. A $\alpha$ -lactalbumina ( $\alpha$ -La) .....	8
2.2.3. A albumina de soro bovino (BSA) .....	9
2.2.4. A Imunoglobulinas (Igs) .....	11
2.2.5. A Lactoferrina .....	12
2.2.6. Outras proteínas e enzimas .....	12
2.3. Tecnologias usadas no processo de separação de proteínas do soro de leite .....	13
2.4. Cromatografia por adsorção em Hidroxiapatita .....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	18
3.1. Testes preliminares .....	18
3.2. Obtenção do soro de leite .....	20
3.3. Preparo do soro de leite .....	20
3.4. Preparo da Hidroxiapatita .....	21
3.5. Determinação da natureza da hidroxiapatita .....	24
3.5.1. Espectroscopia de infravermelho .....	23
3.5.2. Difração de raio X (DRX) .....	23
3.5.3. Microscopia eletrônica de varredura da HA .....	23
3.6. Metodologias realizadas no experimento para a separação das proteínas do soro de leite .....	24
3.6.1. Método 1: Cromatografia de adsorção em coluna de hidroxiapatita das proteínas do soro de leite .....	25
3.6.1.1. Preparo da coluna de hidroxiapatita .....	25

3.6.1.2. Separação das proteínas do soro de leite por cromatografia de adsorção em coluna de HA.....	25
3.6.2. Método 2: Separação das proteínas do soro por adsorção em HA seguido de centrifugação .....	27
3.6.3. Método 3: Separação das proteínas do soro de leite por adsorção em HA seguido de filtração a vácuo.....	30
3.7. Determinação de proteínas pelo método Bradford .....	32
3.8. Determinação de lactose pelo método de DNS.....	33
3.9. Eletroforese em gel de acrilamida e sulfato dodecil de sódio (SDS-PAGE).....	34
3.0. Análises dos resultados.....	35
4. RESULTADOS E DISCUSÃO.....	36
4.1. Resultados da caracterização da HA.....	36
4.1.1. Espectroscopia de infravermelho.....	36
4.1.2. Difração de raios X (DRx).....	38
4.1.3. Microscopia eletrônica de varredura da HA.....	39
4.2. Testes preliminares da cromatografia.....	40
4.3. Método 1: Resultado da cromatografia líquida de adsorção em coluna de HA.....	43
4.4. Método 2: Resultado da separação das proteínas do soro de leite por adsorção em HA seguido de centrifugação .....	48
4.4.1. Adsorção de proteínas do soro de leite seguido de centrifugação.....	49
4.5. Método 3: Separação das proteínas do soro por adsorção em HA seguido de filtração a vácuo.....	51
4.6. Recuperação das proteínas totais pelos três métodos.....	54
4.7. Recuperação da $\alpha$ – lactoalbumina pelos três métodos.....	55
4.8. Recuperação da $\beta$ - lactoglobulina pelos três métodos.....	55
5. CONCLUSÕES.....	57
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura cristalográfica de uma hidroxiapatita.....	17
Figura 2: Representação da cromatografia de adsorção em coluna de HA .....	19
Figura 3: Fluxograma de obtenção do soro de leite e preparação para a separação das proteínas.....	21
Figura 4: Fluxograma da síntese da HA a partir da reação do cloreto de cálcio com fosfato monobásico de sódio.....	22
Figura 5: As três metodologias: 1 – Cromatografia de Adsorção em HA; 2 – Adsorção das proteínas de soro em HA seguido de Centrifugação; 3 – Adsorção das proteínas de soro em HA seguido de Filtração a Vácuo.....	24
Figura 6: Fluxograma de separação das proteínas do soro de leite por cromatografia de adsorção em coluna de HA.....	26
Figura 7: Fluxograma das etapas de separação das proteínas do soro de leite por adsorção em hidroxiapatita seguida da centrifugação.....	29
Figura 8: Fluxograma das etapas de separação das proteínas do soro de leite por Adsorção em Hidroxiapatita seguido de Filtração a Vácuo.....	31
Figura 9: Análise de espectroscopia de infravermelho.....	37
Figura 10: Difratoograma do compósito de HA sintética.....	39
Figura 11: Micrografias eletrônicas de varredura de HA sintetizada. Visualização das estruturas cristalográficas da HA.....	40
Figura 12: Perfil cromatográfico qualitativo da separação das proteínas do soro de leite por cromatografia de adsorção em coluna de HA.....	42
Figura 13: Resultado do perfil cromatográfico das proteínas do soro de leite em coluna de hidroxiapatita.....	44
Figura 14: Perfil eletroforético (SDS-PAGE) das proteínas separadas em cromatografia de adsorção de proteínas em HA.....	46

Figura 15: Média e desvio padrão da recuperação das proteínas do soro em HA seguida de centrifugação .....50

Figura 16: Perfil eletroforético (SDS-PAGE) das proteínas separadas por adsorção de em HA seguido de centrifugação .....51

Figura 17: Média e desvio padrão da recuperação das proteínas do soro em HA seguida de filtração a vácuo .....52

Figura 18: Perfil eletroforético (SDS-PAGE) das proteínas separadas por adsorção de em HA seguido de filtração a vácuo .....52

## LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 - Distribuição das principais proteínas de soro do leite bovino ...4
- Quadro 2 – Algumas propriedades físico-químicas das proteínas do soro de leite.....6
- Quadro 3 - Eficiência da HA na adsorção seguida de centrifugação .....48
- Quadro 4 - Valores médios em percentagens das recuperações das proteínas totais extraídas pelos três métodos de separação .....54
- Quadro 5 - Valores médios em percentagens das recuperações da  $\alpha$  - lactalbumina extraídas pelos três métodos de separação .....55
- Quadro 6 – Valores médios em percentagens das recuperações da  $\beta$  - lactoglobulina extraídas pelos três métodos de separação.....56

## RESUMO

MONTEIRO, Adenilson Abranches, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Abril de 2008. **Síntese de Hidroxiapatita e sua Aplicação na Separação de  $\beta$ - Lactoglobulina e de  $\alpha$ - Lactoalbumina do Soro de Leite.** Orientador: Sebastião César Cardoso Brandão. Co-orientadores: Antônio Fernandes e Sebastião Tavares de Rezende.

O objetivo do trabalho foi sintetizar a hidroxiapatita, para separar a  $\beta$  - lactoglobulina e  $\alpha$  - lactoalbumina do soro de leite, obtido da fabricação de queijo Minas, por cromatografia de adsorção em hidroxiapatita. A hidroxiapatita é um fosfato de cálcio pertencente à família de apatitas com fórmula química  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Ca}(\text{OH})_2$  com grande capacidade de adsorver proteínas. A presença de proteínas de alta qualidade no soro e com diversas aplicações na indústria de alimento, tem sido um fator atraente para a recuperação das mesmas, e ainda, contribuir na redução da poluição ambiental quando o soro é descartado de forma inadequada em mananciais. Os componentes do soro de leite, se isolados, podem ser usados na indústria de alimentos com alto valor agregado, como matéria prima de formulados, podendo também ser empregado nas indústrias de cosméticos, farmacêutica, nas áreas médicas e nutricionais. Foram utilizados três métodos de adsorção diferentes para separação de proteínas: 1) a cromatografia líquida em coluna de hidroxiapatita; 2) a adsorção das proteínas do soro seguido de centrifugação; 3) e a adsorção seguido de filtração a vácuo, buscando técnicas alternativas e de baixo custo para separar os componentes do soro de leite. A cromatografia líquida em coluna foi realizada adicionando o soro de leite em coluna de hidroxiapatita, onde foi aplicado a eluição seqüencial com tampão fosfato de sódio em diferentes concentrações e pH, promovendo a dessorção das proteínas adsorvidas na coluna de hidroxiapatita. A adsorção das proteínas do soro de leite seguido de centrifugação e filtração a vácuo, também foi feito a eluição seqüencial com os mesmos tampões da cromatografia líquida em coluna, porém em processo descontínuo de dessorção. A cromatografia foi a metodologia que apresentou melhor recuperação e separação da  $\alpha$  - lactoalbumina que teve um melhor desempenho dinâmico em colunas verticais, sendo eluídas com tampão fosfato de sódio 400 mM, pH 5,0. A adsorção das

proteínas seguido de centrifugação apresentou melhor recuperação da  $\beta$  – lactoglobulina quando eluídas no tampão fosfato de sódio 400 mM, pH 6,0 e 7,0. Considerando a recuperação total de proteínas, a cromatografia de adsorção em coluna e adsorção seguida de centrifugação pelas análises estatísticas, apresentaram melhor desempenho na recuperação total das proteínas com valor de 91,0 % de rendimento. A adsorção das proteínas seguido de filtração a vácuo apesar de ter tido boa separação das proteínas, nas condições do experimento, foi a que apresentou menor rendimento na recuperação total das proteínas equivalente a 73,7 %.

## ABSTRACT

MONTEIRO, Adenilson Abranches, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2008. **Synthesis of Hidroxyapatite and its Applicability for the Separation of  $\beta$ - Lactoglobulin and  $\alpha$ - Lactoalbumin of Whey Milk** Adviser: Sebastião César Cardoso Brandão. Co-advisers: Antônio Fernandes and Carvalho e Sebastião Tavares de Rezende.

The objective of this study was to synthesize hidroxyapatite and to use it to separate  $\beta$  - lactoglobulin and  $\alpha$  - lactoalbumin of milk whey through adsorption chromatography. Hidroxyapatite is a calcium phosphate belonging to the family of apatites with a chemical formula  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Ca}(\text{OH})_2$ , with great capacity of proteins adsorption. The presence of high quality proteins in whey and their various applications in food industry has been an attractive aspect for their recovering, besides contributing to reduce the environmental pollution. The isolated whey proteins can be used in the food industry as basic ingredient for formulations because of its high value; moreover, it can be used in cosmetic and pharmacy industries, including medical and nutritional areas. Three different methods of adsorption were used for the separation of the proteins: 1) continuous liquid adsorption chromatography in hidroxyapatite columns; 2) batch adsorption of proteins of whey milk followed by the centrifugation; 3) and batch adsorption followed by vacuum filtration, searching for alternative techniques at a low cost to separate the components of whey. The continuous liquid adsorption chromatography was done by adding the whey in a prepared hidroxyapatite column, where sequential elution with buffer sodium phosphate in different concentrations and pH was applied, causing desorption of the proteins adsorbed in the hidroxyapatite column. In the adsorption of the proteins of whey followed by the centrifugation and vacuum filtration, sequential elution was also done with the same buffers of liquid chromatography in column, however in a discontinuous process of desorption. The continuous adsorption chromatography was the method that best showed the recovering and separation of  $\alpha$  – lactoalbumin. This protein had the best dynamic performance in vertical columns, being eluted with 400 mM, pH 5,0 sodium phosphate buffer. The adsorption of proteins followed by centrifugation showed best recovering of  $\beta$  – lactoglobulin when eluted in the 400 mM, pH 6,0 e 7,0 sodium phosphate buffer. Considering the total recuperation of proteins, the

adsorption chromatography in columns and the adsorption followed by centrifugation, showed best performance in the recovering of proteins, 91,0 % in the total recovering yield . The adsorption of proteins followed by vacuum filtration, despite having good separation of proteins, under the experimental conditions, showed the least total recovering yield, 73,7 %.

## 1. INTRODUÇÃO

O soro de leite apresenta composição variada, sendo afetada pelo tipo de queijo de que se origina, pelo processamento e pelo manuseio dentro da indústria. Sua composição é, em média, de 0,9% de proteínas, 4,9% de lactose, 0,6% de sais minerais, 0,3% de gordura e 93,3% de água (SANTANA et al., 2005).

Por muito tempo, por causa da concentração baixa de seus componentes e limitações dentro dos processos técnicos industriais e operações unitárias, o soro foi considerado como resíduo a ser usado na alimentação de animais ou para descarte. Quando o soro de leite é descartado como efluente industrial em cursos de água, provoca um grande efeito poluidor, pelo fato de apresentar demanda bioquímica de oxigênio ( $DBO_5$ ) muito elevada. A  $DBO_5$  de um litro de soro varia de 30.000 a 60.000 mg.  $L^{-1}$  (MACHADO et al., 2002).

A adequação das indústrias de laticínios às exigências dos órgãos de controle do meio ambiente e saúde pública, tem resultado em pesquisas sobre métodos de tratamento do soro de leite e no seu aproveitamento. (PAULA, 2005).

Os componentes do soro, se isolados, podem ser usados na indústria de alimentos, com alto valor agregado, podendo também ser utilizados nas indústrias de cosméticos, farmacêutica e áreas médicas. O desenvolvimento de estratégias de mercado e o advento de novas tecnologias têm permitido aproveitar melhor o soro nos processos industriais, como matéria prima de formulações, na concentração e na separação de seus componentes (ROSSANO et al., 2001).

As proteínas do soro possuem propriedades físico-químicas de grande interesse tecnológico como: solubilidade, absorção e retenção de água e de gordura, capacidade emulsificante, capacidade espumante e gelificante, formação de filmes comestíveis e biodegradáveis. Em biotecnologia, proteínas como a  $\alpha$ -lactalbumina, vem sendo estudada e aplicada como nanotubos protéicos, melhorando propriedades sensoriais e aceitação de novos produtos alimentícios. Os nanotubos de proteínas também podem ser aplicados no

encapsulamento de produtos farmacêuticos, embalagens, e na formação de mini géis transparentes (IPSEN et al., 2007).

Dentre os diversos processos descritos na literatura, a cromatografia de adsorção em hidroxiapatita (HA) tem potencial para separar as proteínas do soro de leite, podendo ser um método alternativo e de baixo custo.

A HA, fase estacionária da cromatografia de adsorção, pode ser sintetizada a partir de reações químicas com cloreto de cálcio, fosfato bibásico de sódio, hidróxido de sódio e cloreto de sódio em substituição a outros materiais sólidos adsortivos que possuem elevados custo no mercado.

Assim, neste trabalho, foram estudadas três metodologias de adsorção em hidroxiapatita, buscando a separação da  $\alpha$  – lactoalbumina e  $\beta$  – lactoglobulina, que representam 70% do total das proteínas do soro de leite. O método da cromatografia líquida em coluna de hidroxiapatita, aplicado neste trabalho, foi baseado em experimentos descrito por Rossano et al (2001), com algumas alterações, deixando o método com o custo mais baixo. A adsorção seguida de centrifugação e de filtração a vácuo foram os outros métodos desenvolvidos neste trabalho para a separação das proteínas do soro. Os métodos foram comparados entre si, avaliando a maior recuperação total de proteínas, melhor recuperação da  $\alpha$  – lactoalbumina e melhor recuperação da  $\beta$  – lactoglobulina.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Soro de leite

O soro de leite é um subproduto da fabricação de queijos, que contém proteínas, lactose, minerais e vitaminas. Cerca de 85 a 90% do volume de leite utilizado na fabricação de queijo resulta em soro. De acordo com a Instrução Normativa 16 (IN 16 / 2005) do Ministério da Agricultura, o soro é o líquido residual obtido a partir da coagulação do leite destinado à fabricação de queijos ou de caseína.

O soro pode ser usado como ingrediente para a elaboração de vários alimentos, pois possui excelente balanço de aminoácidos essenciais, cálcio, vitaminas e lactose (TEXEIRA et al., 2005). As proteínas do soro geralmente ultrapassam os níveis de todos os aminoácidos essenciais da proteína de referência da FAO (PORTER, 1978 citado por PAULA, 2005).

A composição química do soro varia muito conforme o tipo de queijo produzido. Em geral, podemos dizer que a composição é de aproximadamente, 93,1% de água, 4,9% de lactose, 0,9% de proteínas, 0,6% de sais minerais, 0,3% de gordura, 0,2% de ácido láctico e pequenas quantidades de vitaminas.

A utilização do soro de leite e seus derivados em formulações infantis, dietas especiais, produtos de panificação, produtos lácteos e misturas em pó revela sua ampla aplicação na indústria, resultando no aumento de sua demanda e na positiva contribuição para o estado nutricional dos consumidores (PAULA, 2005). Diversos produtos contendo soro de leite são comercializados atualmente, como bebidas lácteas, leites fermentados, sucos, além da produção de ricota (SANTOS et al., 2001).

A produção de concentrado protéico (CPS) ou de isolado protéico de soro (IPS) é destinada à utilização como ingrediente de elevada funcionalidade. A concentração de proteínas varia entre 34-80% nos concentrados protéicos e concentrações superiores a 90% nos isolados (CAPITANI, 2004).

## 2.2. Proteínas do soro

As proteínas de soro de leite bovino representam cerca de 20% das proteínas totais do leite, sendo as duas principais a  $\beta$  - lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) e a  $\alpha$  - lactalbumina ( $\alpha$ -La). Além destas, são encontradas em menores proporções a albumina de soro bovino (BSA), imunoglobulinas (Igs), peptonas, lactoferrina, transferrina, lisozima e enzimas (CAPITANI, 2004).

As quantidades relativas das principais proteínas do soro de leite bovino são mostradas no Quadro 1.

**Quadro 1** - Distribuição das principais proteínas de soro do leite bovino.

Proteínas do soro (g/L)	Leite bovino
- Proteínas totais	5,6
$\beta$ -lactoglobulina	3,2
$\alpha$ -lactalbumina	1,2
Albumina sérica bovina (BSA)	0,4
Imunoglobulinas	0,7
Lactoferrina	0,1
Lisozima	Presença

Fonte: SGARBIERI (2005).

As proteínas do soro de leite apresentam características estruturais bem diferentes, com boa capacidade de gelificação, emulsificação, formação de espuma, elaboração de filmes e cápsulas protetoras, excelente valor nutritivo e várias propriedades fisiológicas importantes, tornando-as potencialmente úteis em várias aplicações tecnológicas (MODLER, 2000; WONG et al., 1996; SGARBIERI, 2005).

Por apresentarem excelente composição em aminoácidos essenciais, alta digestibilidade e biodisponibilidade, portanto elevado valor nutritivo (PINHEIRO et al., 1991, SGARBIERI, 2005; ZINSLY et al., 2001). Desta maneira, as proteínas do soro de leite podem ser usadas em aplicações nutricionais, como fórmulas enterais e infantis, na forma de proteínas íntegras ou pré-digeridas, visando ganho de peso e recuperação do estado nutricional,

para pacientes pós-cirúrgico, geriátricos e imobilizados. Em alimentos de baixo conteúdo calórico, elas podem se usadas como substituto da gordura, ou para formulações de alimentos e bebidas saudáveis, sendo aplicadas como proteínas hidrolisadas. (CAPITANI, 2004).

A  $\beta$ -Lg é a proteína mais abundante no soro de leite bovino, e também, a mais alergênica e antigênica. Ela pode causar alergia em segmentos mais sensíveis da população, principalmente crianças (ROUVINEN et al., 1999; SÉLO et al., 1999). A  $\alpha$ -La, albumina de soro bovino (BSA), imunoglobulinas, lactoferrina e lisozima, predominam no soro de leite humano, sendo as proteínas que oferecem maior proteção à saúde (MEINTOSH et al., 1998).

As imunoglobulinas e albumina de soro bovino (BSA), conhecidas como soroalbuminas, ocorrem em quantidades pequenas no soro de leite e, provavelmente, se originam do sangue, por permeação através do epitélio mamário (VEISSEYRE, R. 1972).

O conhecimento das diferenças estruturais e das propriedades físico-químicas das proteínas do soro é indispensável para a compreensão do comportamento tecnológico e funcional, nutritivo e fisiológico dessas proteínas, como parte de um sistema alimentício.

As estruturas terciárias das proteínas do soro são bem conhecidas, com as formas secundárias em  $\alpha$ -hélice e folhas  $\beta$  alternadas com segmentos de estrutura primária. São menos resistentes ao tratamento térmico, sofrendo vários graus de desnaturação em temperaturas acima de 60 °C. Apresentam excelentes propriedades funcionais, incluindo solubilidade em toda a faixa de pH (MODLER, 2000; SGABIERI, 2005).

No Quadro 2 apresenta algumas propriedades físico-químicas das proteínas do soro de leite.

**Quadro 2** – Algumas propriedades físico-químicas das proteínas do soro de leite

	<b>β-Lg</b>	<b>α-La</b>	<b>BSA</b>	<b>Igs</b>
<b>Concentração no soro (g/L)</b>	3,2	1,2	0,4	0,7
<b>Ponto isoelétrico (pI)</b>	5,14 e 5,41	4,80	4,70 e 4,80	5,50 e 8,30
<b>Massa molar (kDa)</b>	18,20 e 18,36	14,14 e 14,17	66,26	153,0 e 901,0
<b>Nº de ligações dissulfídicas</b>	2	4	17	15 ou mais
<b>Temperatura de desnaturação (°C)</b>	74	63	87	79

\* β-Lg: β-lactoglobulina; α-La: α-lactoalbumina; BSA: albumina do soro bovino; Igs: imunoglobulinas.

\* Fonte: CAPITANI, (2004); SGARBIERI, (2005)

### **2.2.1. A β-lactoglobulina (β-Lg)**

A β-Lg é uma proteína globular de massa molar 18.362 Da para a variante genética A e 18.276 Da para a variante genética B, contendo 162 resíduos de aminoácidos. Possui duas pontes de dissulfeto, sendo que uma delas é sempre encontrada ligando os resíduos 66 e 160 e a outra aparece em igual distribuição entre os resíduos 106 e 119 ou entre 106 e 121. Essa é uma situação não usual em estruturas protéicas e pode conferir propriedades de ligação singular para a β-Lg (SGARBIERI, 2005).

A estrutura particular da β-Lg, do tipo lipocalina, forma uma espécie de cálice de caráter hidrofóbico que lhe confere propriedades funcionais de grande aplicação na indústria de alimentos, como capacidade de emulsificação, formação de espuma, geleificação e relações com aroma e sabor (MORR & FOEGEDING, 1990). A estrutura da β-Lg contribui para que ela seja uma proteína bastante estável em ampla faixa de pH, apresentando, porém, diferentes estados de associação. A β-Lg pode passar por cinco transições induzidas pelo pH, na faixa de 1 a 13 (TAULIER & CHALIKIAN, 2001). Na faixa de pH 1 a 2 a β-Lg sofre mudanças estruturais, porém retém, em grande parte, a sua estrutura secundária. A segunda transição ocorre na faixa de pH entre 2,5 e 4,0, verificando-se a passagem de dímero a monômero. Entre pH 4,5 e 6,0 ocorrem pequenas mudanças na estrutura terciária, sem alteração significativa na estrutura secundária. A quarta transição ocorre entre pH 6,5 e 8,5, conhecida como transição de Tanford, que é acompanhada por alterações localizadas das estruturas secundária e terciária, sem mudança na

conformação global da proteína. Por último, a quinta transição ocorre entre os valores de pH 9 e 12,5, identificada como desnaturação alcalina, e resulta na ruptura de qualquer estrutura dimérica nativa, transformando-se em monômeros desdobrados, num processo irreversível (TAULIER & CHALIKIAN, 2001).

Modificações reversíveis da  $\beta$ -Lg iniciam-se ao redor de 50 °C e irreversíveis, acima de 60°C. Acima de 65° C, esta proteína sofre desnaturação térmica acompanhada de transição conformacional que expõe seus grupamentos altamente reativos SH e  $-\text{NH}_2$  (CARPITANI, 2004).

Em pH neutro, o aquecimento origina, em primeiro lugar, a monomerização da proteína dimerizada (nativa), seguida de perda da conformação globular compacta. Essa estrutura passa para um estado intermediário de maior flexibilidade e maior volume, com aumento de grupos hidrofóbicos expostos, seguida de associação intermolecular, por meio de pontes dissulfeto e interações hidrofóbicas (PALAZOLO et al., 2000; PHOTCHANACHAI & KITABATAKE, 2001).

De acordo com SGARBIERI (2005), os seguintes fenômenos ocorrem durante tratamento térmico da  $\beta$ -Lg, em solução:

Dímero  $\longleftrightarrow$  Monômeros  $\longleftrightarrow$  Flexibilização da estrutura terciária (“molten globule state”)  $\rightarrow$  Agregação

Durante o pré-aquecimento do leite longa vida, ocorre a desnaturação das proteínas do soro, expondo os grupos sulfidrílicos da  $\beta$ -lactoglobulina que interagem com a  $\kappa$ -caseína. O complexo  $\kappa$ -caseína-  $\beta$ -lactoglobulina confere maior termo-estabilidade durante tratamentos térmicos subseqüentes, além de tornar o produto mais viscoso. Esse fenômeno é muito importante do ponto de vista tecnológico na produção de leite longa vida e leite concentrado (FOX, 2003).

A  $\beta$ -Lg é uma proteína totalmente solúvel em água, comportando-se como uma solução límpida e estável na faixa de pH entre 3,0 a 8,0, podendo ser utilizada na fortificação de bebidas e sucos de frutas, devido à sua grande solubilidade e estabilidade (MONTEIRO, 2005).

### 2.2.2. A $\alpha$ -lactalbumina ( $\alpha$ -La)

A  $\alpha$ -La possui duas variantes genéticas (A e B), porém, somente a variante genética B tem sido encontrada em leite das raças bovinas ocidentais. A variante genética B contém 123 resíduos de aminoácidos, com massa molar de 14.176 Da (SGARBIERI, 2005).

A  $\alpha$ -La tem forte tendência de formar associações em pH abaixo de seu ponto isoelétrico (4,8), que é a propriedade mais característica desta proteína. No pH 6,6, que é o pH natural do leite, e valores acima, ela apresenta-se como monômero, na sua estrutura terciária, tendo a forma de um elipsóide, com uma profunda fenda dividindo a molécula em dois lobos. Apresenta quatro ligações dissulfídicas, embora não sejam essenciais para manter a estrutura terciária da proteína (SGARBIERI, 2005).

A  $\alpha$ -La tem alta afinidade pelo  $\text{Ca}^{2+}$  e outros íons metálicos como  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Al}^{3+}$ . O  $\text{Ca}^{2+}$  é ligado pela ponte dissulfeto Cys 73-Cys 91. Entre os ligantes estão incluídos: dois oxigênios de cadeia da Lys 79 e do Asp 84, três oxigênios das carboxilas do Asp 82, Asp 87 e Asp 88 e duas moléculas de água (SEGAWA & SUGAI, 1983). O sítio de ligação localiza-se bem no interior da região da fenda e a ligação do cálcio funciona na estabilização da proteína contra a desnaturação térmica (STUART et.al., 1986). Estudos de calorimetria diferencial de varredura (DSC) mostraram que  $\alpha$ -La em solução sofre desnaturação reversível a 64° C e irreversível quando aquecida em mistura com  $\beta$ -lactoglobulina e soralbumina bovina (BSA). No tratamento térmico severo, que causa ruptura das ligações dissulfeto, os grupos sulfidrílicos livres reagem com grupos semelhantes da  $\beta$ -LG, formando ligações intermoleculares. A  $\alpha$ -La é solúvel na faixa de pH 4,5 a 5,5, mas abaixo de pH 4,0 e acima de 5,5 suas moléculas associam-se em dímeros e trímeros (LOURENÇO, 2000).

Como a maioria dos componentes do leite, a  $\alpha$ -La é sintetizada nas glândulas mamárias. Ela funciona como proteína “modificadora” da especificidade da enzima D-glicose 4- $\beta$ -galactosil transferase, que é responsável pela síntese da lactose nas glândulas mamárias. Na ausência de  $\alpha$ -La, a enzima transfere galactose, preferencialmente, da UDP-galactose para

a N-acetilglicosaminil-glicoproteína, mesmo na presença de glicose, uma vez que a transferência da galactose para a glicose é lenta. Na presença de  $\alpha$ -La, a transferência de galactose para a glicose é rápida, tornando a glicose o substrato preferencial da enzima. Teoricamente, a reação ocorre por dois mecanismos: na ausência de  $\alpha$ -LA e na presença de  $\alpha$ -La (FOX, 2003; EBNER & MCKENZIE, 1972).

A  $\alpha$ -La do leite bovino é rica em triptofano, sendo apropriada na elaboração de alimentos infantis e, provavelmente, com mais baixo custo (MONTEIRO, 2005). A  $\alpha$ -La do leite bovino é muito semelhante à do leite humano, sendo que, no leite materno, representa a maior porcentagem protéica de sua composição. Hipóteses indicam que não é alergênica e, por isso, pode ser usada em fórmulas infantis. Sua função biológica, como parte da enzima galactosil transferase, consiste em participar da biossíntese de lactose, a qual é importante fonte de energia para os recém-nascidos. Em pH abaixo de 4,0, ela se desdobra e se torna suscetível à digestão pela pepsina no estômago (CARPITANI, 2004).

Recentemente, foi demonstrado que a  $\alpha$ -La desempenha função importante na prevenção de úlcera gástrica causada por etanol absoluto e por estresse (MATSUMOTO et al. (2001), citado por SGARBIERI (2005)) e que esta função seria exercida por meio do estímulo à produção de prostaglandinas. EUGENE e BERLINER (2000) citam diversos trabalhos, mostrando que a  $\alpha$ -La humana, em condições específicas de pH e na presença de ácido oléico, polimeriza-se e adquire a propriedade de apoptose (capaz de destruir células cancerígenas de várias linhagens e células jovens não diferenciadas), não tendo nenhuma ação sobre células adultas normais.

### **2.2.3. A albumina de soro bovino (BSA)**

Corresponde aproximadamente de 13% das proteínas do soro. A albumina de soro bovino (BSA) foi cristalizada a partir do leite bovino apresentando composição e propriedades físicas semelhantes às da albumina do soro de sangue bovino (POLIS et al., 1950). A BSA tem conformação nativa globular, solúvel em água, formada por uma cadeia polipeptídica com

aproximadamente 580 resíduos de aminoácidos e apresenta a massa molar de 66,2 kDa e ponto isoelétrico (pI) entre pH 4,7-4,8. Em pH abaixo do pI apresenta alterações em suas propriedades físicas e químicas, como aumento da viscosidade, volume molecular e redução acentuada de solubilidade. Sua estrutura secundária é formada de 54%  $\alpha$ -hélice, 40% de estruturas  $\beta$  (folhas e giros  $\beta$ ) com três domínios específicos para ligação de íons metálicos, de lipídios e de nucleotídios, respectivamente. A quantidade de estrutura em  $\alpha$ -hélice varia com o pH, de 54, 44 e 35% nos pHs 3,6, 3,9 e 2,7, respectivamente (SGARBIERI, 2005).

A BSA atua como proteína carreadora no transporte de moléculas apolares em fluídos biológicos. Essa proteína passa para o leite através do sistema vascular, por uma rota semelhante à das imunoglobulinas, e está presente em elevada concentração em leite de vaca com mastite (MONTEIRO, 2005).

A desnaturação da BSA do leite, pelo tratamento térmico, é benéfica para o homem, pois a sua forma ativa é desencadeadora de agressão auto-imune a diversos sistemas, como as células beta do pâncreas, produtoras de insulina. A BSA desnaturada perde sua ação agressora e reduz o risco de doenças auto-imunes, da aterosclerose e da diabete insulino-dependente. ([www.pratiqueleite.com.br/content.php?rec\\_id=2787 & type=A](http://www.pratiqueleite.com.br/content.php?rec_id=2787&type=A), publicado 20/06/2004 e acessado 23/11/2007).

A BSA possui duas características estruturais importantes: a presença de um grupo sulfidrílico livre, resíduo 34 do peptídeo N-terminal e a existência de 17 ligações dissulfeto na molécula. O rompimento dessas ligações resulta em modificações de algumas de suas propriedades físicas e estruturais, em especial do perfil de sedimentação na ultracentrifugação, das propriedades imunológicas e do perfil de solubilidade em função do pH.

No estado nativo apresenta elevada solubilidade na faixa de pH 1,5 - 8,0; quando as ligações dissulfeto são rompidas aparece uma região de solubilidade mínima entre pH 3,5 - 5,0 que se amplia com o aumento do número de ligações rompidas (SGABIERI, 2005).

#### 2.2.4. A Imunoglobulinas (Igs)

As imunoglobulinas formam uma família heterogênea de glicoproteínas, com elevada massa molar e que apresentam propriedades físicas - químicas e imunológicas diversas, destacando-se como anticorpos (MONTEIRO, 2005). As imunoglobulinas ocorrem no soro sanguíneo e em outros fluidos corporais. Aparecem em elevada concentração no colostro e servem para transmitir imunidade passiva aos recém-nascidos. Todas as imunoglobulinas são monômeros ou polímeros formados de unidades de quatro cadeias polipeptídicas: duas cadeias curtas com aproximadamente 20 kDa de massa molar e duas cadeias longas de 50 a 70 kDa de massa molar, ligadas por pontes dissulfeto. Três classes de imunoglobulinas (Igs) foram identificadas em bovinos: IgG ( $G_1$  e  $G_2$ ), IgA e IgM. Todas são encontradas no soro sanguíneo e no leite bovino (BRUNNER, 1977; CARPITANI, 2004).

As imunoglobulinas IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>2</sub> o soro sanguíneo de bovino, ocorrem em igual proporção e em concentração relativamente elevada, comparada com a do leite. A IgG<sub>1</sub> é a que se apresenta em maior concentração no leite e parece ser transportada seletivamente do soro sanguíneo para o leite. No colostro, a concentração de IgG<sub>1</sub> é bastante alta, representando a metade das proteínas totais do soro. A IgG<sub>2</sub> está presente tanto no colostro como no leite em concentração mais baixa. As Igs existem essencialmente como monômeros, contendo na molécula 2 a 4% de carboidrato e massa molar de aproximadamente 160 kDa (BRUNNER, 1977; SGABIERI, 2005).

A IgA apresenta propriedades antigênicas distintas das Igs G e M. A IgA do leite difere da do soro sanguíneo por estar ligada a uma glicoproteína e é reconhecida como fator secretor livre. A IgA apresenta-se como dímero com massa molar de aproximadamente 400 kDa, contendo 8-9% de carboidratos (SGABIERI, 2005).

A IgM ocorre no leite em concentrações relativamente baixas, é uma macroglobulina, sendo provavelmente homóloga à IgM de outras espécies. Aparece na forma de pentâmero com massa molar de aproximadamente 900 kDa, contendo 12% de carboidratos (CARPITANI, 2004; SGABIERI, 2005).

### **2.2.5. A Lactoferrina**

Lactoferrina é uma glicoproteína que liga fortemente dois moles de ferro por mole de proteína, também considerada como uma metalproteína com aproximadamente 86,1 kDa de massa molar. Apresenta-se com uma cor salmão-vermelha, quando em solução. Sem o ferro ligado à apolactoferrina em solução, apresenta-se incolor. É uma proteína básica com pI em torno de pH 8. Seu comportamento eletroforético é heterogêneo tanto em géis alcalinos como ácidos, provavelmente em razão de sua forte tendência de formar produtos de interação. Com o ferro ligado, apresenta resistência ao calor e à ação química ou enzimática (SGABIERI, 2005).

A remoção da porção glicídica resulta em perda da capacidade de ligação de  $Fe^{+3}$ . A comparação da seqüência das duas metades da molécula mostra 125 resíduos de aminoácidos idênticos. A estrutura terciária apresenta, em cada metade, dois lobos, lobo N (metade N-terminal, resíduo 1 a 333) e lobo C (metade C-terminal, resíduo 345 a 691). A interação entre os dois lobos envolve um agrupamento de cadeias hidrofóbicas.

O sítio de ligação para o ferro está localizado na cavidade existente entre os domínios 1 e 2 de cada lobo. O sítio de Fe no lobo C aparece em ambiente mais fechado, conseqüentemente o Fe do sítio do lobo C é comparativamente mais estável. O microambiente em que se encontram os sítios de ligação do Fe é predominantemente polar.

A lactoferrina possui, entre as suas funções biológicas, a capacidade de fixação de  $Fe^{+3}$ . Em virtude de sua habilidade de quelar o  $Fe^{+3}$ , exerce atividade bacteriostática, similares àquelas da lisozima e da peroxidase (MONTEIRO, 2005). No intestino, a lactoferrina exerce a função imunoestimulatória e age como fator de crescimento e maturação dos enterócitos (MCINTOSH et al., 1998).

### **2.2.6. Outras proteínas e enzimas**

No soro do leite, também está presente, o caseino-macropeptídeo (CMP), que é um peptídeo derivado da caseína. Na fabricação de queijo, o

leite é submetido ao tratamento com a enzima quimosima, que hidrolisa a k-caseína em dois peptídeos. A clivagem ocorre entre os aminoácidos 105 (fenilalanina) e 106 (metionina), liberando um peptídeo C-terminal solúvel de, aproximadamente, 6,8 kDa de massa molar, denominado CMP, e um peptídeo insolúvel, denominado para-k-caseinato N-terminal, de 12,3 kDa. O peptídeo para-k-caseinato contém os aminoácidos 1 a 105 e se torna parte do queijo, enquanto o CMP, contendo os aminoácidos 106 a 169, permanece solúvel no soro (DAMODARAN, 1997).

Algumas proteínas menores também desempenham papel importante nas propriedades funcionais do soro. A fração proteose-peptona consiste de fragmentos proteolíticos de  $\beta$ -caseína, contendo peptídeos de superfície ativa. Também são encontradas enzimas, como a lactoperoxidases, fosfatase alcalina, lipases, catalase, oxidase sulfidrílica, proteases e plasmina (MONTEIRO, 2005).

### **2.3. Tecnologias usadas no processo de separação de proteínas do soro de leite por adsorção**

Muitas tecnologias têm sido desenvolvidas para viabilizar a comercialização de componentes do soro de leite, como por exemplo, osmose reversa, ultrafiltração, microfiltração, eletrodialise, cromatografia de troca iônica, cromatografia de exclusão molecular e ou a combinação de algumas delas. A maioria destas permite a separação e a concentração de proteínas, sem que ocorra a desnaturação, e tem como objetivo produzir produtos protéicos com atributo específicos na composição e funcionalidade para aplicação na nutrição humana (MODLER, 2000; CARPITANI, 2004).

A seleção e combinação de técnicas de separação são muito importantes para desenvolver estratégias de purificação. A disponibilidade de diferentes opções cromatográficas fornece combinação poderosa para a purificação de qualquer biomolécula. 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 (ZUÑIGA, 2003).

Algumas técnicas de separação de proteínas têm sido desenvolvidas como processos alternativos e de baixo custo, envolvendo a adsorção em suportes sólidos. A precipitação de proteínas por coacervação com carboidratos complexos tem sido um processo alternativo de adsorção e de grande interesse para a indústria de laticínios a fim de se obter concentrados e isolados protéicos. O processo adsorptivo na coacervação é decorrente das forças intermoleculares destacando as forças eletrostáticas e as ligações de hidrogênio. Carpitani *et al* (2006) utilizou o polissacarídeo carboximetilcelulose (CMC) na interação e fracionamento das proteínas do soro de leite, além de estudos das propriedades funcionais dos complexos formados. No trabalho foi citado que o hidroximetilcelulose (HMC) resultou num efeito similar quanto à recuperação das proteínas do soro de leite, sendo o HMC mais eficiente na precipitação da  $\beta$ - lactoalbumina do que o CMC.

Fonseca *et al.* (2001) realizaram um trabalho com a goma xantana por coacervação que resultou em alta precipitação protéica em baixas proporções de proteínas em relação à quantidade de carboidrato. Nas condições testadas, melhor performance para o fracionamento protéico foi obtida em pH próximo a 4,5. O processo resultou no fracionamento da  $\alpha$  – lactoalbumina e da  $\beta$  – lactoglobulina, principais proteínas presentes no soro de leite.

Fujimoto *et al* (2002), estudaram a adsorção de quitosana, polissacarídeo obtido pela desacetilação de quitina, e da proteína albumina bovina sérica (BSA) sobre as superfícies recobertas com CMC - carboximetilcelulose. A quitosana possui muitas aplicações tecnológicas e é utilizada, por exemplo, no tratamento de efluentes industriais devido à sua facilidade de interagir com as partículas coloidais e devido, também, à presença de grupos amino em suas cadeias, o que confere a esse polímero um potencial de coagulação maior que o dos coagulantes usuais.

CHAGAS *et al* (2007) efetuou em seu trabalho um estudo cinético, em banho finito, para se avaliar preliminarmente a capacidade de adsorção das proteínas do soro de queijo coalho para o adsorvente Streamline DEAE, em uma resina de troca iônica, que demonstrou resultados com boa capacidade de separação das proteínas.

## 2.4. Cromatografia por Adsorção em Hidroxiapatita

Fosfatos de cálcio pertencem à família de apatitas biocompatíveis e existem várias fases como a hidroxiapatita, com a fórmula química  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Ca}(\text{OH})_2$ , a brushita, com a fórmula  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e fosfato tricálcico, com a fórmula  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (SOUSA et al., 2007).

A hidroxiapatita (HA) é um material cerâmico bioativo. Apresenta similaridade química com a fase mineral do osso humano e por isso, a HA tem sido reconhecida como substituinte ósseo mais importante nas áreas de ortopedia, odontologia e em implantes artificiais, com alta compatibilidade para a reparação de perdas de tecidos ósseos (ARAÚJO et al., 2007; SOUZA et al., 2007).

A HA tem grande aplicação no fracionamento e purificação de proteínas de alta e média massa molar e enzimas. TISELIUS et al (1956) descreveram que, em 1861, colunas de fosfato de cálcio já eram usadas por Brucke, na purificação de pepsina, por adsorção e eluição. Esse tipo de separação é muito importante em cromatografia preparativa.

A cromatografia em coluna de HA oferece uma opção para separações de proteínas, em função da natureza, tamanho e interação das moléculas com o material da coluna.

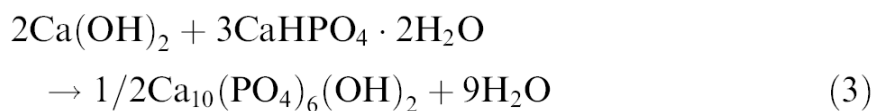
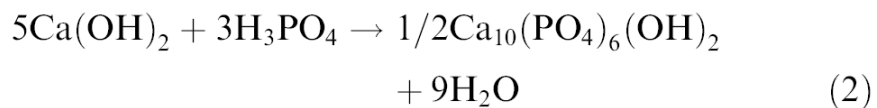
Experimento realizado por VOGT (1997) evidenciou o melhor desempenho da cromatografia de troca aniônica comparada à cromatografia de adsorção em HA, porém tem elevado custo e necessita de equipamento mais sofisticado.

A cromatografia em HA vem sendo usada como método simples de purificação da ricina, composto tóxico da mamona na elaboração de bio – diesel, sendo um método mais simples e rápido que outros métodos em que se utilizam filtração em gel ou cromatografia de troca iônica. A ricina isolada por este método, chamada ricina-E, possui menor toxidez que a tradicional ricina-D, isolada através de colunas de Sepharose (SEVERINO, 2005).

As HAs podem ser sintetizadas por vários métodos, incluindo rotas convencionais tais como reações do estado sólido e rotas químicas baseadas na precipitação a baixa temperatura. SOUZA et al (2007) utilizaram três rotas de síntese, entre elas, uma utiliza 5,48 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  mais 8,74 g de brometo de

cetiltrimetilamônio, usado como direcionador, misturados com 100 mL de água deionizada e o pH da solução ajustado para 12,0 com hidróxido de sódio 1 mol.L<sup>-1</sup>. Eles misturaram 7,13 g de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O a 60 mL de água deionizada. Esta solução foi gotejada lentamente à solução de fosfato, produzindo uma suspensão leitosa; em seguida refluxada a 120 °C por 24 horas. O produto foi seco 100 °C por 24 horas.

Saito (2001) sintetizou a hidroxiapatita a partir do hidróxido de cálcio e ácido fosfórico, através das seguintes reações:



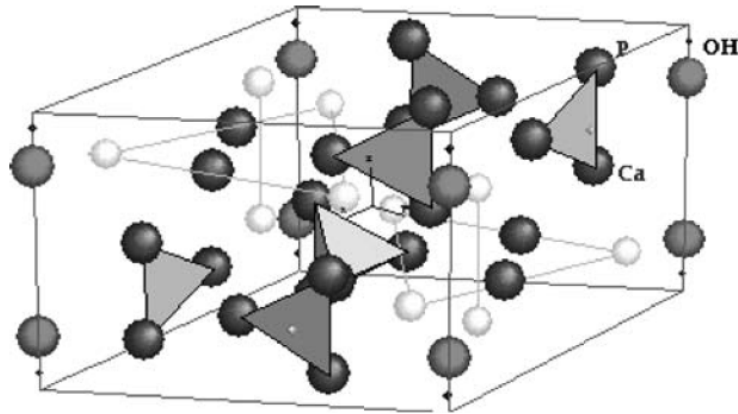
LACERDA et al (2006), produziram a HA a partir da co-precipitação de volumes iguais de soluções aquosas de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 1M e (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,6M em pH>10 e meio amoniacal à temperatura ambiente e sob agitação constante. O precipitado foi filtrado a vácuo com água deionizada quente, acetona e éter de petróleo. Posteriormente, foi seco em estufa e calcinado ao ar à temperatura de 800 °C.

A HA utilizada na adsorção das proteínas é um adsorvente de baixo custo, não tóxico, que pode ser preparado através de simples operações, oferecendo a possibilidade de separação seletiva (SANTANA et al., 2005).

SANTANA et al (2005) e ROSSANO et al (2001) sintetizaram a HA conforme TISSELIUS (1954), misturando 500 mL de solução de CaCl<sub>2</sub> 0,5 M e 500 mL de solução de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5 M, sob agitação, a 210 rpm, em fluxo de 250 mL/h, em béquer contendo 50 mL de NaCl 1 M. O precipitado foi decantado e lavado duas vezes com água deionizada. Em seguida, foi adicionado 25 mL de NaOH 40% (m/v), e fervido sob agitação de 100 rpm, por 1 hora. O precipitado foi decantado e lavado duas vezes com água deionizada.

Foi obtido, aproximadamente, 75 a 80 mL de hidroxiapatita, correspondendo a, aproximadamente, 25 g de material seco.

A estrutura geométrica da HA é representada na Figura 1, na forma hexagonal, com a fórmula química geral  $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$  (LONDOÑO et al. 2006).



**Figura 1:** Estrutura cristalográfica de uma hidroxiapatita. Departamento de Química, Universidade do Estado de Moscú. (Fonte: LONDOÑO et al, 2006).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Análises de Leite e Derivados do Departamento de Tecnologia de Alimentos e no Laboratório de Análises Bioquímicas, Laboratório de Enzimologia e Laboratório de Proteínas no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária – BIOAGRO, na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

O trabalho foi realizado utilizando três métodos de separações de proteínas do soro de leite, buscando uma metodologia alternativa e de baixo custo.

#### 3.1. Testes preliminares

Para a separação das proteínas do soro de leite foi preparada a coluna de separação de adsorção em hidroxiapatita conforme Rossano et al. (2001), que utilizou o cromatógrafo FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography).

A coluna de separação foi preparada com a HA, fase estacionária, em solução tampão fosfato de sódio 10 mM pH 5,0 e adicionada lentamente com auxílio de uma pipeta na coluna, até o volume de 15 mL. A preparação foi feita lentamente para não permitir formação de bolhas e fendas na fase estacionária. A coluna de separação foi conectada à uma bomba peristáltica, marca Pharmacia LKB- Pump P-1 mantendo o fluxo contínuo de 0,5 mL por minuto, para o empacotamento da coluna.

A coluna (16 x 65 mm) foi equilibrada com tampão fosfato de sódio, fase móvel, na concentração de 10 mM, pH 5,0 por 30 minutos no mesmo fluxo.

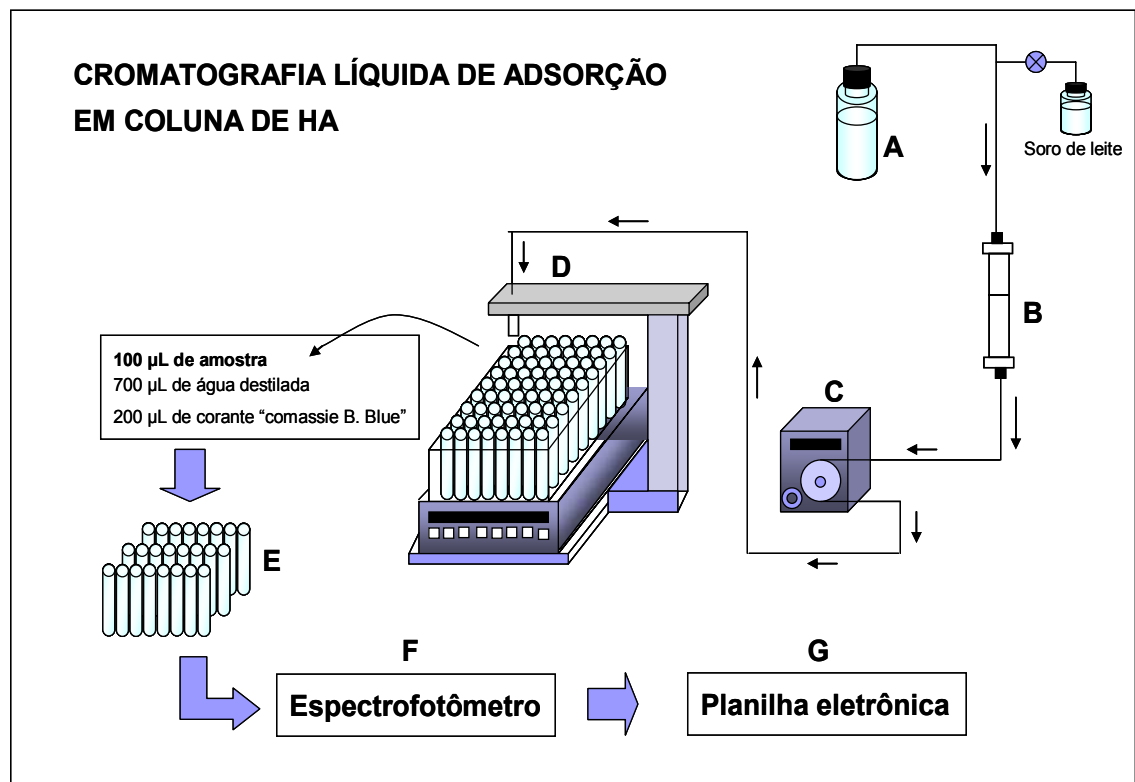
A cromatografia líquida de adsorção em coluna de HA foi realizada em temperatura ambiente, próximo de 20 °C, utilizando a eluição seqüencial com tampão fosfato de sódio em diferentes valores de pH e concentração (ROSSANO et al., 2001).

Na Figura 2 está representado os equipamentos utilizados na separação das proteínas do soro de leite por cromatografia de adsorção em coluna de hidroxiapatita.

As soluções de fosfatos de sódio usadas na eluição seqüencial da cromatografia foram:

- 1- Tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 5,0;
- 2- Tampão fosfato de sódio 400 mM, pH 5,0;
- 3- Tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 6,0;
- 4- Tampão fosfato de sódio 400 mM, pH 6,0;
- 5- Tampão fosfato de sódio 400 mM, pH 7,0.

O volume de 10 mL de soro de leite, obtido após centrifugação 12000 g e filtração através da membrana de nitrato de celulose, com 0,45  $\mu\text{m}$ , foi bombeado para coluna de separação com auxílio da bomba peristáltica, num fluxo de 0,5 mL por minuto. Este fluxo foi mantido ao longo da separação, sendo coletado frações de 2 mL em um coletor automático, marca FOXI 200.



**Figura 2:** Representação da cromatografia de adsorção em coluna de HA. **A** Reservatório de tampão fosfato; **B**-Coluna de HA; **C**- Bomba peristáltica; **D**- Coletor de frações; **E**- Preparo das frações para análise de proteínas pelo método de "Bradford" (100  $\mu\text{L}$  de amostra de cada frações coletada é adicionada em tubos de ensaio individualizados na mesma seqüência com 700  $\mu\text{L}$  de água destilada e seguido de 200  $\mu\text{L}$  do corante "comassie brilliant blue"); **F**- Análise no espectrofotômetro no comprimento de ondas de 595  $\text{nm}$ ; **G**- Lançamento dos dados obtidos em uma planilha eletrônica (Windows 2007 – Excel), para obtenção do perfil cromatográfico.

A adsorção das proteínas do soro de leite em HA seguido de centrifugação e filtração a vácuo, apresentados do item 3.6, foram métodos testados no trabalho a partir dos resultados satisfatórios da cromatografia líquida de adsorção em coluna de HA.

### **3.2. Obtenção do soro de leite**

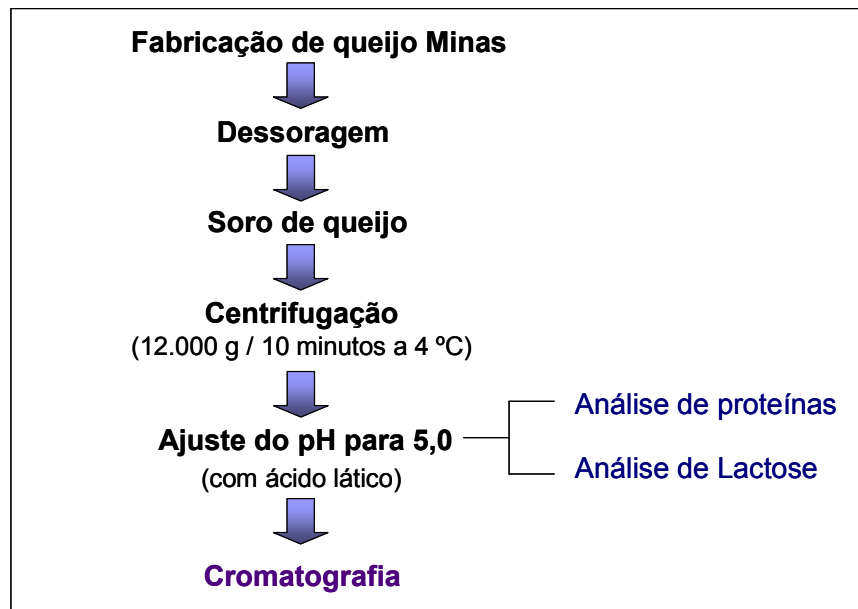
O leite para a fabricação do queijo Minas Frescal, foi padronizado com 3,0% de gordura e pasteurizado a 65 °C durante 30 minutos e apresentou 0,12 % de acidez titulável. Após a pasteurização, a temperatura do leite foi abaixada para 35 °C em banho-maria sob agitação. Em seguida foi adicionado o cloreto de cálcio (4 mL para 10L de leite, de uma solução a 50%) e o ácido láctico com 85% de pureza (2,5mL para 10 litros de leite). O ácido láctico foi diluído dez vezes em água filtrada e adicionado ao leite lentamente. Na mesma temperatura foi adicionado o coalho líquido Ha-la (10 mL para 10 litros de leite) que coagulou o leite em cinquenta minutos. Após esse tempo foi verificado o ponto da coalhada observando a sua consistência gelatinosa e firme. Com uma espátula, foi feito o corte horizontal, vertical e longitudinal da massa do queijo, no formato de cubos uniformes de aproximadamente 1 cm de aresta. Após o corte, foi realizado a mexedura durante 25 minutos, na temperatura de 35 °C, com repousos regulares até obtenção de grãos firmes. A mexedura foi feita de maneira lenta e cuidadosa evitando a quebra excessiva dos grãos. Após esse tempo foi feito a dessoragem, eliminando a maior parte do soro da coalhada, procedendo a enformagem. O soro foi coletado e armazenado sob refrigeração para ser utilizado na pesquisa. A salga do queijo foi feita adicionando o sal sobre a massa de queijo, que em seguida foi colocada em formas apropriadas. Após a enformagem o queijo permaneceu sob refrigeração.

### **3.3. Preparo do soro de leite**

O soro de leite foi obtido a partir da fabricação de queijo Minas Frescal, elaborado no Laboratório de Análise de Leite e Derivados do DTA/UFV, simulando as condições industriais.

Na Figura 3 está representado o fluxograma de obtenção e preparo do soro para a cromatografia. O soro de leite foi centrifugado em 12000 g, por 10 minutos, a 4 °C para a separação de gorduras (sobrenadante) e resíduos de paracaseinatos (decantado) (ROSSANO et al., 2001). O pH do soro foi ajustado para 5,0, com ácido láctico.

As análises de proteínas do soro de leite foram feitas, conforme o protocolo descrito por Bradford (1976), por ser um método rápido e preciso, tendo, a albumina do soro bovino (BSA), como proteína padrão da curva analítica. O índice de lactose foi determinado pelo método do DNS, usando o reagente 3,5 - ácido dinitrosalisílico, conforme descrito por Miller (1959).



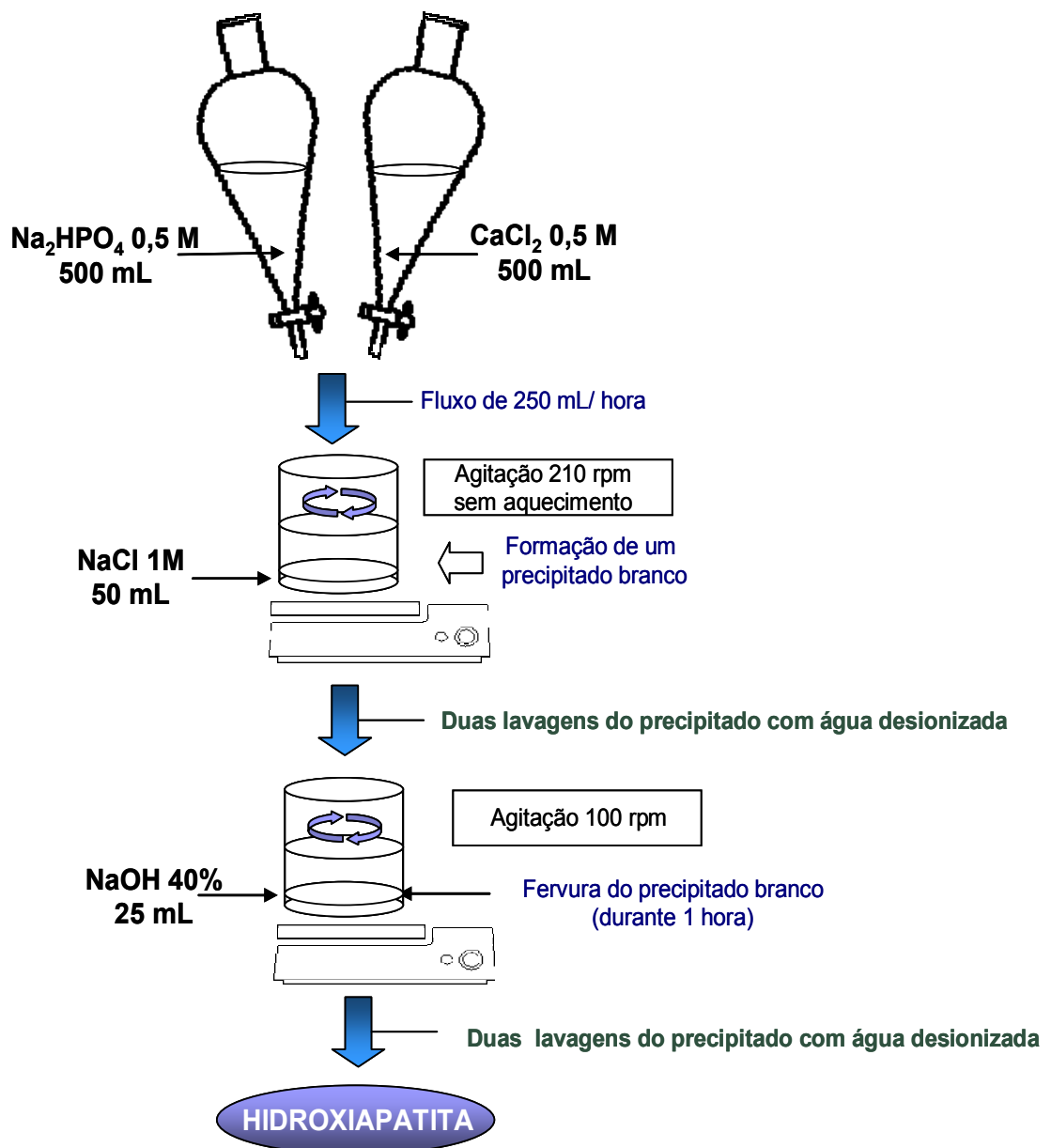
**Figura 3:** Fluxograma de obtenção do soro de leite e preparação para a separação das proteínas.

### 3.4. Preparo da Hidroxiapatita (HA)

A Figura 4 mostra as etapas de síntese da hidroxiapatita a partir da reação do cloreto de cálcio com fosfato monobásico de sódio.

A hidroxiapatita (HA) foi preparada no laboratório como descreveu Tiselius et al., (1958), adaptado por Rossano et al. (2001). O volume de 500 mL de solução 0,5 M de  $\text{CaCl}_2$  e 500 mL de solução 0,5 M de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , foram misturados, em um fluxo de 250 mL/h, em béquer de 1000 mL, contendo 50

mL de NaCl 1M, sob agitação de 210 rpm. Houve a formação de um precipitado leitoso que foi decantado e lavado duas vezes com água destilada. Em seguida, foram adicionados 25 mL de NaOH 40% (m/v), e aquecido até iniciar a fervura, que permaneceu sob agitação de 100 rpm, por 1 hora. O precipitado formado foi novamente decantado e lavado três vezes com água destilada. Foram obtidos, aproximadamente, 80 g de HA úmida, correspondendo a, aproximadamente, 25 g de material seco. A HA foi armazenada em solução 10 mM de fosfato de sódio sob refrigeração.



**Figura 4:** Fluxograma da síntese da HA a partir da reação do cloreto de cálcio com fosfato monobásico de sódio.

### 3.5. Determinação da natureza da hidroxiapatita

Com o objetivo de determinar a natureza da HA, foram utilizados a análise da espectroscopia de infravermelho no Departamento de Química da UFV, a difração de raio X, realizada no Departamento de Solos da UFV e a análise da morfologia por microscopia eletrônica de varredura da HA feitas no Núcleo de Microscopia e Microanálises da UFV.

#### 3.5.1. Espectroscopia de infravermelho

O espectro no infravermelho (IV) foi obtido em espectrofotômetro PERKIN ELMER SPECTRUM 1000. Foi necessária a secagem da HA em estufa elétrica a 200 °C por 1 hora. Como a amostra de HA é sólida, o espectro foi preparado em pastilha de brometo de potássio (KBr), contendo 1% (m/m) do composto.

#### 3.5.2. Difração de raio X (DRX)

Para a análise de difração raio X (DRX), foi necessário a secagem da HA em estufa elétrica a 200 °C por 1 hora. O teste da DRX foi realizado num difratômetro da marca Rigaku D-Max modelo Geiger Flex equipado com tubo de cobalto (radiação Co-K $\alpha$ ,  $\lambda = 1,79026 \text{ \AA}$ ), com um monocromador de cristal curvo de grafite no feixe difratado, operado com uma diferença de potencial de 40 kV e uma corrente elétrica de 30 mA. As varreduras foram realizadas no modo passo a passo em intervalo de 15 a 50° 2 $\theta$  com 0,05 ° de incremento e 2 segundos de contagem de tempo em cada passo. Os resultados obtidos dos difratogramas foram apresentados por meio de gráficos e análise descritiva.

#### 3.5.3. Microscopia eletrônica de varredura da HA

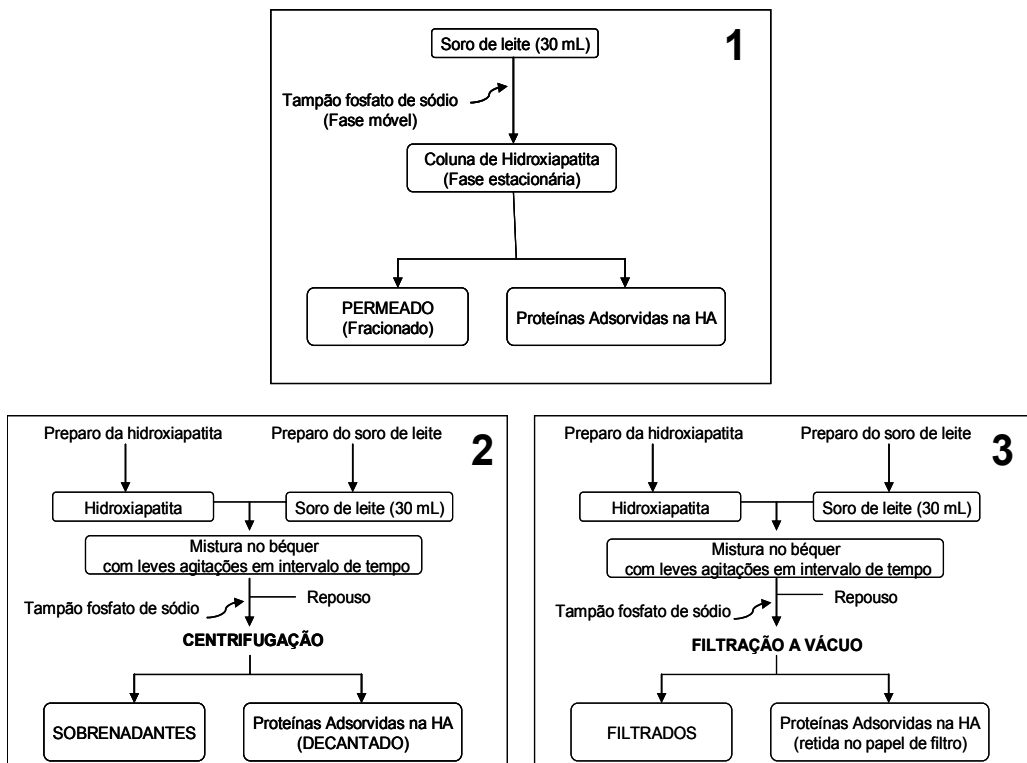
Para a análise de microscopia eletrônica de varredura, foi necessária a secagem da HA em estufa elétrica a 200 °C por 1 hora, e foram observadas, as estruturas cristalográficas e a morfologia porosa da HA sintetizada, que favorecem a adsorção de proteínas. O microscópio usado foi MEV: LEO

modelo VP, 1430 de voltagem e 20 kV de potência. A metalização: Balzers modelo FDV 010. Os resultados obtidos foram apresentados por meio de micrografias eletrônicas da HA.

### 3.6. Metodologias realizadas no experimento para a separação das proteínas do soro de leite

O experimento utilizou três metodologias diferentes de separação de proteínas, utilizando a HA como agente de adsorção, com intuito de verificar qual método é mais eficiente e viável.

Na Figura 5 está representado o esquema simplificado das três metodologias que foram utilizadas no experimento. O primeiro método foi a cromatografia de adsorção em coluna de HA, o segundo foi adsorção das proteínas do soro de leite após a mistura com HA seguido de centrifugação e o terceiro foi a adsorção das proteínas do soro de leite após a mistura com HA seguido de filtração a vácuo.



**Figura 5:** As três metodologias: **1** – Cromatografia de Adsorção em HA; **2** – Adsorção das proteínas de soro em HA seguido de Centrifugação; **3** – Adsorção das proteínas de soro em HA seguido de Filtração a Vácuo.

### **3.6.1. Método 1: Cromatografia de adsorção em coluna de hidroxiapatita das proteínas do soro de leite**

#### **3.6.1.1. Preparo da coluna de hidroxiapatita**

A coluna (16 x 65 mm) de separação, foi preparada com a HA, fase estacionária, em solução tampão fosfato de sódio 10 mM pH 5,0 e adicionada lentamente com auxílio de uma pipeta na coluna, até o volume de 15 mL. A preparação foi feita lentamente para não permitir formação de bolhas e fendas na fase estacionária. A coluna de separação foi conectada à uma bomba peristáltica, marca Pharmacia LKB- Pump P-1 mantendo o fluxo contínuo de 0,5 mL por minuto, para o empacotamento da coluna.

A coluna foi equilibrada com tampão fosfato de sódio, fase móvel, na concentração de 10 mM, pH 5,0 por 30 minutos no mesmo fluxo.

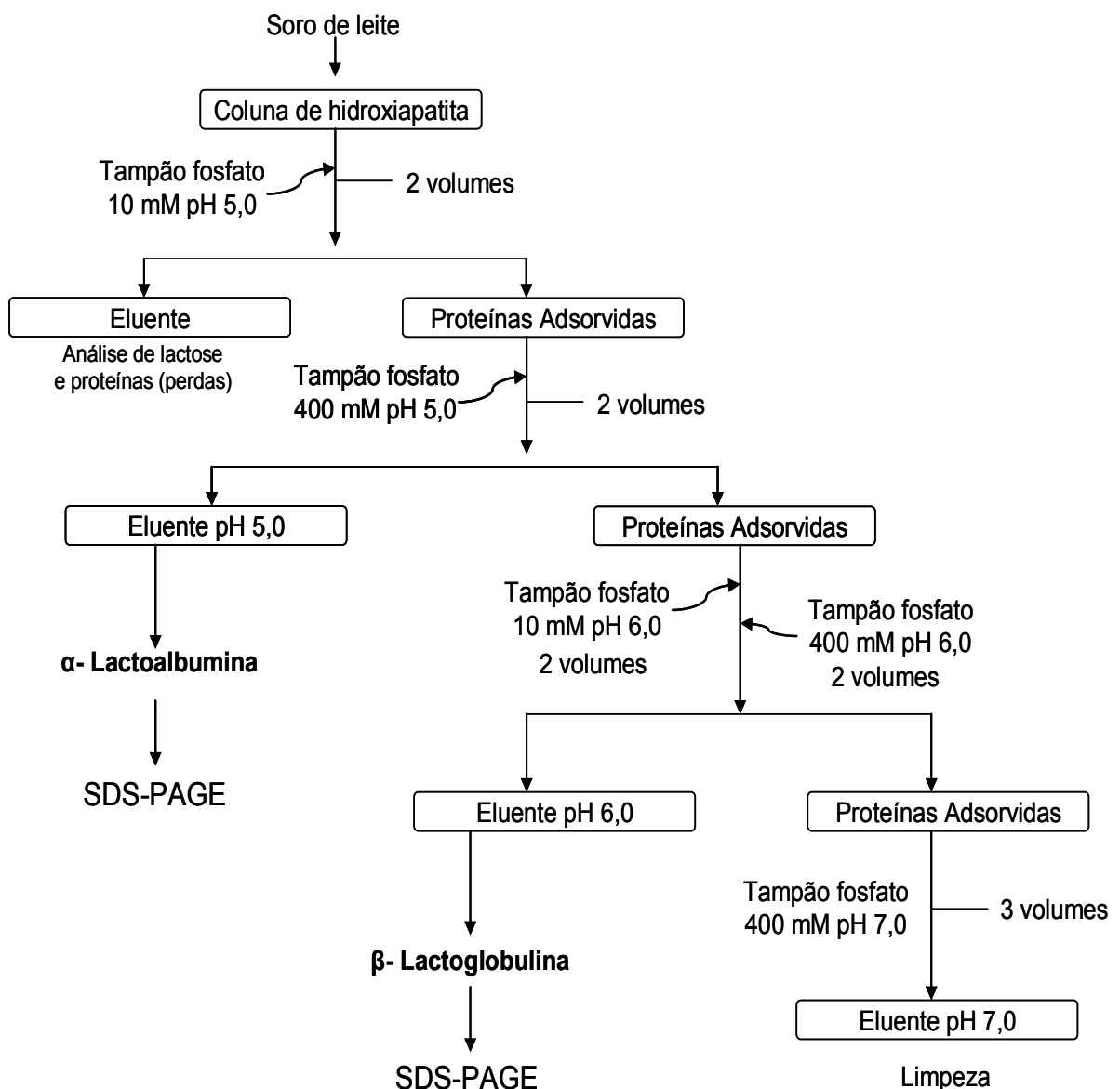
#### **3.6.1.2. Separação das proteínas do soro de leite por cromatografia de adsorção em coluna de HA**

A cromatografia líquida de adsorção em coluna de HA foi realizada em temperatura ambiente, próximo de 20 °C, utilizando a eluição seqüencial com tampão fosfato de sódio em diferentes valores de pH e concentração (ROSSANO et al., 2001).

As etapas de separação das proteínas do soro de leite por cromatografia de adsorção em coluna de hidroxiapatita são representadas na Figura 6. As soluções de fosfatos de sódio usadas na eluição seqüencial da cromatografia foram:

- 1- Tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 5,0
- 2- Tampão fosfato de sódio 400 mM, pH 5,0
- 3- Tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 6,0
- 4- Tampão fosfato de sódio 400 mM, pH 6,0
- 5- Tampão fosfato de sódio 400 mM, pH 7,0

O volume de 10 mL de soro de leite, obtido após centrifugação 12000 g e filtração através da membrana de nitrato de celulose, com 0,45  $\mu\text{m}$ , foi bombeado para coluna de separação com auxílio da bomba peristáltica, num fluxo de 0,5 mL por minuto. Este fluxo foi mantido ao longo da separação, sendo coletado frações de 2 mL. Foi feito a adição seqüencial de 30 mL dos tampões fosfato 10 mM, pH 5,0; 400 mM, pH 5,0; 10 mM, pH 6,0; 400 mM, pH 6,0 e 400 mM, pH 7,0.



**Figura 6:** Fluxograma de separação das proteínas do soro de leite por cromatografia de adsorção em coluna de HA.

Inicialmente, adicionou-se o tampão fosfato 10 mM, pH 5,0, num volume igual a duas vezes o volume total da coluna, ou seja, 30 mL de tampão. Em seguida, adicionou-se o mesmo volume de tampão fosfato, 400 mM, pH 5,0. Depois foi adicionado 30 mL de tampão fosfato 10 mM, pH 6,0, na coluna de separação. Na seqüência de eluição, foi adicionado 30 mL de tampão fosfato 400 mM, pH 6,0 na coluna de separação. A última eluição foi feita adicionando-se 45 mL de tampão fosfato 400 mM, pH 7,0.

O perfil cromatográfico foi definido coletando de três em três tubos fracionados, a quantidade de 100µL de amostra e misturado em tubo de ensaio com 700 µL de água destilada e em seguida adicionou-se 200 µL do corante “comassie brilliant blue” (reagente de Bradford) para análise de absorbância no espectrofotômetro Beckman DU-65 U.S.A., no comprimento de ondas de 595 nm. Os valores da absorbância foram colocados no eixo Y e os números das frações no eixo X da planilha eletrônica do Windons – Excel elaborando o perfil cromatográfico (cromatograma). As frações dos picos foram reunidas e coletadas separadamente para análise de proteínas totais e de eletroforese em gel de poliacrilamida – PAGE, em seguida elas foram armazenadas a -18 °C.

### **3.6.2. Método 2: Separação das proteínas do soro de leite por adsorção em HA seguido de centrifugação.**

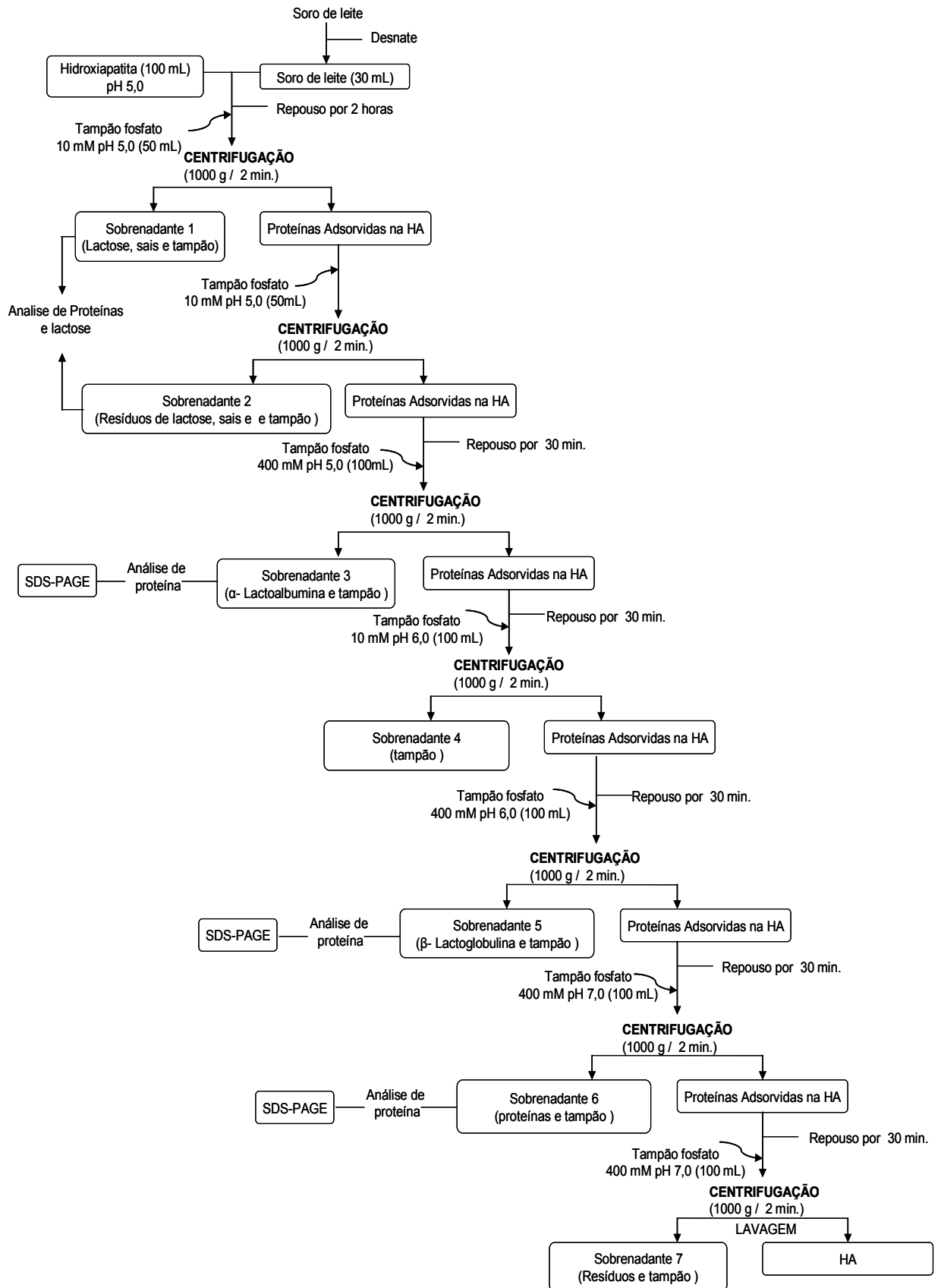
Foi feito um teste adicionando 30, 50 e 100 mL de soro de leite, em 100 mL de HA, seguidos de centrifugação a 1000 rpm por 2 minutos, a fim de definir a capacidade máxima de adsorção de proteínas de soro de leite na HA.

A Figura 7 apresenta as etapas de separação das proteínas do soro de leite por adsorção em HA, seguida de centrifugação.

A HA foi previamente adicionada de ácido clorídrico 0,5 M até o pH 5,0. Em seguida 100 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM pH 5,0 foi adicionado em 100 mL de HA e mantida em repouso por 30 minutos equilibrando o meio. Em seguida o tampão e HA foram centrifugados a 1000g, por 2 minutos, em temperatura ambiente.

O sobrenadante contendo o tampão de equilíbrio, foi retirado e em seguida 30 mL de soro de leite foram adicionados à HA, permanecendo em repouso, por 2 horas, com leves agitações, para maior interação com a HA.

Logo após, foram adicionados 50 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM pH 5,0, seguido de centrifugação (1000g/ 2minutos). O sobrenadante 1 foi coletado e armazenado para análise de proteína e lactose. Foram adicionados 50 mL do mesmo tampão na HA seguido da centrifugação. O sobrenadante 2 obtido contendo tampão e lactose residual foi separada da HA e coletado para análise de proteína e lactose.



**Figura 7:** Fluxograma das etapas de separação das proteínas do soro de leite por adsorção em hidroxiapatita seguida da centrifugação.

Foram adicionados 100 mL de tampão fosfato de sódio 400 mM pH 5,0 à HA, permanecendo em repouso, por 30 minutos, com leves agitações, seguido da centrifugação. O sobrenadante 3 obtido foi coletado e separado para análise de proteínas. Em seguida, foram adicionados 100 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM pH 6,0 na HA, permanecendo em repouso por 30 minutos com leves agitações seguido da centrifugação. A função desse tampão é fazer “um ambiente” para a mudança de pH. O sobrenadante 4 obtido, foi coletado e separado da HA para análise de proteína. Em seguida, foram adicionados 100 mL de tampão fosfato de sódio 400 mM pH 6,0 na HA, permanecendo em repouso por 30 minutos com leves agitações seguido da centrifugação. O sobrenadante 5, foi coletado e separado da HA para análise de proteína. Foram adicionados 100 mL de tampão fosfato de sódio 400 mM pH 7,0 na HA, que permanendo por 30 minutos com leves agitações, seguido da centrifugação. O sobrenadante 6 foi coletado e separado para análise.

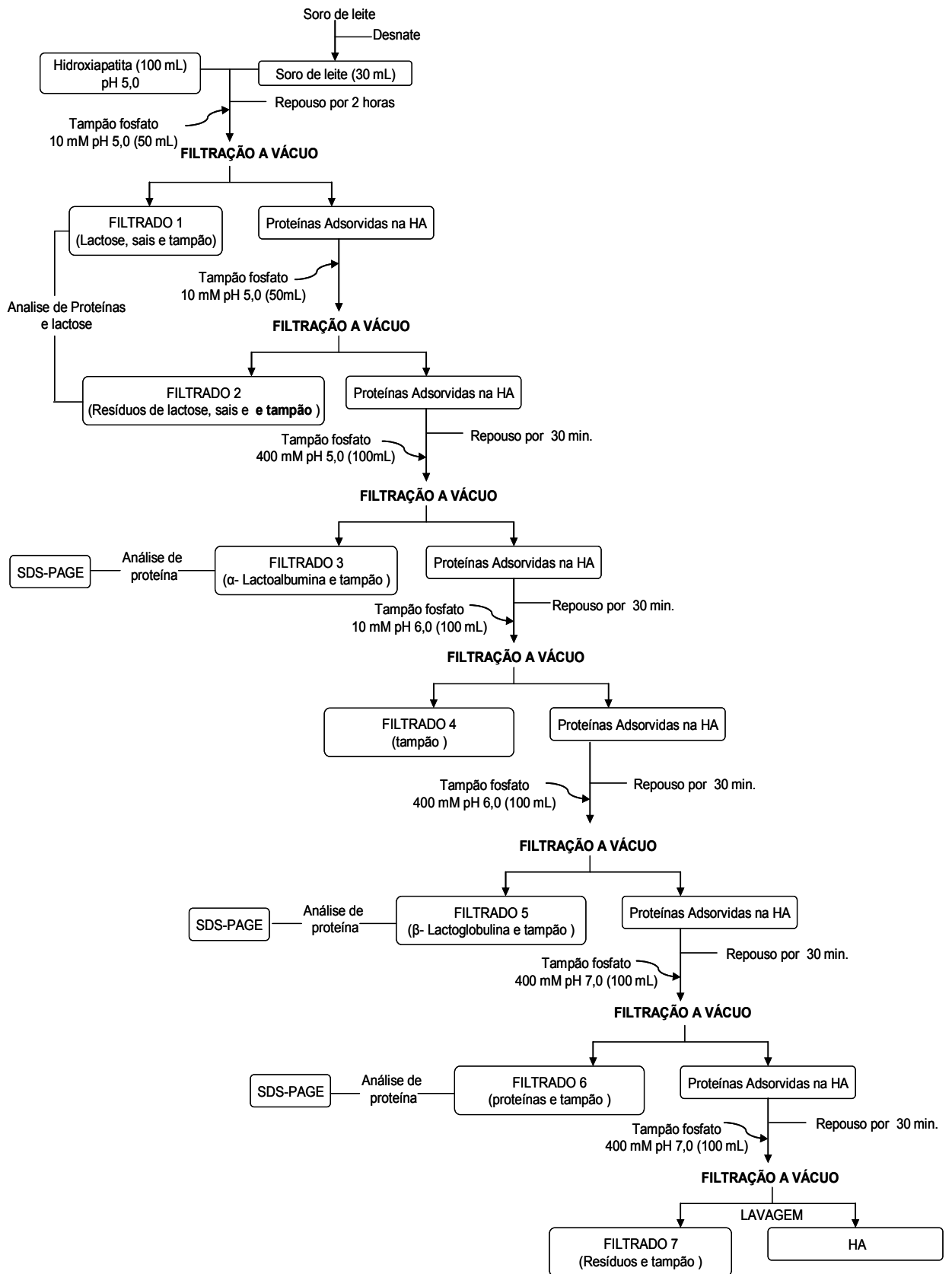
Este último tampão foi novamente adicionado na mesma quantidade na HA com o objetivo de retirar as proteínas residuais, seguindo o mesmo procedimento anterior. Assim a HA foi novamente utilizada.

Foram realizadas análises eletroforese em gel de poliacrilamida dos sobrenadantes 3, 5 e 6 para confirmação da separação das proteínas.

### **3.6.3. Método 3: Separação das proteínas do soro por Adsoção em HA seguido de Filtração a Vácuo.**

Na Figura 8 está representado as etapas de separação das proteínas do soro de leite por adsorção em HA seguida de filtração a vácuo.

A HA foi previamente adicionada de ácido clorídrico 0,5 M até o pH 5,0. Em seguida 100 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 5,0 foram adicionados em 100 mL de HA, e mantida em repouso por 30 minutos equilibrando o ambiente. Em seguida o tampão de equilíbrio e HA foram filtrados a vácuo na temperatura de 55 °C. O papel de filtro utilizado foi o qualitativo de 11 cm, número 4 da marca Whatman®.



**Figura 8:** Fluxograma das etapas de separação das proteínas do soro de leite por Adsorção em Hidroxiapatita seguido de Filtração a Vácuo.

A HA retida no papel de filtro foi transferida para um béquer e adicionada de 30 mL de soro de leite, que permaneceu em repouso por 2 horas com leves agitações para maior interação com a HA. Logo após foram adicionados 50 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 5,0 seguido de filtração a vácuo a 55 °C. As proteínas do soro de leite foram adsorvidas na HA que ficou retida no papel de filtro. O filtrado obtido foi identificado como filtrado 1, que foram coletados para análise de proteína e lactose e armazenados em temperatura de refrigeração. Foram adicionados na HA, 50 mL do mesmo tampão seguido da filtração a vácuo a 55 °C para retirada da lactose residual. O filtrado 2 obtido foi coletado para análise de proteína e lactose.

Foram adicionados 100 mL de tampão fosfato de sódio 400 mM, pH 5,0 na HA, permanecendo em repouso, por 30 minutos, com leves agitações, seguido da filtração a vácuo a 55 °C. O filtrado 3 obtido foi coletado para análise de proteínas. Em seguida, foram adicionados 100 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 6,0 na HA, permanecendo em repouso, por 30 minutos, com leves agitações, seguido da filtração a vácuo a 55 °C. O filtrado 4 obtido foi coletado para análise de proteína. Foram adicionados 100 mL de tampão fosfato de sódio 400 mM, pH 6,0 na HA, permanecendo em repouso, por 30 minutos, com leves agitações, seguido da filtração a vácuo a 55 °C. O filtrado 5 obtido foi coletado para análise de proteína. Foram adicionados 100 mL de tampão fosfato de sódio 400 mM, pH 7,0 na HA, permanecendo em repouso, por 30 minutos, com leves agitações, seguido da filtração a vácuo a 55 °C. O filtrado 6 foi coletado para análise de proteínas. O último tampão foi adicionado na mesma quantidade na HA com o objetivo de retirar as proteínas residuais, seguindo o mesmo procedimento anterior.

Foram realizadas análises eletroforese em gel de poliacrilamida dos filtrados 3, 5 e 6 para confirmação da separação das proteínas.

### **3.7. Determinação de proteínas pelo método Bradford**

A concentração de proteína nas frações coletadas foi determinada usando o reagente de Bradford, conforme o protocolo descrito por Bradford (1976).

O reagente de Bradford concentrado 5 vezes foi preparado misturando-se 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 mL de etanol 95 % (v/v) e 100 mL de ácido fosfórico 85 % (v/v). Após solubilização, o volume foi completado para 200 mL e agitado por 30 min, filtrando-se a solução em papel Whatman nº1. O reagente foi armazenado em frasco escuro protegido contra luz em temperatura ambiente. Este método baseia-se no desenvolvimento da cor em função da ligação da proteína com o Coomassie Brilliant Blue G-250.

O ensaio para determinação da concentração de proteínas das amostras, foram conduzidos a partir da mistura de 100 µL das amostras, 700 µL de água destilada e adicionados 200 µL do reagente de Bradford. A mistura foi agitada em vórtex e mantida, por 5 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram analisadas no espectrofotômetro Beckman DU-65 U.S.A., com valores de absorvância obtidos a 595 nm e convertidos em valores de massa protéica utilizando a curva analítica padrão, da análise de Bradford, elaborada com albumina do soro bovino – BSA.

### **3.8. Determinação de lactose pelo método de DNS**

A concentração de lactose das frações eluídas foi determinada usando o reagente ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) (Miller, 1959). A preparação do reativo de DNS foi feita com 10 g de ácido dinitrossalicílico, 300 mL de NaOH, 2 mol. L<sup>-1</sup>, 300g de tartarato de sódio e potássio, completando o volume para 1000 mL, com água destilada.

Em um béquer de 1000 mL, foram adicionados 10 g de DNS e 200 mL de água destilada sob agitação até a completa dissolução. Foi acrescentado os 300 mL de solução de NaOH 2 mol.L<sup>-1</sup> e foi adicionado lentamente o tartarato de sódio e potássio, fazendo uso de uma espátula, ainda sob agitação. O tempo gasto para essa operação foi aproximadamente 30 minutos. A solução obtida foi armazenada em frasco âmbar coberto com papel alumínio, protegido contra a luz. Antes de usar, foram adicionados 70 µL de solução de metabissulfito 35% e 200 µL de solução de fenol 50%, para cada 50 mL de solução.

A curva analítica foi elaborada utilizando-se concentrações de glicose de 0 a 640 µL, em 10 tubos de ensaio, a partir da solução estoque de glicose 0,25

mg. mL<sup>-1</sup>. O volume final foi ajustado para 1,0 mL com água destilada e adicionado de 1 mL de solução de DNS. Os tubos de ensaio, assim preparados, foram mantidos em água fervente, por 5 minutos, e, após resfriamento, foi realizada a leitura no espectrofotômetro Beckman U.S.A. a 540 nm.

A determinação do teor de lactose das amostras foram conduzidos a partir de alíquotas de 50-100 µL das amostras, completando-se o volume para 1 mL, com água destilada e 1 mL de DNS. A mistura, após agitação, foi mantida em água fervente, por 5 minutos, seguido de resfriamento e leitura da absorbância a 540 nm.

### **3.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida e sulfato dodecil de sódio (SDS-PAGE)**

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada para confirmação da separação das proteínas nos métodos aplicados.

Padrões de β- Lactoglobulina e α- Lactoalbumina da marca Sigma, foram usados para efeitos de comparações das bandas formadas na eletroforese.

A eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5 %), contendo SDS e β-mercaptoetanol foi realizada conforme descrito por Laemmli (1970). Os minigéis foram preparados a partir de solução estoque de acrilamida/N,N-metileno bisacrilamida (bis) 30 % (p/v), tampão Tris/HCl 1,5 M, pH 8,8, para o gel separador e tampão Tris/HCl 0,5 M, pH 6,8, para o gel empilhador, persulfato de amônio 10 % (p/v), dodecil sulfato de sódio (SDS) 10 % (p/v) e, tetrametil-etilenodiamino (TEMED). As amostras e os padrões de β - lactoglobulina, de α - lactoalbumina foram aplicados no gel e as corridas eletroforéticas foram realizadas à temperatura ambiente, a 100 V por duas horas, em placas do Sistema Mini-Gel da Sigma Chemical Co.

As amostras submetidas à eletroforese foram adicionadas ao tampão de amostra 3 vezes concentrado (0,19 M Tris/HCl, pH 6,8, 2,3 % p/v de SDS, 1 % v/v de glicerol, 5 % v/v de β-mercaptoetanol e azul de bromofenol), fervidas durante 5 min e aplicadas no gel (LAEMMLI, 1970).

As proteínas presentes nos géis foram reveladas com nitrato de prata, conforme procedimento descrito por Blum et al. (1987).

Após a corrida eletroforética, os géis foram colocados em 50 mL de solução fixadora (metanol, ácido acético glacial e água, na proporção de 50:12:38, em volume), por no mínimo 2 horas, seguido de 3 lavagens de 10 minutos com solução de etanol 50 %. Os géis foram lavados por 1 min, em solução de tiosulfato de sódio 0,02 % (p/v), sendo logo em seguida, enxaguados três vezes com água destilada e incubados, por 25 min, em 100 mL de solução de nitrato de prata 0,2 % (p/v), contendo 37 µL de formaldeído 37 % (v/v). Após o tratamento em solução de nitrato de prata, os géis foram lavados 3 vezes, por 20 segundos, com água destilada e imediatamente imersos em solução reveladora (carbonato de sódio 4 %, contendo 2 mL de solução de tiosulfato de sódio 0,02 % e 50 µL de formaldeído 37 %), até a visualização das bandas protéicas. A reação foi interrompida pela adição de 3 mL de ácido acético.

### **3.0. Análises dos resultados**

As análises estatísticas entre os métodos foram realizadas visando comparar o melhor desempenho na recuperação de proteínas totais, na recuperação da  $\alpha$ -lactoalbumina e na recuperação da  $\beta$ -lactoglobulina. Os métodos (tratamentos) utilizados para separar as proteínas totais,  $\alpha$ -lactoalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina foram dispostos em um delineamento inteiramente casualizado, com três repetições e triplicata das análises. Os dados foram interpretados por meio de análise de variância, utilizando o teste F, ao nível de 5% de probabilidade. As médias dos tratamentos foram comparadas utilizando teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa SAS (Statistical Analysis System – SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) versão 8.0.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

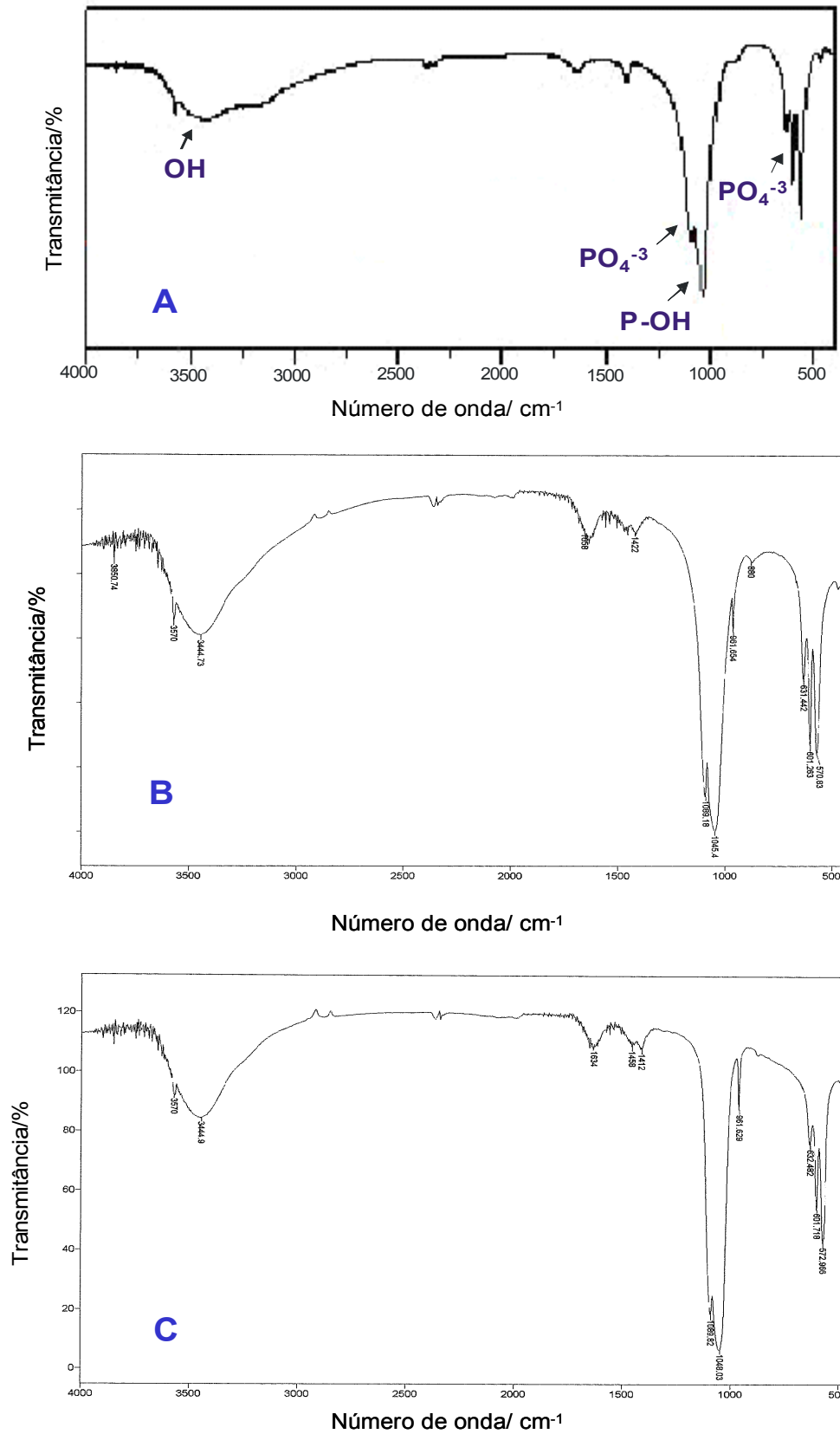
### 4.1. Resultados da caracterização da HA

A HA sintetizada foi analisada por espectroscopia de infravermelho, por difração de raio X e pela microscopia eletrônica de varredura para a caracterização da natureza da HA.

#### 4.1.1. Espectroscopia de infravermelho

Essa técnica foi usada para identificar os grupos funcionais presentes na hidroxiapatita. A Figura 9.C mostra o resultado da espectroscopia de infravermelho da HA sintetizada, que foram comparados com o espectro da HA padrão, obtida por Sousa et al (2007), representado na na Figura 9.A, e com a HA Padrão HAP-91<sup>®</sup>JHS Laboratório Químico, representado na Figura 9B.

A HA sintetizada apresentou bandas referentes a grupos da hidroxiapatita padrão: as bandas em  $474\text{ cm}^{-1}$ ,  $561 - 573\text{ cm}^{-1}$ ,  $959-963\text{ cm}^{-1}$ , e  $1045 - 1092\text{ cm}^{-1}$  são características do grupo fosfato  $\text{PO}_4^{3-}$  e as bandas  $890\text{ cm}^{-1}$  e  $1104\text{ cm}^{-1}$  referentes a P-OH. A banda larga observada em torno de  $3600\text{ cm}^{-1}$  é referente ao estiramento da ligação OH da HA.



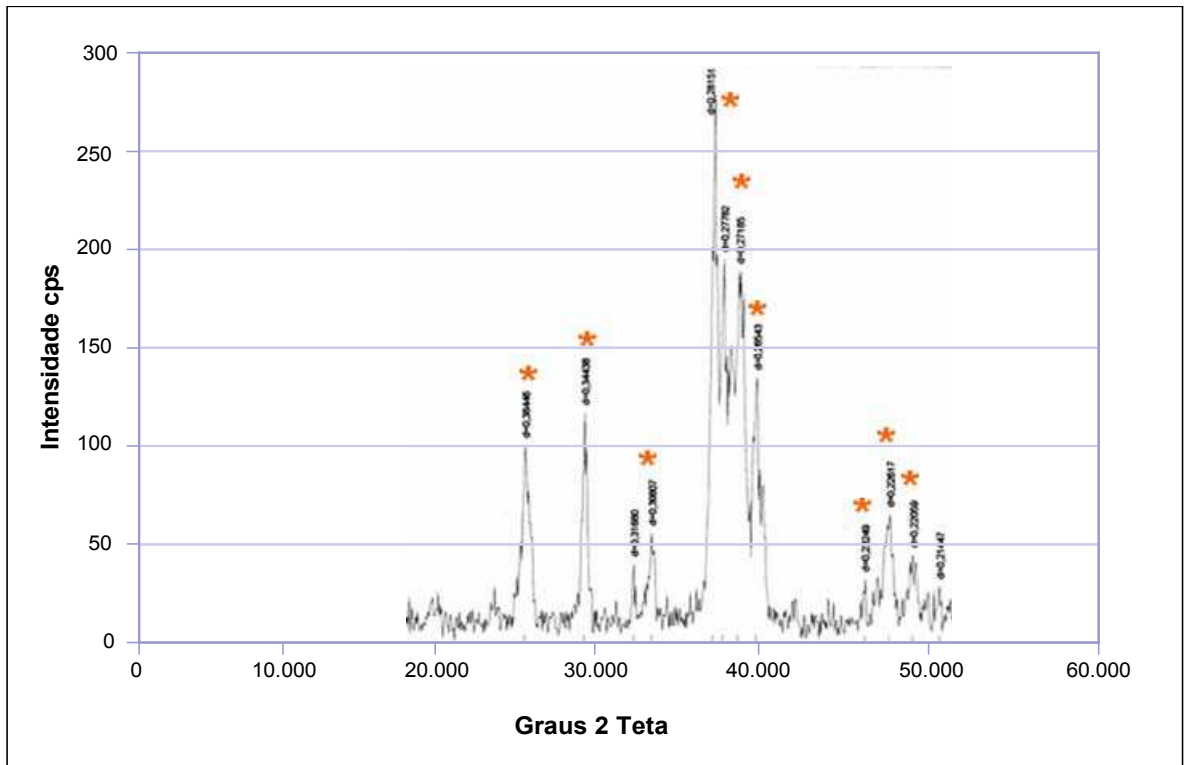
**Figura 9:** Análise de espectroscopia de infravermelho. **A** - HA Padrão conforme o artigo de Sousa et al (2007); **B** - HA Padrão HAP-91<sup>®</sup> JHS Laboratório Químico; **C** - HA sintetizada na pesquisa.

A energia denominada infravermelho corresponde à região do espectro eletromagnético situada na faixa de número de ondas entre 14290 e 200  $\text{cm}^{-1}$ . A região que apresenta número de ondas entre 4000 – 400  $\text{cm}^{-1}$  é a mais comumente utilizada pelos químicos orgânicos, sendo denominada infravermelho médio. A região chamada de infravermelho próximo, 14290 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , tem recebido recentemente muita atenção, em particular com relação a análise quantitativas de amostras com matrizes complexas (BARBOSA, 2007).

A radiação infravermelha causa alteração nos modos rotacionais e vibracionais das moléculas. Assim, a radiação infravermelha, com número de ondas entre 10000 e 100  $\text{cm}^{-1}$ , ao ser absorvida por um composto é transformada em energia vibracional e aquela com número de ondas menor que 100  $\text{cm}^{-1}$  (portanto menor energia), convertida em energia de rotação molecular. O espectro na região de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , que é a região mais importante do ponto de vista da caracterização de compostos, normalmente apresenta bandas de absorção em vez de linhas, isso porque, para cada mudança de nível vibracional, está associada uma série de transições rotacionais (BARBOSA, 2007). Para que uma vibração apareça no espectro de infravermelho, a molécula precisa sofrer uma variação no seu [momento dipolar](#) durante essa vibração.

#### 4.1.2. Difração de raios X (DRx)

A HA é um fosfato de cálcio que se cristaliza no sistema hexagonal com parâmetros de rede  $a = b = 9,41 \text{ \AA}$  e  $c = 6,875 \text{ \AA}$ , o que gera picos característicos aos diversos planos atômicos dentro de sua estrutura (MARTINEZ, 2008). A Figura 10 apresenta os resultados da difração de raio X da hidroxiapatita sintetizada, com a visualização dos picos característicos.



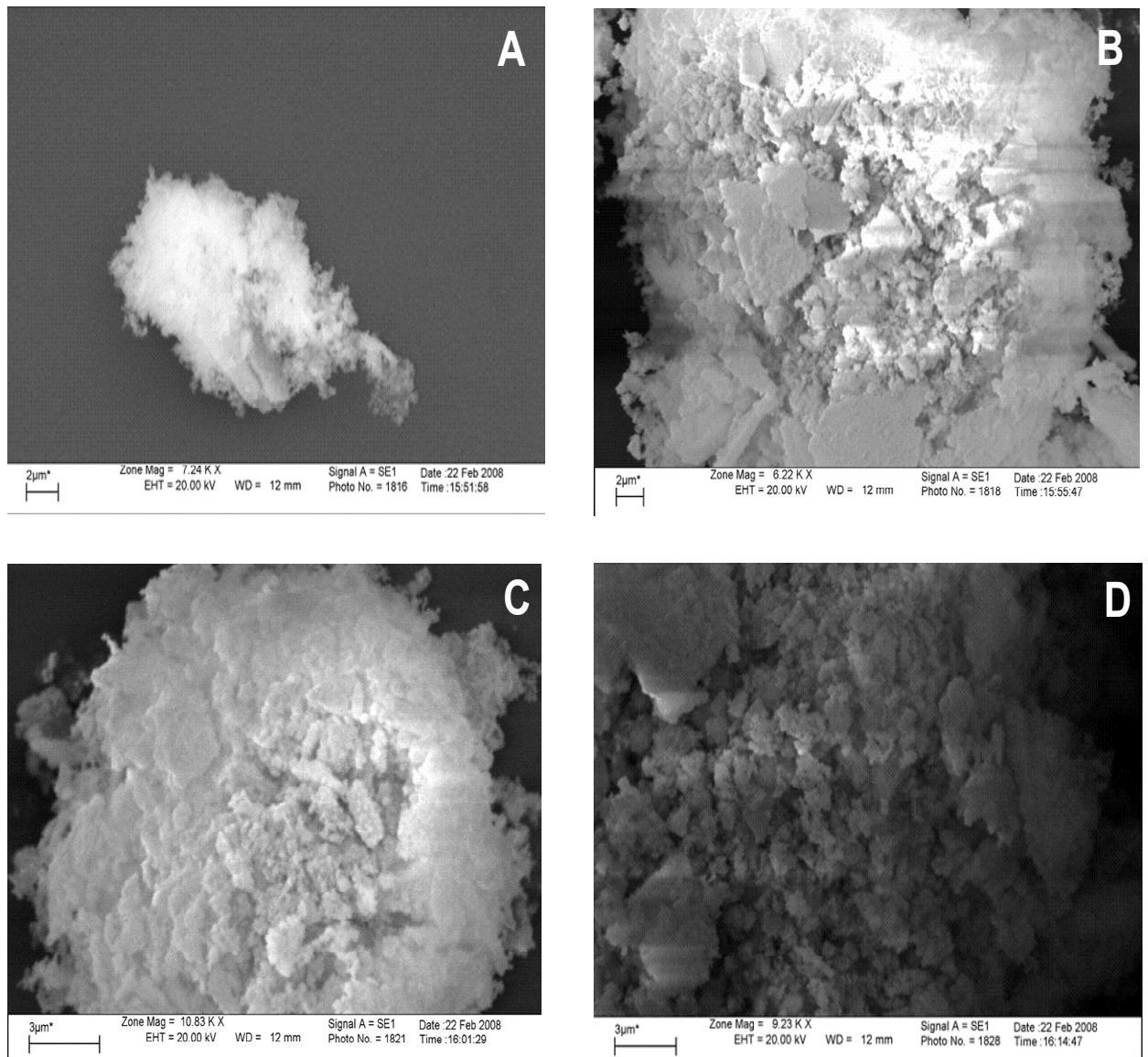
**Figura 10:** Difratoograma do compósito de HA sintética. \* Picos característico de hidroxiapatita.

Observa-se a cristalinidade da HA pelos picos delgados e com uma linha de base quase que reta. A HA sintetizada na pesquisa apresenta picos muito semelhantes aos obtidos com uma HA sintetizada e estudada por Londoño et al (2006) e a HA estudada por Martinez (2008), como promotor de osseointegração entre implante metálico, e tecido ósseo em estudo experimental.

A difração de raio X é uma técnica utilizada para identificar fases mineralógicas e para estudar estruturas cristalinas. A técnica faz uso da periodicidade com que os átomos se arranjam ao formar a estrutura cristalina dos minerais e as distâncias entre os planos atômicos que promovem difração dos raios X (MARTINEZ, 2008).

#### 4.1.3. Microscopia eletrônica de varredura da HA

As estruturas cristalográficas e a morfologia porosa da HA sintetizada no Laboratório de Análises de Leite e Derivados no DTA/UFV estão apresentadas na Figura 11. Essas características colaboram para que ela tenha uma boa capacidade como adsorvente de proteínas.



**Figura 11:** Micrografias eletrônicas de varredura de HA sintetizada. Visualização das estruturas cristalográficas da HA. **A** – Observação da matriz de HA; **B** – Imagem da fratura transversal da matriz; **C** – Imagem do topo da matriz e **D** – Observação da microestrutura da matriz de HA, tendo em vista a granulometria mais fina, arredondada, com maior área superficial que contribui para adsorção.

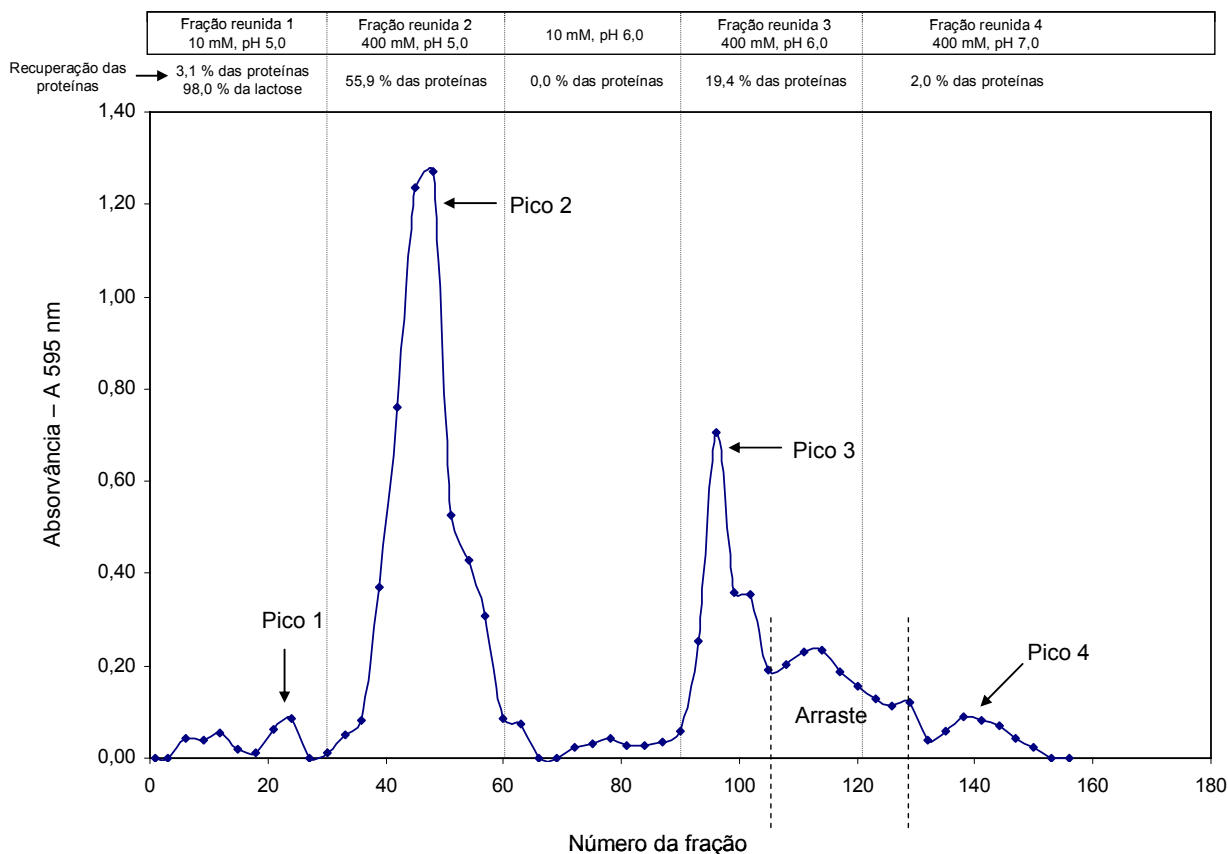
#### 4.2. Testes preliminares da cromatografia

O soro foi centrifugado a 12000 g por 10 minutos a 4 °C. Ao que foi adicionado ácido láctico até o pH 5,0, apresentou a concentração de proteínas totais de 1,85 mg. mL<sup>-1</sup>, pelo método de Bradford e a concentração de lactose de 63,0 mg.mL<sup>-1</sup>, pelo método do DNS. Foi adicionado 10 mL de soro de leite

na coluna de separação, portanto, 18,5 mg de proteínas totais foi adicionado na coluna.

A Figura 12 apresenta os resultados e o perfil cromatográfico da separação das proteínas do soro de leite por cromatografia de adsorção em coluna de HA.

O resultado da análise cromatográfica foi satisfatório apesar do rendimento de 75,3 % na recuperação total das proteínas. O resultado do rendimento mais baixo do que o esperado foi pelo fato de não ter sido coletado as frações de 105 a 127, uma vez que essas frações provocaram um “arraste” no perfil cromatográfico. Segundo Collins et al. (1997), este “arraste” é comum em cromatografia de adsorção, fenômeno conhecido como efeito de difusão, que prejudica a separação de compostos. Mesmo assim, as frações “arrastadas” deveriam ser coletadas. Foram deixados de coletar 44 mL de amostras eluídas (frações 105 a 127), contendo 3,62 mg de proteínas totais aproximadamente, o que equivale a 19,5% das proteínas totais.



**Figura 12:** Perfil cromatográfico qualitativo da separação das proteínas do soro de leite por cromatografia de adsorção em coluna de HA. **Pico 1:** Proteínas que não adsorveram na coluna. **Pico 2:** Eluente do tampão fosfato de sódio 400 mM, pH 5,0. **Pico 3:** Eluente do tampão fosfato de sódio 400 mM, pH 6,0. **Pico 4:** Eluente do tampão fosfato 400 mM, pH 7,0. **Arraste:** Área equivalente as frações 105 a 127 que não foram coletadas.

A massa de proteínas encontrada no pico 1 foi de 0,58 mg, equivalente a 3,14% das proteínas totais adicionadas na coluna de separação. Esse é o valor da perda de proteínas que não foram adsorvidas na coluna de HA. A massa de açúcar redutor, neste pico, foi de 617,0 mg, equivalente a 98% de recuperação total da lactose adicionada na coluna. Neste primeiro eluente, com tampão fosfato de sódio 10 mM pH 5,0, foi evidenciado a separação da lactose das proteínas do soro, que permaneceram aderidas à coluna de HA.

Os Picos 2 e 3 mostram que a HA apresenta boa capacidade de adsorção de proteínas do soro de leite e que o tampão fosfato de sódio em diferentes concentrações e pH, tem excelente poder de eluição das proteínas na coluna de separação. O tampão fosfato de sódio 400 mM, pH 5,0, foi responsável pela eluição da  $\alpha$ - lactoalbumina, proteína predominante do pico

2. O pico 3, resultado da mudança de eluição, feito com tampão fosfato 400 mM, pH 6,0, teve maior concentração da da  $\beta$ - lactoglobulina.

O pico 4 foi resultado da eluição feito com tampão fosfato 400 mM, pH 7,0, equivalente às proteínas que não foram recuperadas nas eluições anteriores, equivalente a 0,38 mg ou 2,0 % de perda. A Fração reunida 1 (frações 1 a 30) e a Fração reunida 4 (frações 120 a 140) somaram as perdas totais da separação, equivalente a 5,1% de perdas. Os resultados obtidos da cromatografia foram acompanhados da SDS-PAGE.

O método adaptado da cromatografia líquida de adsorção em coluna de HA foi perfeitamente aplicável, e dois métodos diferentes de adsorção em HA foram testados a partir deste. O primeiro foi a adsorção de proteínas do soro de leite em HA, seguido de centrifugação, e o outro foi a adsorção de proteínas do soro de leite em HA, seguido de filtração a vácuo.

#### **4.3. Método 1: Resultado da cromatografia líquida de adsorção em coluna de HA**

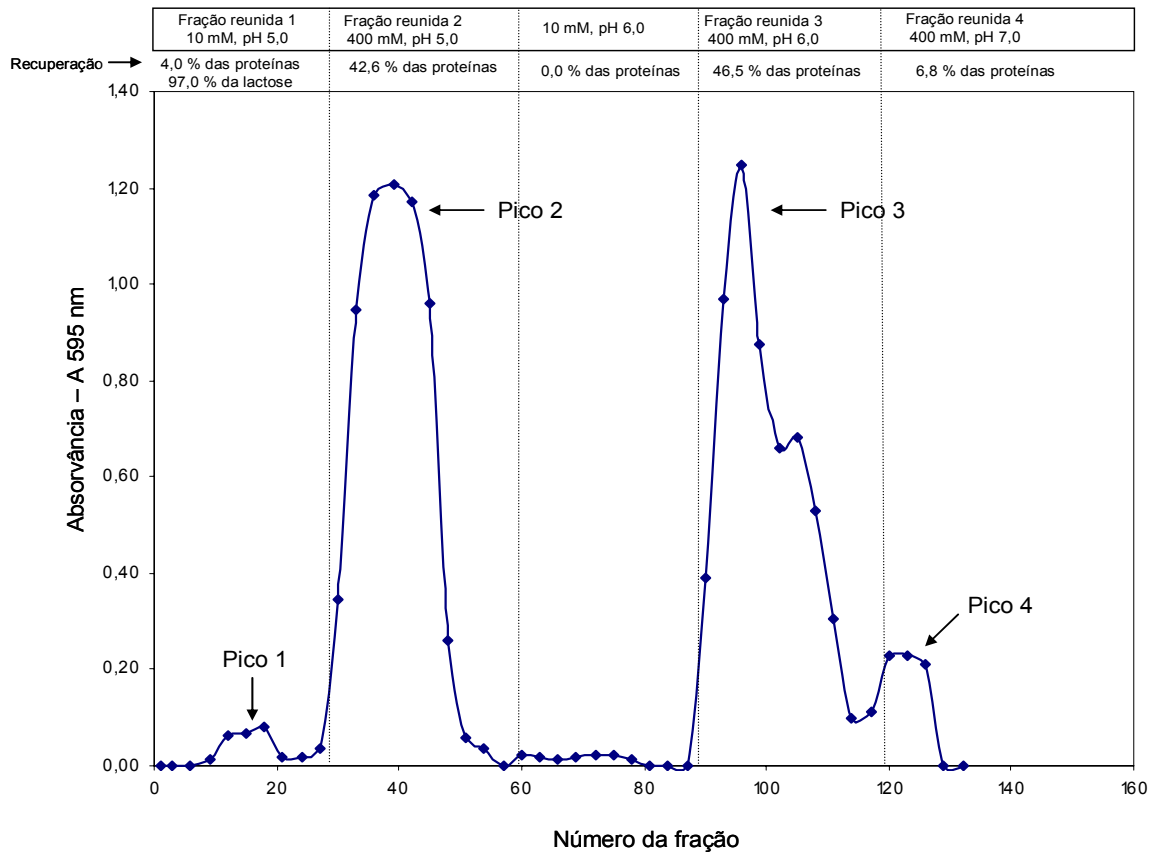
A Figura 13 apresenta os resultados das médias obtidas das separações das proteínas do soro de leite por cromatografia de adsorção em coluna de HA.

Inicialmente a coluna foi equilibrada com o tampão fosfato 10 mM, pH 5,0 por 30 minutos, depois adicionado 10 mL de soro. Em seguida a coluna foi lavada com 30 mL do tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 5,0, ou seja, duas vezes o volume da coluna (tampão de equilíbrio).

Na Fração reunida 1, equivalente ao pico 1, obtida da eluição com tampão fosfato 10 mM, pH 5,0, foi encontrada a concentração de 4,0 % de proteínas totais, consideradas como perda na cromatografia. Nesta fração, foram também recuperadas 97% da lactose total do soro de leite. Nesta primeira etapa, o resultado mostrou que a HA tem boa capacidade de adsorção de proteínas do soro de leite, separando-as da lactose. As proteínas presentes nesta fração são, provavelmente, resultantes da presença dos diversos peptídeos no soro de leite.

As proteínas que aderiram à HA foram eluídas pela aplicação do tampão fosfato de sódio 400 mM, pH 5,0. A fração reunida 2, equivalente ao pico 2, foi analisada e verificou-se 42,6 % de recuperação das proteínas totais. Essas

frações foram armazenadas sob congelamento, a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Na análise do pico 2 em SDS-PAGE, verificou-se que nessas frações predominava a  $\alpha$ -lactoalbumina. Conforme descrito Rossano et al (2001), nessa fração estava presente também o grupo das imunoglobulinas.



**Figura 13:** Resultado do perfil cromatográfico das proteínas do soro de leite em coluna de hidróxiapatita. **Pico 1:** Proteínas que não adsorveram na coluna (Perda). **Pico 2:** Eluente do tampão fosfato de sódio 400 mM, pH 5,0 – predominância da  $\alpha$ -lactoalbumina. **Pico 3:** Eluente do tampão fosfato de sódio 400 mM, pH 6,0 – predominância da  $\beta$ -lactoglobulina. **Pico 4:** Eluente do tampão fosfato 400 mM, pH 7,0 (Proteínas residuais).

Com a adição do tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 6,0, verificou-se que não havia presença de proteínas. Nessa concentração e pH do tampão as proteínas permaneceram adsorvidas na coluna de HA. Este gradiente foi feito como preparação de ambiente com aumento de pH sem que houvesse ainda o aumento da concentração do fosfato de sódio.

Em seguida foi adicionado o tampão fosfato de sódio 400 mM, pH 6,0. A Fração reunida 3, desta eluição, equivalente ao pico 3, foi analisada e

verificou-se 46,5 % de recuperação total de proteínas. Essas frações foram, também, armazenadas sob congelamento, a -18 °C. Na análise do pico 3 por SDS-PAGE, verificou-se que nessa fração predominava a  $\beta$  - Lactoglobulina. Conforme descrito ROSSANO et al (2001), nessa fração estava presente também a albumina do soro bovino (BSA).

Na última eluição, com tampão fosfato de sódio 400 mM, pH 7,0 a Fração reunida 4, equivalente ao pico 4, foi analisada e verificou-se 6,8 % de proteínas, consideradas como perdas. Esse gradiente foi realizado com intuito de retirar as proteínas residuais, ou seja, a limpeza da coluna. As proteínas da Fração reunida 1 e da Fração reunida 4 somaram a 10,8 % de perdas totais de proteínas no processo de separação.

As proteínas foram eluídas da HA com tampão fosfato de sódio na concentração de 400 mM e nos valores de pH 5,0, 6,0 e 7,0, conforme as forças iônicas das mesmas (potencial iônico) descrito por TISELIUS et al (1956) e ROSSANO et al (2001). A eluição sequencial é também conhecida como gradiente, passo a passo.

Para que a HA tenha um bom efeito de adsorção e de eluição, é preciso combinar diferentes valores de pH e concentrações do tampão fosfato de sódio.

A adsorção das proteínas acontece em função dos grupos aminas e carboxílicos (grupos polares) que interagem com a HA, que é polar. As forças eletrostáticas, forças físicas de van der Waals e as ligações de hidrogênios são as interações predominantes na adsorção, podendo também ocorrer outras interações como a dipolo – dipolo e íon - dipolo, embora, mais fracas.

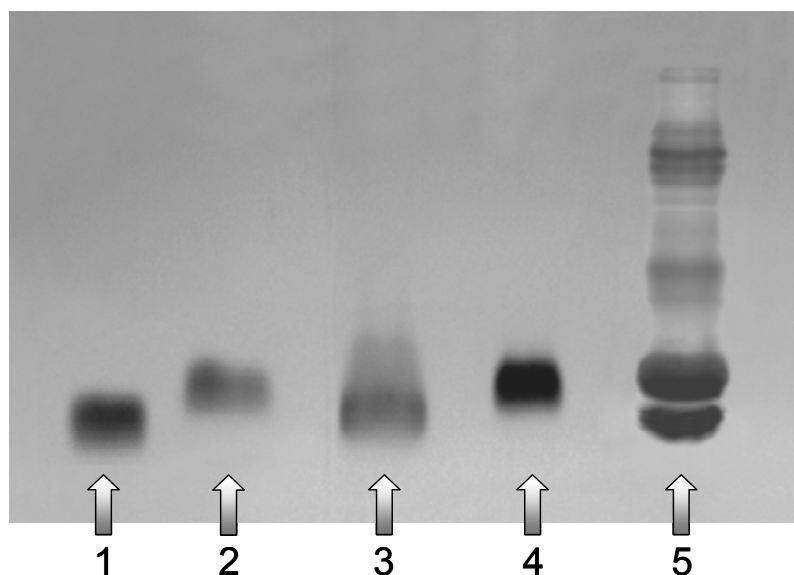
Com o aumento da concentração de fosfato de sódio e alteração do pH da fase móvel na cromatografia, ocorre o aumento da força iônica que desfaz as interações intermoleculares que são mais fracas, provocando o efeito de eluição. Esse é o princípio da eluição sequencial (dessorção) das proteínas em colunas de HA.

A adsorção é um método simples de imobilização de proteína em coluna, onde as proteínas são mantidas na superfície da HA por forças físicas. A  $\alpha$  – lactoalbumina, predominante no Pico 2 da Figura 13, demonstrou um comportamento dinâmico melhor no processo de adsorção e eluição na coluna, isso significa que as condições de temperatura, pH e concentração do fosfato

de sódio favorece uma boa separação desta proteína. Os picos desta proteína sempre apareciam bem definidos sem alargamento de base.

A  $\beta$  – lactoglobulina, proteína predominante no Pico 3 da Figura 13, sempre se apresentava com boas características cromatográficas, porém, algumas vezes, esse pico era caracterizado com um arraste no seu final, provavelmente causado pelo efeito de difusão das proteínas com a fase móvel. (Esse fato ocorreu no teste preliminar e foi minimizado nas análises posteriores.) Foi observado também no pico 4 a presença da  $\beta$  – lactoglobulina, mostrando que o fosfato de sódio 400 mM, pH 6,0 não conseguiu eluir totalmente esta proteína. Tampões com valores de pH intermediários entre 6,0 e 7,0 foram testados, porém, os resultados não foram satisfatórios. Concentrações diferentes do tampão podem ser uma alternativa para melhorar a eluição desta proteína, ocasionando menor perda na cromatografia.

As Frações reunidas 2 e 3 foram analisadas em SDS-PAGE e foram obtidos os resultados apresentados na Figura 14. Este resultado demonstra a predominância da  $\alpha$  – lactalbumina na Fração reunida 2, e da  $\beta$  - lactoglobulina na Fração reunida 3.



**Figura 14:** Perfil eletroforético (SDS-PAGE) das proteínas separadas em cromatografia de adsorção de proteínas em HA. **1** - Padrão de  $\alpha$ - lactalbumina; **2** – Padrão de  $\beta$ - lactoglobulina; **3**- Fração reunida 2 ( Eluente do tampão 400 mM, pH 5,0); **4** – Fração reunida 3 (Eluente do tampão 400 mM, pH 6,0); **5** - Soro de leite.

As vantagens da técnica da cromatografia de adsorção são referentes à sua simplicidade de execução e pouca influência exercida na conformação da proteína devido a não utilização de ligações não fisiológicas da proteína com reagentes químicos. No entanto, a fragilidade das ligações adsorptivas exige um maior cuidado na manutenção das condições ideais de temperatura, pH e força iônica a fim de evitar a eluição ou dessorção (XU et al., 1995, FALKOSKI, 2007).

A morfologia e as condições de ativação das partículas adsorptivas são determinantes na eficiência de separação dos compostos Collins et al. (1997). A morfologia das partículas de HA, apresentada na Figura 11 (Micrografias eletrônicas de varredura) com muitas porosidades em sua estrutura, favorece a interface proteínas – partícula (HA).

Entretanto, essa fase estacionária, por possuir partículas muito pequenas, pode assim, dificultar o fluxo da cromatografia, devido à sua compactação. Foi observado na pesquisa que a HA pode ser usada 6 vezes, sem nenhum problema, mas nas cromatografias seguintes, houve problemas, com a baixa capacidade de adsorção de proteínas, sendo necessário a troca da HA na coluna.

Conforme Lacerda et al (2006) a HA é termicamente estável em temperaturas elevadas, variando de 25 a 950 °C. Santos et al (2005) sintetizaram e calcinaram a HA em temperaturas de 300 , 500 e 700 °C, utilizando precursores alternativos, como o nitrato de cálcio e ácido fosfórico.

Londoño et al (2006) aplica diferentes tratamentos térmicos na HA e observa que quanto maior a temperatura, maior é a cristalinidade da mesma. Foi constatado em sua pesquisa que 1050 °C é o ponto mais cristalino da HA. Porém, a HA assim como outras cerâmicas, diminuem a capacidade de adsorção quando são muito purificadas em função do aumento da cristalinidade.

Conclui-se que não é interessante que a HA tenha um elevado grau de pureza na cromatografia de adsorção. Portanto, a síntese da HA e as condições de separação, devem ser bem padronizadas para evitar problemas de fluxo, adsorção e eluição na cromatografia. A HA pode ser adquirida pronta no mercado com características desejadas.

Estudos de VOGT & FREITAG (1997) indicam que a cromatografia de troca iônica é melhor que a cromatografia de adsorção em HA na separação das proteínas isoladas do soro, entretanto, o material usado na cromatografia de troca iônica é de custo elevado para uso em escala piloto ou industrial.

#### 4.4. Método 2: Resultado da separação das proteínas do soro de leite por adsorção em HA seguido de centrifugação

O Quadro 3 apresenta os resultados obtidos da determinação da capacidade máxima de adsorção de proteínas de soro de leite em HA seguido de centrifugação. A concentração de proteína do soro antes da centrifugação foi de 3,29 mg. mL<sup>-1</sup>.

**Quadro 3:** Eficiência da HA na adsorção seguida de centrifugação.

	Quantidade de soro adicionado (mL)	Proteína adicionada (mg)	Proteína no eluente (mg)	Proteína aderida na HA (mg)	Eficiência na Adsorção (%)
1	30	98,7	0	98,7	100
2	50	164,0	0	164,0	100
3	100	329,0	49,2	280,0	85,1

A determinação das concentrações de proteínas do soro e dos centrifugados antes e após o tratamento adsorptivo, com a HA, revelou adsorção de 100% das proteínas, quando adicionando de 30 e 50 mL, de soro em 100 mL HA. Após a centrifugação com tampão fosfato 10 mM, pH 5,0, praticamente todas proteínas ficaram adsorvidas da HA. Os resultados do Quadro 3 mostraram que a HA tem boa capacidade de adsorção de proteínas quando misturada com do soro de leite e que adicionando fosfato de sódio, em diferentes concentrações e pH seguido de centrifugação, acontece a eluição das proteínas, processo semelhante ao da cromatografia.

Entretanto, com a adição de 50 mL de soro em 100 mL de HA, apesar dos 100% de capacidade de adsorção no primeiro eluente, não houve boas recuperações da  $\alpha$  – lactoalbumina e da  $\beta$  – lactoglobulina nas etapas posteriores de eluição. Portanto, definiu-se que 30 mL de soro foi a quantidade ideal para ser adicionada em 100 mL de HA para uma melhor separação e recuperação das proteínas do soro de leite.

SANTANA et al (2005) realizaram um trabalho que apresentou um baixo desempenho da HA na adsorção de proteínas comparada com o tratamento adsortivo com carvão ativado em leite de lama. O carvão ativado revelou a remoção de 81% das proteínas. No entanto, com a correção do pH da HA feito com HCl e a centrifugação, o resultado encontrado na presente dissertação foi de 100%, conforme o Quadro 3, mostrando que a HA tem boa capacidade de adsorção quando as condições de tratamento da HA são alterados.

Esse resultado mostra que a HA pode ser utilizada também em tratamento adsortivo em leite de lama para separar a lactose e sais das proteínas do soro pela sua boa capacidade de adsorção, desde que o pH seja controlado.

#### **4.4.1. Adsorção de proteínas do soro de leite seguido de centrifugação**

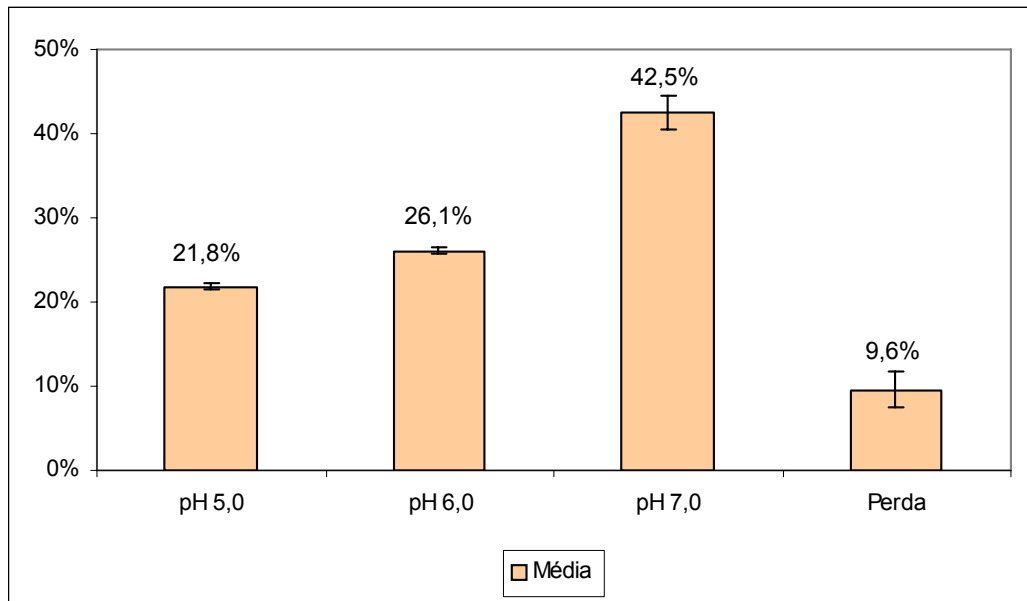
Os resultados dos rendimentos médios da eluição seqüencial com tampão fosfato de sódio seguido de centrifugações, conforme o item 3.6.2 encontra-se na Figura 15. Com a adição do tampão fosfato de sódio 400 mM, pH 5,0 foram eluídas da HA 21,8 % de proteínas totais. Foi observado, com a análise de SDS-PAGE, que nesse centrifugado, predominava a presença de  $\alpha$  – lactalbumina (Figura 16).

Com a adição do tampão fosfato de sódio 400 mM, pH 6,0 foram eluídas da HA, em média, 26,1 % de proteínas totais. Foi observado, com a análise de SDS-PAGE (Figura 16) que, nesse centrifugado, predominou a presença de  $\beta$  – lactoglobulina.

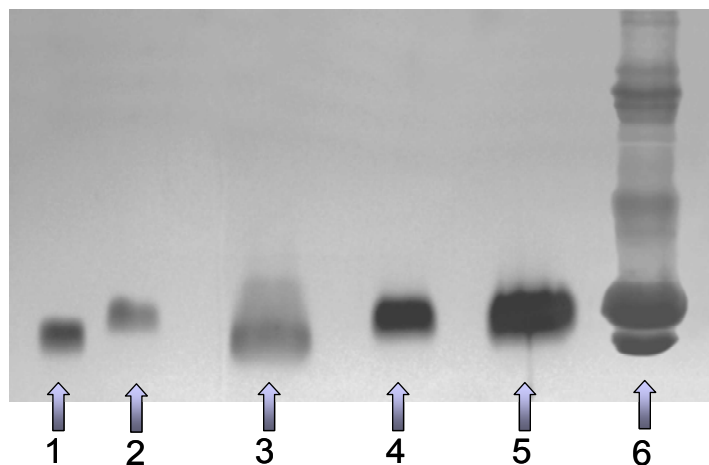
Com a adição do tampão fosfato de sódio 400 mM, pH 7,0 foram eluídas da HA, em média, 42,5 % de proteínas totais. Foi observado, com a análise de SDS-PAGE que nesse centrifugado predominou a presença de  $\beta$  – lactoglobulina (Figura 16). No entanto, os valores de pH 6,0 e 7,0 juntos predominaram a mesma proteína, totalizando 68,6% de proteínas totais com predominância da  $\beta$  – lactoglobulina. Conforme Sgarbieri (2005), a  $\beta$  – lactoglobulina corresponde a, aproximadamente, 58% das proteínas totais do soro de leite.

Ficou evidenciado que com essa metodologia houve separação das duas proteínas mais abundantes presentes no soro de leite e uma recuperação das proteínas totais de 90,4%, portanto a perda foi de 9,6%. No eluente do tampão fosfato 400 mM, pH 5, do método da cromatografia líquida em coluna de HA, possivelmente, estejam presentes as imunoglobulinas, e no eluente do

tampão 400 mM, pH 6,0, as albumina do soro bovino - BSA (Rossano et al 2002).



**Figura 15:** Média e desvio padrão da recuperação das proteínas do soro em HA seguida de centrifugação. No centrifugado dos tampões fosfato pH 5,0, 6,0 e 7,0, foram eluídos 21,8%, 26,1% e 42,5% de proteínas totais, respectivamente. A perda de proteínas totais foi de 9,6%.



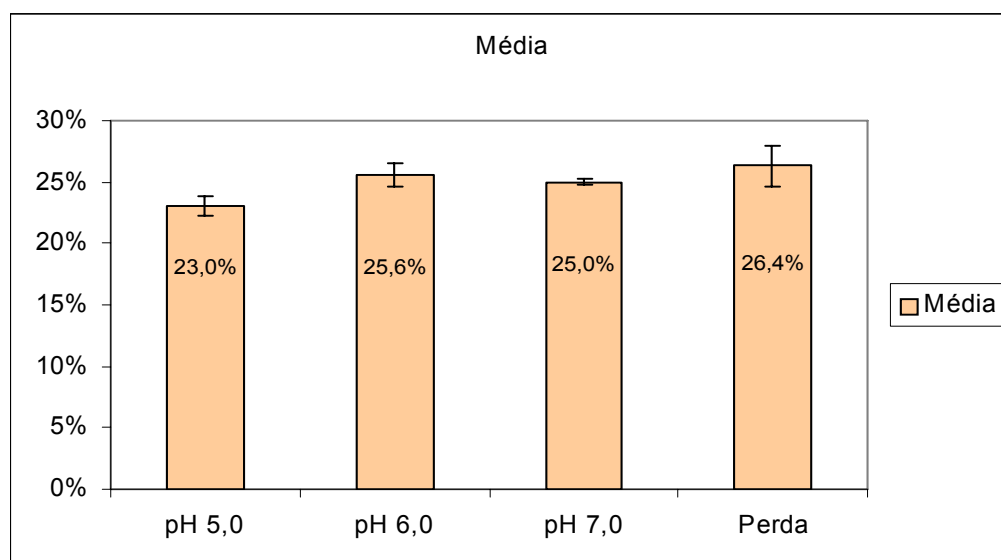
**Figura 16:** Perfil eletroforético (SDS-PAGE) das proteínas separadas por adsorção de em HA seguido de centrifugação. **1** - Padrão de  $\alpha$ -lactalbumina; **2** - Padrão de  $\beta$ -lactoglobulina; **3** - Centrifugado 400 mM, pH 5,0; **4** - Centrifugado 400 mM, pH 6,0; **5** - Centrifugado 400 mM, pH 7,0; **6**- Soro de leite.

A Figura 16 mostra o resultado da SDS-PAGE da separação das proteínas do soro de leite em HA seguido de centrifugação. O centrifugado com tampão fosfato de sódio 400 mM, pH 5,0, colocado na canaleta 3, foi confirmado a predominância de  $\alpha$  – lactoalbumina comparado com o padrão de  $\alpha$  – lactoalbumina usado na canaleta 1. O Centrifugado 400 mM, pH 6,0, colocado na canaleta 4, mostrou a predominância da  $\beta$  – lactoglobulina comparado com o padrão de  $\beta$  – lactoglobulina usado na canaleta 2. Foi observado que o Centrifugado 400 mM, pH 7,0, colocado na canaleta 5, também predominou a  $\beta$  – lactoglobulina. Foi feito a análise de eletroforese do soro para a verificação das proteínas totais na canaleta 6.

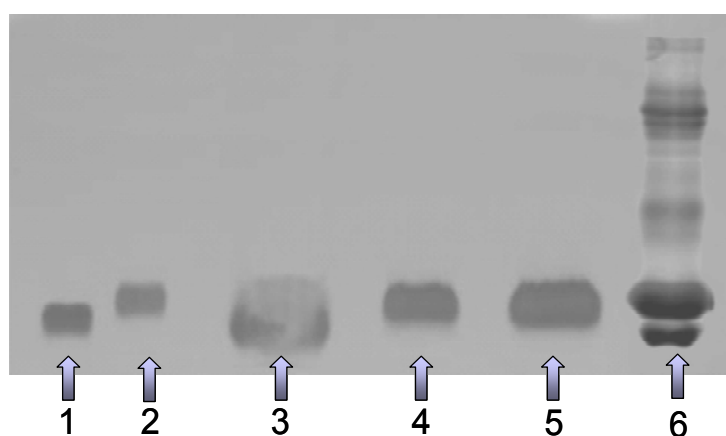
#### **4.5. Método 3: Resultado da Separação das proteínas do soro por adsorção em HA seguido de filtração a vácuo.**

Os resultados dos rendimentos médios da eluição seqüencial, com tampão fosfato de sódio, seguidos de filtração a vácuo, conforme o item 3.6.3 dos materiais e métodos encontra-se na Figura 17. Com a adição do tampão fosfato de sódio 400 mM, pH 5,0, foi eluído da HA, 23,0 % de proteínas totais. Foi observado com a análise de SDS-PAGE que nesse filtrado predominava a presença de  $\alpha$  – lactoalbumina (Figura 18).

Com a adição do tampão fosfato de sódio 400 mM, pH 6,0, foi eluído da HA, 25,6 % de proteínas totais. Foi observado com a análise de SDS-PAGE, na Figura 18, que esse filtrado predominou a presença de  $\beta$  – lactoglobulina.



**Figura 17:** Média e desvio padrão da recuperação das proteínas do soro em HA seguida de filtração a vácuo. No filtrado dos tampões fosfato pH 5,0, 6,0 e 7,0, foram eluídos 23,0%, 25,6% e 25,0% de proteínas totais, respectivamente. A perda de proteínas totais, foi de 26,4 %.



**Figura 18:** Perfil eletroforético (SDS-PAGE) das proteínas separadas por adsorção de em HA seguida de filtração a vácuo. **1** - Padrão de  $\alpha$ -lactalbumina; **2** - Padrão de  $\beta$ -lactoglobulina; **3**- Filtrado 400 mM, pH 5,0; **4** - Filtrado 400, mM pH 6,0; **5** - Filtrado 400 mM, pH 7,0; **6**- Soro de leite.

Com a adição do tampão fosfato de sódio 400 mM, pH 7,0, foi eluído da HA, 25,0 % de proteínas totais. Foi observado com a análise de SDS-PAGE (Figura 18) que nesse filtrado predominou também a presença de  $\beta$  - lactoglobulina. No entanto, o pH 6,0 e 7,0 juntos predominaram a mesma

proteína, totalizando 50,6% de proteínas totais com predominância da  $\beta$  – lactoglobulina. Apesar de a separação ter sido evidenciada, não houve uma boa recuperação total de proteínas comparado com o método por centrifugação e a cromatografia em coluna.

Nesta metodologia houve uma perda maior de proteínas totais equivalente a 26,4% em relação aos métodos 1 e 2. No eluente correspondente ao tampão fosfato 400 mM, pH 5,0, a recuperação da  $\alpha$  – lactoalbumina apresentou praticamente o mesmo valor comparado ao método da adsorção seguido de centrifugação. Foi constatado que o tampão 400 mM, pH 7,0 não apresentou boa separação da  $\beta$  – lactoglobulina, resultando em baixo rendimento de recuperação. Este fato pode ter sido causado, provavelmente, pelo baixo desempenho dinâmico nas condições do método. As condições de vácuo podem ter influenciado na compactação da HA diminuindo a capacidade de dessorção da  $\beta$  – lactoglobulina. Conforme Sousa et al (2007), a HA é um fosfato de cálcio constituído de nanocristalitos porosos de fácil compactação.

O total de proteínas recuperada na adsorção em HA seguida de filtração a vácuo foi de 73,6 %. O resultado da análise de eletroforese em gel de poliacrilamida para a identificação das proteínas dos filtrados 3, 5 e 6, encontra-se na Figura 18 e confirmou-se que no filtrado 3 estava separado a  $\alpha$ -Lactoalbumina e nos filtrados 5 e 6 estava a  $\beta$ -Lactoglobulina.

A Figura 18 mostra o resultado da SDS-PAGE da separação das proteínas do soro de leite em HA seguido de filtração a vácuo. O filtrado na canaleta 3, com tampão fosfato de sódio 400 mM, pH 5,0, foi confirmado a predominância de  $\alpha$  – lactoalbumina comparado com o padrão de  $\alpha$  – lactoalbumina usado na canaleta 1. O Filtrado da canaleta 4, com tampão 400 mM, pH 6,0, mostrou a predominância da  $\beta$  – lactoglobulina comparado com o padrão de  $\beta$  – lactoglobulina usado na canaleta 2. Foi observado que o Filtrado 400 mM, pH 7,0, da canaleta 5, também predominou a  $\beta$  – lactoglobulina. Na canaleta 6 foi feita a análise de eletroforese do soro de leite para a verificação das proteínas totais.

Nesta metodologia a separação ocorreu na temperatura de 55 °C melhorando o fluxo da filtração a vácuo sem provocar alterações drásticas nas proteínas de interesse.

#### 4.6. Recuperação das proteínas totais pelos três métodos

Os valores da recuperação das proteínas totais pelos métodos, são apresentados no Quadro 4.

O método da cromatografia de adsorção em coluna e o método de adsorção, seguido de centrifugação, são os métodos que melhor recuperaram as proteínas totais. A cromatografia em coluna recuperou em média 89,2 %  $\pm$  2,5 de proteínas totais e o método de adsorção seguido de centrifugação, 90,4 %  $\pm$  2,1. Estes métodos não diferem entre si, em nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. A adsorção seguida de filtração a vácuo recuperou em média de 73,7 %  $\pm$  1,70 de proteínas totais, sendo considerado, portanto, o método menos eficiente.

**Quadro 4** - Valores médios em percentagens das recuperações das proteínas totais extraídas pelos três métodos de separação.

<b>Métodos</b>	<b>Proteínas totais (%)</b>
Cromatografia de adsorção	89,21 $\pm$ 2,52 <sup>a</sup>
Adsorção seguido de Centrifugação	90,44 $\pm$ 2,12 <sup>a</sup>
Adsorção seguido de Filtração	73,69 $\pm$ 1,70 <sup>b</sup>
d.m.s. (diferença mínima significativa)	5,36

As médias de recuperação das proteínas totais apresentadas no Quadro 5, com as mesmas letras, indicam que não houve diferença entre si, em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

#### 4.7. Recuperação da $\alpha$ - lactoalbumina pelos três métodos

Os valores da recuperação da  $\alpha$ -lactoalbumina pelos métodos, são apresentados no Quadro 5.

O método da cromatografia em coluna obteve em média  $42,7\% \pm 2,01$ , de recuperação da  $\alpha$  – lactoalbumina, portanto, o que apresenta melhor desempenho. Os métodos de adsorção, seguido de centrifugação e seguido de filtração, tiveram  $21,8\% \pm 0,35$  e  $23,1\% \pm 0,83$  de recuperação de  $\alpha$  – lactoalbumina, respectivamente, não apresentando diferença entre si.

**Quadro 5** - Valores médios em percentagens das recuperações da  $\alpha$  - lactoalbumina extraídas pelos três métodos de separação.

<b>Métodos</b>	<b><math>\alpha</math>-lactoalbumina (%)</b>
Cromatografia de adsorção	$42,7 \pm 2,01^a$
Adsorção seguido de Centrifugação	$21,8 \pm 0,35^b$
Adsorção seguido de Filtração	$23,1 \pm 0,83^b$
d.m.s. (diferença mínima significativa)	3,18

As médias de recuperação da  $\alpha$  – lactoalbumina apresentadas no Quadro 5, com as mesmas letras, indicam que, não difere entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

#### **4.8. Recuperação da $\beta$ - lactoglobulina pelos três métodos**

Os valores da recuperação da  $\beta$  – lactoglobulina pelos métodos, são apresentados no Quadro 6.

O método de adsorção de proteínas, seguido de centrifugação obteve em média  $68,6\% \pm 2,32$ , na recuperação da  $\beta$  – lactoglobulina, portanto, foi o que apresenta melhor desempenho.

Os métodos de cromatografia em coluna e de adsorção, seguido de filtração a vácuo, tiveram  $46,5 \pm 0,52$  e  $50,6 \pm 0,89$ , de recuperação da  $\beta$  – lactoglobulina, respectivamente, apresentando diferenças significativas entre si. Portanto, o método da adsorção, seguido de filtração, teve melhor desempenho que a cromatografia em coluna de adsorção.

**Quadro 6** – Valores médios em percentagens das recuperações da  $\beta$  - lactoglobulina extraídas pelos três métodos de separação.

<b>Métodos</b>	<b><math>\beta</math>-lactoglobulina (%)</b>
Cromatografia de adsorção	46,5 $\pm$ 0,52 <sup>c</sup>
Adsorção seguido de Centrifugação	68,6 $\pm$ 2,32 <sup>a</sup>
Adsorção seguido de Filtração	50,6 $\pm$ 0,89 <sup>b</sup>
d.m.s. (diferença mínima significativa)	3,68

As médias de recuperação da  $\beta$  -lactoglobulina apresentadas no Quadro 6, com letras diferentes, “a”, “b” e “c”, indicam que houve diferença significativa, entre os métodos, em nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

## 5. CONCLUSÕES

A hidroxiapatita sintetizada no trabalho apresentou excelente capacidade de adsorção, sendo uma alternativa viável e de baixo custo na separação e purificação de proteínas do soro de leite.

O método de separação por cromatografia de adsorção em coluna de HA, por adsorção de proteínas em HA seguido de centrifugação e por adsorção de proteínas em HA seguido de filtração a vácuo, demonstraram boa separação das frações de  $\alpha$  – lactoalbumina das frações contendo a  $\beta$  – lactoglobulina, quando eluídas em tampão fosfato de sódio em diferentes concentrações e pH. Porém, houve diferenças entre os métodos, conforme os resultados obtidos, em relação ao rendimento dessas frações separadas.

Em relação à recuperação total de proteínas, o método por cromatografia de adsorção em colunas de HA e a adsorção em HA seguido de centrifugação, foram os métodos que tiveram o melhor rendimento na recuperação das proteínas totais, com valores próximos de 91% de rendimento.

O método por cromatografia de adsorção em coluna de HA foi o que apresentou melhor recuperação e separação da  $\alpha$  – lactoalbumina e a adsorção seguido de centrifugação, apresentou melhor recuperação da  $\beta$  – lactoglobulina. O método por adsorção das proteínas seguido de filtração a vácuo apesar de ter tido boa separação das proteínas, nas condições do experimento, foi a metodologia que apresentou menor rendimento na recuperação das proteínas.

Os trabalhos utilizando HA, na purificação de proteínas, se resumem na cromatografia em colunas, no entanto, a adsorção seguida de centrifugação é um método alternativo e de baixo custo.

Os resultados do trabalho demonstraram que os métodos podem ser aplicados para a separação das proteínas do soro de leite em tampão fosfato e a posterior purificação das proteínas, poderá ser feito por precipitação, filtração em membranas, ou métodos mais sofisticados como a diálise.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, J.C.; SENA, L.; SOARES, G. D. A. Síntese da hidroxiapatita e refinamento estrutural por difração de raio-x. **Química Nova**. v. 30, n. 8, p. 1853-1859, 2007.

BARBOSA, L. C. A. **Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. Editora UFV, p.13 e 17, 2007.

BLUM, H., BEIER, H. & GROSS, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**. v. 8, p. 93-99, 1987.

BOTELHO, M.; VALENTE-MESQUITA, V.L.; OLIVEIRA, K.M.G.; POLIKARPOV, I.; FERREIRA, S.T. Pressure denaturation of  $\beta$ -lactoglobulin. Different stabilities of isoforms A and B, and an investigation of the Tenford transition. **Eur. J. Biochem.**, v. 267, n. 2, p. 235-241, 2000.

BOUNOUS, G.; KONGSHAVN, P.A.L.; TAVEROFF, A.; GOLD, P. Evolutionary traits in human milk proteins. **Medical Hypothesis**, v. 27, p. 133-140, 1988.

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

BRUNNER, J.R. Milk proteins. In: WHITAKER, J.R.; TANNENBAUM, S.R. (Eds.). **Food proteins**. AVI Publishers Company, Inc., 602 p., p.175-208. 1977.

CAPITANI, C. D, PACHECO, M. T. B., PILOSOFF, A. M., PÉREZ, O.E. Caracterização e comportamento dinâmico dos complexos de Carboximetil Celulose com Proteínas do Soro de Leite. **Brasilian Journal of Food Technology**, edição especial, p. 29-33, jan, 2006.

CAPITANI, C. D., **Interação de proteínas do soro de leite com polissacarídeo: fracionamento e estudo das propriedades funcionais dos complexos**. Campinas. SP, 2004. 1-3p, 6-12p. Dissertação de mestrado, Alimentos e Nutrição. Universidade Estadual de Campinas.

CHAGAS, B. M. E.; MACEDO, G. R.; SANTOS, E. S. Avaliação preliminar da cinética de adsorção das proteínas do soro de queijo coalho para a resina de troca aniônica Streamline DEAE. In: VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, 2005, Campinas/SP. VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, 2005.

COLLINS. C.H.; BRAGA. G.L.; BONATO. P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. Ed. Da Unicamp, 7º ed, 63-70,74-77p. Campinas,1997.

DAMODARAN, S.; PARAF. A. **Food proteins and their applications**. Ed. Marcel Dekker, 589-591p. New York, 1997.

DAI-DONG, J.X.; NOVAK, G.; HARDY, J. Stabilization of vitamin C by  $\beta$ -lactoglobulin during heat treatment. **Science des Aliments**. v. 10, p. 393, 1990.

EBNER, K.E.; MCKENZIE, L.M.  $\alpha$ -lactalbumin and galactosyl transferase in rat serum and their relationship to milk secretion. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 49, n.1, p. 624-630, 1972.

EUGENE, A.; BERLINER, L.J.  $\alpha$ -lactalbumin: structure and function. **FEBS Letters**, v. 473, n.3, p. 269-274, 2000.

FALKOSKI, D. L. **Purificação e caracterização de  $\alpha$ -galactosidases do fungo *Penicillium griseoroseum* para utilização na hidrólise de oligossacarídeos de rafinose em derivados de soja**. Viçosa, MG , 2007. 10 – 15 p. Dissertação de mestrado, Bioquímica Agrícola e Biologia Molecular. Universidade Federal de Viçosa.

FONSECA, L.M., AMADO, J.E.S., BRADLEY, R. L. Obtenção de concentrado e isolado protéico do soro de queijo minas por meio de precipitação com goma xantana. X Semana de Iniciação científica – Escola de Veterinária – UFMG. 2001.

FOX P.F.; McSWEENEY P.L.H. **Advanced Dairy Chemistry – 1 Proteins**, 3<sup>o</sup> ed. Third Edition. Part A, 338-342, 389, 406-409p. Kluwer Academic/ Plenum Publishers. New York, 2003.

FOX. S. W.; FOSTER J. F. **Introduction to Protein Chemistry** – Ed. John Wiley & Sons, Inc. 305-307, 312-313p. United States of America, 1957.

FUJIMOTO. J., REIS, E. A. O., PETRI, D.F.S. Formação de multicamadas de polissacarídeos e proteína. **Química Nova**. v. 25, n.5, p. 757-761, 2002

IAMETTI, S.; DE GREGORI, B.; VECCHIO, G.; BONOMI, F. Modifications occur at different structural levels during the heat denaturation of  $\beta$ -lactoglobulin. **FEBS Journal**. v. 237, n. 1, p. 106-112, 1996.

IPSEN, R., OTTE, J. Self assembly of partially hydrolysed  $\alpha$ -lactalbumin. **Biotechnology Advances**. v. 25, p. 605, 2007.

JANG, H.; SWAISGOOD, H. Analysis of ligand binding and  $\beta$ -lactoglobulin denaturation by chromatography on immobilized trans-retinal. **Journal Dairy Science**. v. 73, p. 2067-2074, 1990.

LACERDA, K.A.; LAMEIRAS, F.S.; SILVA, V. V. Síntese e caracterização de matrizes porosas de hidroxiapatita para aplicação como fontes radioativas em braquiterapia. **Revista Escola de Minas**, v.59, n. 2, p. 217-223, abr-jun 2006.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. v. 227, p. 680-685, 1970.

LANGE, D.C.; KOTHARI, R.; PATEL, R.; PATEL, S.C. Retinol and retinoic acid bind to a surface cleft in bovine  $\beta$ -lactoglobulin: a method of binding site determination using fluorescence resonance energy transfer. **Biophysical Chemistry**. v. 74, p. 45-51, 1998.

LONDOÑO, M. E., ECHAVARRÍA, A., DE LA CALLE, F. Características cristalóquímicas de la hidroxiapatita sintética tratada a diferentes temperaturas. **Revista EIA**. v. 5, p.109-118, junho, 2006.

LOURENÇO, E.J. **Tópicos de proteínas de alimentos**. cap. 5, p.179-231. Edição Funep, Jaboticabal, São Paulo, 2000.

MACHADO, R. M.G., FREIRE, V. H., SILVA, P. C., FIGUERÊDO, D. V., FERREIRA, P. E. **Controle ambiental nas pequenas e médias indústrias de laticínios**. Projeto Minas Ambiente, cap. 3, p.51. SEGRAC Editora e Gráfica Limitada, Belo Horizonte, 2002.

MARTINEZ, M. M. M. **Compósito de hidróxiapatita e lignina como promotor de osseointegração entre implante metálico e tecido ósseo: Estudo experimental**. Viçosa. MG, 2008. 20, 44-45p. Dissertação de mestrado, Medicina Veterinária. Universidade Federal de Viçosa.

MCINTOSH, G.H.; ROYLE, P.J.; LELEU, R.K.; REGISTER, G.O.; JOHNSON, M.A.; GRINSTED, R.L.; KENWARD, R.S.; SMITHERS, G.W. Whey protein as functional ingredients. **International Dairy Journal**. v. 8, p. 423-434, 1998.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 31, p.426-428, 1959.

MODLER, H.W. Milk processing. In: NAKAI, S.; MODLER, W. (Eds.). **Food proteins: processing applications**. Wiley-VCH, Inc. p.1-21, 2000.

MONTEIRO, P. S. **Partição de  $\alpha$ -Lactoalbumina e  $\beta$ -Lactoglobulina por extração no ponto de névoa em sistemas bifásicos contendo copolímeros triblocos**. Viçosa. MG, 2005. 4-5p. Dissertação de mestrado, Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Viçosa.

MORR, C.V.; FOEGEDING, E.A. Composition and functionality of commercial whey and milk protein concentrates and isolates: a status report. **Food Technology**. V. 44, p.100-112, 1990.

PALAZOLO, G.; RODRIGUEZ, F.; FARRUGIA, B.; PICO, G.; DELORENZI, N. Heat treatment of  $\beta$ -lactoglobulin: structural changes studies by partitioning and fluorescence. **J. Agr. Food Chemistry**. v. 48, n. 3, p. 817-822, 2000.

PAULA, J. C. J. **Elaboração e estabilidade de bebida carbonatada aromatizada à base de soro de leite**. Viçosa. MG, 2005. 4-5p. Dissertação de mestrado, Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Viçosa.

PHOTCHANACHAI, S.; KITABATAKE, N. Heating of  $\beta$ -lactoglobulin. A solution in a closed system at high temperatures. **Journal Food Science**. v. 66, p. 647-652, 2001.

PINHEIRO, A.J.R. & MOSQUIM, M.C.A.V. Processamento de leite de consumo. Viçosa. MG, 1991. Apostilas de aulas. Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Viçosa.

ROSSANO, R., D'ELIA, A., RICCIO, P. One-Step Separation from lactose: recovery and purification of major cheese-whey proteins by hydroxyapatite – A flexible procedure suitable for small – and médium – scale preparations. **Protein Expression and Purification**. v. 21, p. 165-169, 2001.

ROUVINEN, J.; RAUTIAINEN, J.; VIRTANEN, T.; ZEILER, T.; KAUPINEN, J.; TAIVAINEN, A.; MÄNTYJÄRVI, R. Probing the molecular basis of allergy. Three-dimensional structure of the bovine lipocalin allergen Nos d2. **The Journal Biological Chemistry**. v. 274, n. 2, p. 337-343, 1999.

SAITO, F., KIM W. Sonochemical synthesis of hydroxyapatite from  $H_3PO_4$  solution with  $Ca(OH)_2$ . **Ultrasonics Sonochemistry**. v. 8, p. 86, 2001.

SANTANA, R.S., COSTA, S.A., ABREU, C.A.M., ALBUQUERQUE, S.S.M.C. Separação das proteínas do soro de queijo por adsorção utilizando hidroxiapatita e carvão ativado como adsorventes. **Revista de Laticínios “Cândido Tostes”**. v.60, n.345, p. 239 - 242, 2005.

SAWYER, L.; KONTOPIDIS, G. The core lipocalin, bovine  $\beta$ -lactoglobulin. **Biochimica Biophysica Acta**. v. 1, n. 482, p.136-148, 2000.

SEGAWA, T.; SUGAI, S. Interactions of divalent metal ions with bovine, human, and goat  $\alpha$ -lactalbumin. **J. Biochem**. v. 93, n.1, p. 321-328, 1983.

SÉLO, I.; CLÉMENT, G.; BERNARD, H.; CHATEL, J-M.; CRÉMINON, C.; PELTRE, G.; WAL, J-M. Allergy to bovine  $\beta$ -lactoglobulin: specificity of human IgE to tryptic peptides. **Clin. Exp. Allergy**. v. 29, n. 1, p. 055-063, 1999.

SEVERINO, L.S. O que sabemos sobre a torta da mamona. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - EMBRAPA, Documentos ISSN 0103 – 0205. p.14. Campina Grande PB, 2005.

SGARBIERI, V. C. Review: Structural and physicochemical properties of milk proteins. **Brasilian Journal of Food Technology**, v.8,n.1, p. 43-56, jan /mar, 2005.

SNYDER L. R.; KIRKLAND J.J. **Introduction to modern liquid chromatography**. Ed. John Wiley & Sons. 399-402p. United States of America, 1974.

SOUZA K. C.; MACHADO M. R. O; DE SOUSA E. M. B. Preparação de hidroxiapatita mesoporosa: influência do surfactante nas características estruturais. **Anais do 51º Congresso Brasileiro de Cerâmica**, Salvador - BA, 3 a 6 de junho de 2007.

STUART, D.I.; ACHARYA, K.R.; WALKER, N.P.C.; SMITH, S.G.; LEWIS, M.; PHILLIPS, D.C.  $\alpha$ -lactalbumin possesses a novel calcium binding loop. **Nature**. v. 324, p. 84-87, 1986.

TAULIER, N.; CHALIKIAN, T. Characterization of pH-induced transitions of  $\beta$ -LG: ultrasonic, densitometric, and spectroscopy studies. **Journal of Molecular Biology**. v. 314, n. 4, p. 873-889, 2001.

TISELIUS, A., HJRTIÉN, S., and LEVIN, O. Protein chromatography on calcium phosphate columns. **Arch. of Biochem. Biophys.** v. 65, p. 132 – 155, 1956.

VEISSEYRE, R. **Lactologia Técnica. Recogida, Tratamiento y transformacion de la leche em países templados y calientes**. Ed. Acribia, 15p., Zaragoza, Espana. 1972.

VOGT, S. RUTH, F. 1997. Comparison of anion – exchange and hydroxyl apatite displacement chromatography for the isolation of whey proteins. **Journal of Chromatography A**, v. 760, p.125-137, 1997.

XU, H.; Li, M.; He, B. Immobilization of *Candida cylindracea* lipase on methyl acrylate-divinyl benzene copolymer and its derivatives. **Enzyme and Microbial Technology**, v.17, n. 3, p.194-199, 1995.

WEBB, B.H., JOHNSON A.H.; ALFORD, J.A. **Fundamentals of Dairy Chemistry**. Second Edition. 619-622,625p. United States of America,1974.

WONG, D.W.S.; CARMIRAND, W.M.; PAVLAT, A.E. Structures and functionalities of milk proteins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 36, n. 8, p. 807-844, 1996.

Revestimento de Hidroxiapatita. [www.revestimentohidroxiapatita.com.br/content.php?recid=2787](http://www.revestimentohidroxiapatita.com.br/content.php?recid=2787) & type=A, publicado 20/06/2004 e acessado 23/11/2007.

YANG, J.; DUNKER, A.K.; POWERS, J.R.; CLARK, S.; SWANSON, B.G. Beta-lactoglobulin molten globule induced by high pressure. **J. Agr. Food Chem.** v. 49, n. 3, p. 236-243, 2001.

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

ZUÑIGA, A.D.G., PEREIRA, J.A.M., COIMBRA, J.S.R., MINIM, L.A., ROJAS, E.E.G. Revisão: Técnicas usadas no processo de purificação de biomoléculas. **B. CEPPA**, v. 21, n.1, p. 61-82, jan./jun., 2003.