

RITA DE CÁSSIA SUPERBI DE SOUSA

**SEPARAÇÃO DA LISOZIMA, CONALBUMINA E OVALBUMINA
PRESENTES NA CLARA DO OVO: ASPECTOS TECNOLÓGICOS E
TERMODINÂMICOS**

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

S729s
2008

Sousa, Rita de Cássia Superbi de, 1983-
Separação da lisozima, conalbumina e ovalbumina
presentes na clara do ovo : aspectos tecnológicos e
termodinâmicos / Rita de Cássia Superbi de Sousa.
– Viçosa, MG, 2008.
xv, 100f. : il. ; 29cm.

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

1. Ovos - Proteínas - Sistemas aquosos bifásicos.
2. Partição de fases. 3. Análise cromatográfica. 4. Termo-
dinâmica. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 641.375

RITA DE CÁSSIA SUPERBI DE SOUSA

**SEPARAÇÃO DA LISOZIMA, CONALBUMINA E OVALBUMINA
PRESENTES NA CLARA DO OVO: ASPECTOS TECNOLÓGICOS E
TERMODINÂMICOS**

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: 21 de fevereiro de 2008.

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

Prof. Edwin Elard Garcia Rojas

Prof^ª. Maria do Carmo Hespanhol da
Silva

Prof^ª. Renata Cristina Ferreira Bonomo

Prof^ª. Jane Sélia dos Reis Coimbra
(Orientadora)

*Aos meus amados pais, Silvana e Emílio, à minha irmã Raquel e à minha avó Alcina,
que sempre torceram pela realização dos meus ideais.
Ao meu noivo Ronaldo, pelo carinho e companheirismo em todas as horas.*

Dedico esta dissertação

*De tudo, ficaram três coisas:
A certeza de que estamos sempre recomeçando...
A certeza de que precisamos continuar...
A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...
Portanto devemos fazer da interrupção um caminho novo...
Da queda, um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro... (Fernando Pessoa)*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença constante e por ter me dado a oportunidade de trilhar este caminho.

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

Ao CNPq, pelos recursos financeiros e pela bolsa concedida.

À minha família por todo amor e incentivo que me conduziram até aqui.

À minha orientadora, Profa. Jane Sélia dos Reis Coimbra, cujos ensinamentos foram decisivos para que eu pudesse atingir meus objetivos, agradeço pela orientação, confiança, motivação, paciência e amizade.

Ao grande amigo Edwin, pelas valiosas sugestões e conhecimento compartilhado durante esse dois anos de mestrado.

Ao professor Luís Henrique Mendes da Silva pela ajuda na condução dos experimentos e pela grande orientação.

Ao professor Luis Antônio Minim, pela orientação, incentivo e recursos oferecidos.

Ao meu amigo Leandro, que nos momentos mais difíceis sempre me deu apoio.

Aos amigos do Laboratório de Processos de Separação (LPS), Fabíola, Daniela, Rosana, Ingrid, Bruna Mara, Gisele, Priscilla, Kika, Janaína, Jaqueline, Rafael, Omar, César, Vagner, Toninho, Roney, Ivan e Bruno, pelo companheirismo, pelos momentos agradáveis proporcionados e pelas informações compartilhadas.

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

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho e não foram aqui citados, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
INTRODUÇÃO GERAL	1
OBJETIVO GERAL	3
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
CAPÍTULO 1	4
1. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
1.1. OVO DE GALINHA	4
1.2. CLARA DO OVO.....	5
1.2.1. Proteínas da Clara do Ovo.....	5
1.2.1.1. Ovalbumina	7
1.2.1.2. Conalbumina (Ovotransferrina)	8
1.2.1.3. Lisozima.....	9
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	10
CAPÍTULO 2 - ADSORÇÃO DAS PROTEÍNAS DA CLARA DO OVO EM LEITO EXPANDIDO.....	14
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1. USO DA TROCA IÔNICA NA SEPARAÇÃO DE PROTEÍNAS	15
2.2. CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA POR ADSORÇÃO EM LEITO EXPANDIDO	16
2.2.1. Princípio e Operação da ALE.....	18
2.2.2. Hidrodinâmica do Leito Expandido	20
2.2.2.1. Observação Visual	22

2.2.2.2. Grau de Expansão do Leito	22
2.2.2.3. Distribuição do Tempo de Residência (DTR).....	23
2.2.2.4. Determinação do Coeficiente de Dispersão Axial	24
2.2.3. Adsorventes	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1. MATERIAIS	26
3.2. SEPARAÇÃO DAS FRAÇÕES PROTÉICAS DA CLARA USANDO ADSORÇÃO EM LEITO EXPANDIDO	27
3.3. QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS NAS FRAÇÕES PROTÉICAS	28
3.4. ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	29
3.5. GRAU DE EXPANSÃO DO LEITO	29
3.6. DISTRIBUIÇÃO DO TEMPO DE RESIDÊNCIA (DTR).....	29
3.7. DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE DISPERSÃO AXIAL (D_{AXI})	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1. EXPANSÃO DO LEITO E DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE DISPERSÃO AXIAL	30
4.2. ADSORÇÃO E DESSORÇÃO DAS PROTEÍNAS DA CLARA <i>IN NATURA</i> NO LEITO EXPANDIDO	32
4.2.1. Curvas de Ruptura	34
5. CONCLUSÃO	35
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36
CAPÍTULO 3 - PARTIÇÃO DAS PROTEÍNAS DA CLARA DO OVO (LISOZIMA E CONALBUMINA) EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS.....	
1. INTRODUÇÃO	40
2. REVISÃO DE LITERATURA	41
2.1. SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS (SAB).....	41
2.1.1. Tipos de Sistemas Aquosos Bifásicos.....	44
2.1.2. Constituintes das Fases.....	45

2.1.2.1. Polietilenoglicol (PEG).....	45
2.1.2.2. Sais.....	47
2.1.3. Diagrama de Fases do Sistema Aquoso Bifásico.....	48
2.1.4. Variáveis que Influenciam o Sistema Aquoso Bifásico.....	51
2.1.4.1. Massa Molar e Concentração do Polímero.....	51
2.1.4.2. Tipo de Cátion e pH.....	52
2.1.4.3. Tipo e Concentração de Sal.....	53
2.1.4.4. Temperatura.....	53
2.1.5. Coeficiente de Partição.....	54
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
3.1. MATERIAIS.....	55
3.2. ESCOLHA DOS SISTEMAS DE TRABALHO.....	55
3.3. PREPARO DOS SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS (SAB).....	56
3.4. MEDIDA DO VOLUME DAS FASES.....	57
3.5. QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS PRESENTES NAS FASES.....	57
3.6. CÁLCULO DO COEFICIENTE DE PARTIÇÃO.....	58
3.7. DETERMINAÇÃO DA ENTALPIA DE TRANSFERÊNCIA.....	59
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	60
4.1. INFLUÊNCIA DO COMPRIMENTO DA LINHA DE AMARRAÇÃO (TLL) NA PARTIÇÃO DAS PROTEÍNAS.....	61
4.2. COEFICIENTES DE PARTIÇÃO DA FRAÇÃO PROTÉICA DA CLARA DO OVO <i>IN</i> <i>NATURA</i> OBTIDA POR ADSORÇÃO EM LEITO EXPANDIDO.....	64
4.3. ANÁLISE TERMODINÂMICA DA PARTIÇÃO.....	66
5. CONCLUSÃO.....	74
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
CAPÍTULO 4 - SOLUBILIDADE DAS PROTEÍNAS DA CLARA DO OVO: OVALBUMINA, CONALBUMINA E LISOZIMA.....	79
1. INTRODUÇÃO.....	79

2. REVISAO DE LITERATURA.....	80
2.1. PROTEÍNAS DA CLARA DO OVO	80
2.2. SOLUBILIDADE PROTÉICA	80
2.2.1. Fatores que Influenciam a Solubilidade da Proteína.....	82
2.2.1.1. pH da Solução	82
2.2.1.2. Força Iônica.....	83
2.2.1.3. Presença de Outros Componentes.....	84
2.2.1.4. Concentração de Proteínas	85
3. MATERIAIS E MÉTODOS	85
3.1. MATERIAIS.....	85
3.2. DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE.....	85
3.3. ANÁLISES DAS PROTEÍNAS	86
3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	86
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
4.1. EFEITOS DO pH E DA CONCENTRAÇÃO SALINA NA SOLUBILIDADE DAS PROTEÍNAS DA CLARA	87
4.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA	92
5. CONCLUSÃO	94
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94
CONCLUSÃO GERAL.....	99
ANEXO A.....	100

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2 - ADSORÇÃO DAS PROTEÍNAS DA CLARA DO OVO EM LEITO EXPANDIDO

Figura 1. Processos de adsorção em leito fixo e leito expandido.....	18
Figura 2. Etapas de um sistema de leito expandido.	20
Figura 3. Grau de expansão do leito (H/H_0).....	22
Figura 4. Distribuição do tempo de residência.....	24
Figura 5. Expansão do leito (Streamline SP [®]) em função da vazão.	31
Figura 6. Coeficiente de dispersão axial em função da velocidade linear do fluido.....	32
Figura 7. Cromatograma representativo da adsorção das proteínas da clara <i>in natura</i> no leito expandido.	33
Figura 8. Cromatograma representativo da dessorção das proteínas da clara <i>in natura</i> no leito expandido.	33
Figura 9. Curva de ruptura das proteínas da clara em leito expandido.....	35

CAPÍTULO 3 - PARTIÇÃO DAS PROTEÍNAS DA CLARA DO OVO (LISOZIMA E CONALBUMINA) EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS

Figura 1. Representação planar parcial da molécula de PEG com os sítios disponíveis para as interações com os demais componentes do sistema.	47
Figura 2. Diagrama de fase para sistemas aquosos bifásicos, expresso em coordenadas triangulares.....	49
Figura 3. Diagrama de fase para sistemas aquosos bifásicos, expresso em coordenadas retangulares.	49
Figura 4. Registro de um experimento realizado no ITC 4200.....	60
Figura 5. Influência da TLL no $\ln K$ para a lisozima.....	63
Figura 6. Influência da TLL no $\ln K$ para a conalbumina.....	63
Figura 7. Influência da TLL no $\Delta_r G$ para a lisozima.....	67
Figura 8. Influência da TLL no $\Delta_r G$ para a conalbumina.....	67

Figura 9. Gráfico de entalpia integral de transferência em função da quantidade de substância transferida em relação ao número de mols para a lisozima em SAB PEG1500-citrato de sódio. 68

Figura 10. Gráfico de entalpia integral de transferência em função da quantidade de substância transferida em relação ao número de mols para a conalbumina em SAB PEG1500-citrato de sódio. 69

CAPÍTULO 4 - SOLUBILIDADE DAS PROTEÍNAS DA CLARA DO OVO: OVALBUMINA, CONALBUMINA E LISOZIMA

Figura 1. Solubilidade da ovalbumina em citrato de sódio em função do pH e da concentração salina. 88

Figura 2. Solubilidade da conalbumina em citrato de sódio em função do pH e da concentração salina. 89

Figura 3. Solubilidade da conalbumina em sulfato de sódio em função do pH e da concentração salina. 89

Figura 4. Solubilidade da lisozima em citrato de sódio em função do pH e da concentração salina. 91

Figura 5. Solubilidade da lisozima em sulfato de sódio em função do pH e da concentração salina. 91

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Propriedades das proteínas da clara	7
---	---

CAPÍTULO 2 - ADSORÇÃO DAS PROTEÍNAS DA CLARA DO OVO EM LEITO EXPANDIDO

Tabela 1. Gradiente de eluição das proteínas da clara.	28
Tabela 2. Gradiente de eluição das proteínas da clara.	28
Tabela 3. Índice de recuperação das frações obtidas após a eluição das proteínas da clara.	34

CAPÍTULO 3 - PARTIÇÃO DAS PROTEÍNAS DA CLARA DO OVO (LISOZIMA E CONALBUMINA) EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS

Tabela 1. Sistemas aquosos bifásicos e seus componentes.....	44
Tabela 2. Gradiente de eluição das proteínas das fases dos SAB.....	58
Tabela 3. Coeficientes de partição e recuperação teórica de lisozima (na fase polimérica) e da conalbumina (na fase salina) para os SAB PEG-sal a 25 °C, pH 7,0.....	62
Tabela 4. Coeficientes de partição e recuperações teóricas da lisozima e da conalbumina da fração 2 da ALE em SAB.....	65
Tabela 5. Parâmetros termodinâmicos para a lisozima em SAB formados por PEG 1500 e três diferentes sais a 25 °C.	71
Tabela 6. Parâmetros termodinâmicos para a conalbumina em SAB formados por PEG 1500 e três diferentes sais a 25 °C.....	72

CAPÍTULO 4 - SOLUBILIDADE DAS PROTEÍNAS DA CLARA DO OVO: OVALBUMINA, CONALBUMINA E LISOZIMA

Tabela 1. Solubilidade (g proteína/100g sobrenadante) da ovalbumina em função do pH e da concentração salina.....	88
Tabela 2. Solubilidade (g proteína/100g sobrenadante) da conalbumina em função do pH, do tipo de sal e da concentração salina.	90
Tabela 3. Solubilidade (g proteína/100g sobrenadante) da lisozima em função do pH, do tipo de sal e da concentração salina.	92

Tabela 4. Coeficientes do modelo de 4 ^a . ordem ajustado aos dados de solubilidade da ovalbumina em citrato de sódio em função do pH e da concentração salina.....	93
Tabela 5. Coeficientes do modelo de 4 ^a . ordem ajustado aos dados de solubilidade da conalbumina em função do pH, tipo de sal e da concentração salina.	93
Tabela 6. Coeficientes do modelo de 2 ^a . ordem ajustado aos dados de solubilidade da lisozima em função do pH e da concentração salina.....	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

SAB - Sistemas Aquosos Bifásicos;

pI - Ponto Isoelétrico;

PEG – Polietilenoglicol;

K - Coeficiente de Partição

$[P]_{sup}$ - Concentração de equilíbrio da proteína particionada nas fase superior;

$[P]_{inf}$ - Concentração de equilíbrio da proteína particionada nas fase inferior;

TLL - Comprimento da Linha de Amarração;

$[\Delta PEG]$ - Diferença de concentração de PEG nas fases superior e inferior expressa em % em massa;

$[\Delta Sal]$ - Diferença de concentração de sal nas fases superior e inferior expressa em % em massa;

Li_2SO_4 - Sulfato de Lítio;

K_2HPO_4 - Fosfato de Potássio Dibásico;

KH_2PO_4 - Fosfato de Potássio Monobásico;

Na_2SO_4 - Sulfato de Sódio;

$C_6H_5Na_3O_7$ - Citrato de Sódio;

Y_{sup} - Recuperação Teórica da Proteína na Fase Superior (%);

y_{inf} - Recuperação Teórica da Proteína na Fase Inferior (%);

V_S - Volume da fase superior;

V_I - Volume da fase inferior.

$\Delta_{tr}G$ - Energia Livre de Transferência

$\Delta_{tr}H$ - Entalpia de Transferência

$\Delta_{tr}S$ – Entropia de Transferência

S – Solubilidade da Proteína

IS – Índice de Solubilização

RESUMO

SOUSA, Rita de Cássia Superbi de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2008. **Separação da lisozima, conalbumina e ovalbumina presentes na clara do ovo: aspectos tecnológicos e termodinâmicos.** Orientadora: Jane Sélia dos Reis Coimbra. Co-orientadores: Luis Henrique Mendes da Silva e Luis Antônio Minim.

Neste trabalho, estudou-se a integração dos processos de cromatografia de adsorção em leito expandido (ALE) e extração líquido-líquido por sistemas aquosos bifásicos (SAB) para a separação e purificação das proteínas da clara do ovo (ovalbumina, conalbumina e lisozima). A ALE foi empregada para a separação de duas frações protéicas da clara, uma rica em ovalbumina e outra contendo lisozima e conalbumina. Os SAB foram empregados com o objetivo de avaliar o comportamento da partição da lisozima e da conalbumina entre as fases superior e inferior, visando a separação destas proteínas da fração da ALE. A extração líquida por SAB pode ser usada para purificação de biocompostos em larga escala por possibilitar a partição seletiva com elevados rendimentos. Nestes ensaios foi analisada a influência do tipo de sal e da concentração do polímero, sobre a partição das proteínas, a fim de se obter o melhor sistema para a separação das mesmas. Os sistemas aquosos bifásicos foram compostos por polietileno glicol (PEG) de massa molar 1500 g/mol e diferentes sais (fosfato de potássio, citrato de sódio, sulfato de lítio e sulfato de sódio). Em adição, foram calculados parâmetros termodinâmicos ($\Delta_{tr}H$, $\Delta_{tr}S$, $\Delta_{tr}G$) de transferência das proteínas. Observou-se que a lisozima migrou predominantemente para a fase superior, rica em PEG, e a conalbumina concentrou-se preferencialmente na fase inferior, rica em sal. Entre os sistemas avaliados, o SAB PEG1500 (18 % em massa)-sulfato de sódio apresentou a maior porcentagem de recuperação teórica da lisozima na fase superior (aproximadamente 95,0 %). A maior porcentagem de recuperação da conalbumina na fase inferior foi obtida no SAB PEG1500 (18 % em massa)-citrato de sódio (aproximadamente 86,0 %). Este estudo mostrou que a integração de ALE e SAB pode ser usada para separação das proteínas ovalbumina, lisozima e conalbumina da clara do ovo.

ABSTRACT

SOUSA, Rita de Cássia Superbi de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2008. **Separation of lysozyme, conalbumin and ovalbumin from the egg white: technological and thermodynamic aspects.** Adviser: Jane Sélia dos Reis Coimbra. Co-advisers: Luis Henrique Mendes da Silva and Luis Antônio Minim.

In this work, the separation of egg white proteins (lysozyme, conalbumina and ovalbumin) was studied integrating liquid-liquid extraction with aqueous two-phase systems (ATPS) and expanded bed adsorption (EBA). EBA was used to separate two egg white protein fractions, one rich in ovalbumin and other rich in conalbumina and lysozyme. The partition behavior of conalbumin and lysozyme between top and bottom phases of ATPS was investigated with the objective to separate these proteins from EBA fraction. This technique is an advisable purification process applied to large scale since it provides a selective partition with high yields. The influence of the type of salt (potassium phosphate, sodium citrate, lithium sulfate or sodium sulfate) and polymer (PEG 1500) phase concentrations (tie line length) in the system was studied in order to fit ratio of system to the separation. In addition, thermodynamic parameters ($\Delta_{tr}H$, $\Delta_{tr}S$, $\Delta_{tr}G$) were calculated and the results imply thermodynamic differences between partitioning of proteins. It was observed that the lysozyme partitioned preferentially to PEG phase and conalbumina to salt phase. Among the systems analyzed the ATPS PEG1500 (18 %)-sodium sulfate provided the best results for lysozyme extraction in the top phase (approximately 95,0 %) what demonstrates a good separation. The higher recovery of conalbumina in salt phase was obtained in the ATPS PEG1500 (18 %)-sodium citrate (approximately 86,0 %). This study showed that EBA and ATPS can be successfully used for recovery and initial purification of ovalbumin, lysozyme and conalbumin from egg white.

INTRODUÇÃO GERAL

As proteínas do ovo de galinha têm sido extensivamente usadas como ingredientes em alimentos processados, como produtos de padaria, merengues, biscoitos e derivados de carne devido às suas importantes propriedades funcionais, tais como geleificação, emulsificação e formação de espuma. A clara de ovos é uma fonte natural de proteínas com alto valor nutricional e biológico. Três proteínas de particular importância presentes na clara são a lisozima, a conalbumina e a ovoalbumina que apresentam altos valores nutricionais e funcionais, despertando amplo interesse no campo de ensino e pesquisa, bem como na esfera industrial.

O potencial para aplicações tecnológicas destas proteínas tem estimulado o desenvolvimento de processos integrados para sua separação e purificação visando manter suas características funcionais inalteradas, pois os processos convencionais, que usam precipitação por sais ou extração com solventes, podem levar à desnaturação e obtenção de proteínas com baixo grau de pureza. Assim, rotas alternativas de separação das proteínas da clara do ovo vêm sendo propostas.

Uma técnica com potencial de adequação à separação destas proteínas é a adsorção, na qual certos componentes de uma fase fluida são transferidos para a superfície de um adsorvente sólido, em um fenômeno de superfície. O poder de fracionamento dos métodos cromatográficos por adsorção (batelada, leito fixo e leito fluidizado) transforma-os em uma técnica atrativa para separação de biomoléculas alvo de contaminantes. O uso da adsorção em leito expandido pode representar uma forma de obtenção de proteínas com menor custo, maior produtividade e em menor tempo, em relação aos processos convencionais de separação e purificação de biomoléculas devido à uma redução no número de operações unitárias que compõem o processamento, como a clarificação. Este método vem sendo usada por indústrias de bioquímica fina e farmacêutica no escalonamento de processos de separação de biocompostos.

A partição de componentes biológicos em sistema aquoso bifásico (SAB) é também uma metodologia de separação simples e eficiente que vem sendo usada no isolamento de proteínas. Estes sistemas são compostos por duas fases ricas em água gerando assim um ambiente propício à separação de proteínas, enzimas e

células, quando comparados aos sistemas de extração contendo solventes orgânicos, pois ocorre sem que haja perda da atividade biológica das biomoléculas. Esta técnica permite isolar biomoléculas de misturas complexas e oferece vantagens, como curto tempo de processamento e fácil aumento de escala.

Portanto, visando obter derivados de ovos com elevados níveis funcionais e nutricionais e assim agregar valor ao ovo, foi avaliada neste trabalho a integração: *i*) da adsorção em leito expandido (ALE), usando uma resina trocadora de cátions, para separar a ovalbumina da fração contendo as proteínas conalbumina e lisozima, com *ii*) a extração com sistemas aquosos bifásicos para separar as proteínas conalbumina e lisozima. Foi também modificada uma técnica de quantificação das proteínas isoladas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) bem como foram determinados dados termodinâmicos de $\Delta_{tr}H$, $\Delta_{tr}S$ e $\Delta_{tr}G$, para as proteínas ovalbumina, lisozima e conalbumina.

OBJETIVO GERAL

- Analisar a viabilidade técnica da integração da adsorção em leito expandido, usando fase estacionária trocadora de cátions, com sistemas aquosos bifásicos para o desenvolvimento de um processo de separação e purificação das proteínas da clara do ovo (ovalbumina, lisozima e conalbumina).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer as condições ótimas na separação das frações protéicas (ovalbumina e lisozima/conalbumina) da clara empregando adsorção em leito expandido-troca catiônica.
- Desenvolver um método analítico para quantificação das proteínas por cromatografia de troca catiônica.
- Avaliar o emprego de sistemas aquosos bifásicos compostos por polietilenoglicol, sal e água como técnica de separação das proteínas: lisozima e conalbumina. Calcular o coeficiente de partição das proteínas.
- Estudar a influência do tipo de sal formador de sistema aquoso bifásico (citrato de sódio, fosfato de potássio, sulfato de lítio e sulfato de sódio) e da concentração de PEG, sobre a partição da lisozima e da conalbumina.
- Obter os parâmetros termodinâmicos associados à transferência das proteínas para cada uma das fases.
- Estudar a solubilidade das proteínas da clara em função da concentração de sal e do pH do meio.

CAPÍTULO 1

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Ovo de Galinha

O ovo de galinha (*Gallus domesticus*) é um produto natural com alto valor nutricional, sendo um alimento completo para o organismo humano. Adicionalmente, apresenta baixo custo, quando comparado a qualquer outro alimento de origem animal. Em 2001, o Brasil ocupou a sétima posição na produção mundial de ovos com 2,82 % do total comercializado (FAO, 2004).

Atualmente, o Brasil ainda ocupa o 7º lugar como produtor mundial de ovo de galinha. Tal produtividade apresenta grande potencial de crescimento e desenvolvimento. No primeiro trimestre de 2006, a produção nacional de ovos de galinha (510,885 milhões de dúzias) cresceu 5,47 % em relação ao mesmo período de 2005 (484,401 milhões de dúzias). Em termos de produção, o Sudeste do país concentrou 52,3 %, sobretudo, nos estados de São Paulo (33,6 %) e Minas Gerais (13,0 %). O Sul do país registrou 22,6 % da produção nacional de ovos de galinha, sendo o destaque para o Paraná com 9,4 % (IBGE, 2006).

Segundo IBGE, nos nove últimos meses de 2006, a produção nacional de ovos de galinha atingiu 1,569 bilhões de dúzias e cresceu 4,57 % em relação ao mesmo período de 2005, considerando-se apenas os estabelecimentos com 10.000 ou mais galinhas de postura. No período em análise, os principais estados produtores tiveram crescimento da produção de ovos, nos seguintes percentuais: São Paulo (2,44 %), Minas Gerais (2,38 %) e Paraná (9,0 %).

Em torno de 80 % do ovo “*in natura*” de uma granja segue diretamente para o mercado consumidor. O restante destina-se ao uso industrial, geralmente na forma de clara, gema ou ovo integral desidratado. O produto desidratado é normalmente utilizado como ingrediente alimentar no preparo de biscoito, bolo, doce, maionese e massa (SIM, 1994).

O ovo de galinha constitui uma fonte natural de ácidos graxos, minerais, proteínas, triacilgliceróis e vitaminas. Quanto ao valor nutricional em proteínas, somente o leite materno supera o do ovo que, por sua vez, é superior ao da carne

bovina, carne de ave, carne de porco, leite bovino e pescado (ALLEONI e ANTUNES, 2004).

Os percentuais de casca, clara e gema oscilam entre 8 %-12 %, 56 %-62 % e 28 %-32 % do ovo de galinha fresco, respectivamente. A casca constitui uma fonte natural de Ca, Cu, P e Mg. A gema apresenta baixo teor em carboidratos, sendo, entretanto, rica em triacilgliceróis e proteínas, como a fosvitina e a lipovitelina. Adicionalmente, constitui uma expressiva fonte de vitamina A, do complexo B, vitamina D, vitamina E, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oléico, ácido linoléico, ácido linolênico, Ca, Fe, Mg, Na, Se e Zn (ALLEONI e ANTUNES, 2004).

1.2. Clara do Ovo

A clara representa cerca de 59,0 % do ovo de galinha fresco. Como a gema, a clara do ovo apresenta baixo teor de carboidratos, sendo, entretanto, relativamente abundante em Mg e Na. Contém cerca de 88 % de água e teor de proteínas entre 9,8 % e 10,6 % (FENNEMA, 1993; SIM, 1994).

A clara do ovo é um ingrediente essencial que tem sido usado por muitos anos na indústria de alimentos devido às suas excelentes propriedades tecnológicas. Além disso, possui muitas proteínas biologicamente ativas que poderiam lhe oferecer uma melhor valorização: lisozima como antimicrobiana e antivirótica (LOSSO, et al., 2000; IBRAHIM, et al., 2003), ovotransferrina como um agente antimicrobiano, avidina como carreadora de vitamina e agente antimicrobiano (MINE, 1995), flavoproteína como um estabilizador de vitamina e ovomucina como uma fonte de glicopeptídeos com atividades antiviróticas, antitumor e efeitos imunomodulantes. Além disto, a clara pode ser utilizada como agente espumante (TSUGE, 1997; WATANABE, 1998).

1.2.1. Proteínas da Clara do Ovo

A clara do ovo pode ser considerada um sistema que consiste de numerosas proteínas globulares numa solução aquosa (MINE, 1995; VADEHRA e NATH, 1973). Com base no valor nutricional e funcional, podem-se destacar a

ovalbumina, ovotransferrina, lisozima e ovomucina. A ovalbumina é uma glicoproteína com propriedades de coagulação e geleificação (VACCHIER et al., 1995; AWADE et al., 1994). A ovotransferrina (conalbumina) é uma glicoproteína com atuação no transporte do ferro e de ampla atividade antimicrobiana. A lisozima tem propriedades antibactericidas e é usada amplamente na preservação de alimentos e na indústria farmacêutica (ALLEONI e ANTUNES, 2004; FENNEMA, 1993; SIM, 1994).

Portanto, o estudo de cada biocomponente acima mencionado e de seu processo extrativo apresenta extensa aplicabilidade comercial e industrial, em particular no preparo e processamento do alimento industrializado e suplemento alimentar, bem como para uso medicinal (FENNEMA, 1993; SIM, 1994).

Muitos procedimentos para purificação destas proteínas foram desenvolvidos para estudar e, em alguns casos para usar, a atividade biológica das proteínas da clara do ovo. As purificações foram principalmente conduzidas em cromatografia líquida devido à ausência de desnaturação da proteína e à alta seletividade (GUÉRIN-DUBIARD et al., 2005). Recentemente, a lisozima e a avidina são as principais proteínas da clara extraídas para aplicações comerciais. A lisozima é extraída em escala industrial por uma combinação das técnicas de cromatografia, adsorção, cristalização e precipitação (LI-CHAN et al., 1986; SHIBUSAWA et al., 1998) enquanto a avidina é purificada por cromatografia de afinidade (GUÉRIN-DUBIARD et al., 2005). Com o pI de 4,5, a ovalbumina foi principalmente purificada por cromatografia de troca aniônica (LEVISON et al., 1992, 1996). A ovotransferrina tem sido purificada por ambas as cromatografia de troca catiônica e cromatografia de troca aniônica (AWADÉ et al., 1994; VACHIER et al., 1995; CROGUENNEC et al., 2000). A flavoproteína foi isolada por diferentes métodos envolvendo severos estágios de separação tais como precipitação com sal, troca aniônica e filtração em gel (GUÉRIN-DUBIARD et al., 2005).

A Tabela 1 apresenta as proteínas presentes em maior quantidade na clara bem como algumas de suas características físicas (LINDEN e LORIENT, 1996).

Tabela 1. Propriedades das proteínas da clara.

Proteína	Extrato seco (%)	Ponto Isoelétrico	Massa Molar (kg/mol)	Temperatura de desnaturação (°C)
Ovoalbumina	54	4,5	44,500	84
Ovotransferrina	12	6,1	77,700	61
Ovomucóide	11	4,1	28,000	70
Ovomucina	3,5	4,5-5	5,5-8,3*10 ⁶	--
Lisozima	3,4	10,7	14,300	75

1.2.1.1. Ovalbumina

A ovalbumina representa 54 % das proteínas da clara. Foi obtida na forma cristalina pela primeira vez em 1889 por Hofmeister. É classificada como uma fosfoglicoproteína por possuir carboidratos e fosfatos ligados ao polipeptídeo. Pode ser encontrada nas formas A₁, A₂, A₃ na proporção 85:12:3, respectivamente. A diferença entre essas formas está na quantidade de fósforo ligado à proteína, 2, 1 ou 0 átomo de fósforo por mole de ovoalbumina, respectivamente. Esta proteína possui massa molar de 45 kg/mol, uma ponte dissulfeto e quatro grupos sulfidrilo livres que só reagem após a desnaturação da proteína, o que indica que na forma nativa os grupos sulfidrilo estão protegidos em regiões hidrofóbicas da proteína. Cerca de 50 % dos aminoácidos da ovoalbumina são hidrofóbicos. Possui uma glicina acetilada no terminal N e prolina no terminal carboxílico. Contém uma única cadeia lateral de carboidrato formada de D-manose (2 %) e N-acetilglicosamina (1,2 %) (SGARBIERI, 1996; STADELMAN e COTTERILL, 1995).

A ovalbumina possui uma menor superfície hidrofóbica e maior flexibilidade molecular na interface óleo-água do que a lisozima (ACTON et al., 1990). Ela pode ser desnaturada quando submetida ao calor, pela absorção superficial ou em filmes, através da agitação ou pela ação de vários agentes desnaturantes (VADEHRA e NATH, 1973). Em solução é facilmente desnaturada por exposição de sua superfície (por exemplo, na agitação), mas é relativamente estável ao tratamento térmico. O aquecimento da clara a 62 °C pH 9,0 por 3,5 min alterou entre somente 3 % e 5 % da proteína enquanto que em pH 7,0 praticamente não houve alteração (ALLEONI, 2003).

Durante a armazenagem, a ovalbumina sofre uma alteração passando para uma forma mais estável ao calor, a s-ovalbumina. Uma espécie intermediária foi também detectada, possuindo temperatura de desnaturação de 88,5 °C, comparada com 92,5 °C da s-ovalbumina e 84 °C da ovalbumina, pelo termograma do calorímetro diferencial de varredura (DSC) (DONOVAN e MAPES, 1976).

1.2.1.2. Conalbumina (Ovotransferrina)

Representa 12 % das proteínas da clara, tem massa molar 77,7 kDa e é formada de um único polipeptídeo. Contém ainda 0,8 % de hexose e 1,4 % de hexosamina; não possui grupo sulfidrilo livre ou radical prostético (VADEHRA e NATH, 1973). Possui habilidade para se ligar com íon metal formando um complexo proteína-metal resistente à desnaturação pelo calor, pressão, enzimas proteolíticas e agentes desnaturantes (AZARI e FEENEY, 1958).

Todas as transferrinas conhecidas ligam-se ao ferro dando uma coloração vermelha e uma absorção máxima a 465 nm. Os sítios de complexação de ferro pelas diferentes transferrinas parecem ser similares e os ligantes são em geral, cadeias laterais dos mesmos aminoácidos. A forte tendência de ligação do ferro à ovotransferrina confere a esta proteína, como às transferrinas em geral, propriedades bacteriostáticas. Quando não ligada ao ferro a ovotransferrina é mais sensível ao tratamento térmico do que a ovalbumina, porém menos susceptível à desnaturação de superfície (ALLEONI, 2003, ZABIK, 1992).

Conalbumina e ovalbumina podem ser gelatinizadas individualmente com tratamento alcali, já as outras proteínas da clara do ovo não possuem esta característica (CHANG, 1979). A gelatinização destas proteínas depende, primeiramente, da abertura de suas moléculas. SEIDMAN et al. (1963) e CUNNINGHAM e LINEWEAVER (1965) determinaram que a estabilidade da conalbumina ao calor foi mínima, próxima ao pH 6,0. Em pH 9,0 a estabilidade ao calor desta proteína foi marcadamente maior. Por outro lado, a estabilidade da ovalbumina foi maior em pH neutro (YANG e BALDWIN, 1995).

1.2.1.3. Lisozima

A lisozima é uma glicoproteína que representa 3,4 % das proteínas da clara do ovo. Possui um peso molecular relativamente baixo, que pode variar de 14,3 kDa a 14,8 kDa e o seu ponto isoelétrico é 10,7. Possui forma de esfera alongada e se apresenta como dímero entre pH 5 e 9 (STADELMAN e COTTERILL, 1995; OSUGA e FEENEY, 1977).

Esta enzima é homologa à lisozima humana e à α -lactoalbumina. É formada de um único polipeptídeo com 129 resíduos de aminoácidos e quatro pontes dissulfeto, não possuindo grupos sulfídricos livres (SGARBIERI, 1996). As cadeias laterais acídicas e básicas e os grupos terminais estão distribuídos na superfície da molécula. A localização da cadeia polar também parece estar na superfície, entretanto a maioria das cadeias não-polares (hidrofóbicas) está no interior da molécula. Um dos grupos hidrofóbicos está localizado na superfície, exatamente onde se encontra o sítio ativo da proteína (LI-CHAN e NAKAI, 1989).

A inativação térmica da lisozima como uma enzima depende da temperatura e do pH. Quando a lisozima é dissolvida em solução tampão de fosfato, não ocorre inativação a 63 °C por 10 minutos a pH 9,0. Porém, a 65 °C a atividade da lisozima em pH 9,0 é reduzida em 70 % durante o mesmo período. A lisozima é 50 vezes mais sensível ao calor na clara do ovo que em solução tampão fosfato (STADELMAN e COTTERILL, 1995).

O interesse por essa proteína iniciou-se devido a sua ação enzimática em algumas bactérias e em alguns vírus, uma propriedade que elevou o potencial de aplicação como agente microbiano em vários alimentos e também como um possível agente terapêutico (VADEHRA e NATH, 1973). Sua ação enzimática inclui a clivagem de polissacarídeos, ligação glicosídica β -1,4 entre N-acetilglicosamina e ácido murâmico, em parede celular de bactérias. Além da atividade glicosídica possui também atividade de transglicosidade e de esterase, exercendo uma ação antimicrobiana (SGARBIERI, 1996).

A lisozima possui características básicas e, devido a isto, tende a formar ligações eletrostáticas com outras moléculas. Algumas interações, particularmente, com a ovomucina têm importância prática considerável no efeito espumante e em outras propriedades funcionais (LI-CHAN e NAKAI, 1989).

Além disso, a lisozima é usada, por exemplo, como aditivo em leite para crianças, como componente em preparações oftálmicas e como droga em tratamentos de úlceras e infecções (GHOSH, 2000).

Devido ao grande potencial de uso desta enzima, há uma necessidade de se desenvolver uma técnica simples e efetiva para sua purificação. A lisozima disponível comercialmente é produzida da clara do ovo usando uma combinação de processos convencionais tais como: cromatografia, adsorção, cristalização e precipitação (SHIBUSAWA et al., 1998).

No entanto, os SAB aparecem como outro método potencial para a extração da lisozima da clara do ovo por ser um sistema adequado para purificação contínua em larga escala de biomoléculas e permitir o uso de equipamentos tradicionais de extração líquido-líquido (COIMBRA et al., 1994, 1998).

Outra técnica que tem sido discutida em termos de separação direta da lisozima é a adsorção em leite expandido (OWEN e CHASE, 1997). Esta técnica oferece vantagens como diminuição de custos e de tempo por reduzir o número de etapas de operação, aumentando a recuperação e a qualidade do produto (TONG et al., 2002).

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACTON, J. C.; KROPP, P. S. and RICK, R. L. Properties of ovalbumin, conalbumina and lysozyme at an oil-water interface and in an emulsion system. **Poultry Science**, v. 69 (4), p. 694-701, 1990.

ALLEONI, A. C. C. **Propriedades Funcionais do Albúmen e Qualidade de Ovos de Galinha Cobertos com Concentrado Protéico de Soro de Leite Bovino**. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, 2003.

ALLEONI, A. C. C. and ANTUNES, A. J. Internal quality of eggs coated with whey protein concentrate. **Scient. Agric.**, v. 61, p. 276–280, 2004.

AWADE, A. C.; MOREAU, S.; MOLLE, D.; BRULÉ, G. and MAUBOIS, J. L. Two-step chromatographic procedure for the purification of hen egg white ovomucin, ovotransferrin and ovalbumin and characterization of purified proteins. **Journal of Chromatography A**, v.677, p.279-288, 1994.

AZARI, P. R. and FEENEY, R. E.. Resistance of metal complexes of conalbumina and transferring to proteolysis and to thermal denaturation. **Journal of Biological Chemistry**. v. 232, p. 292-302, 1958.

CHANG, H. S. Studies on the alkaline gelation of ovalbumin and conalbumina. **J. Chin. Soc. Anim. Sci.** v.8, p. 35-50, 1979.

COIMBRA, J. S. R.; MOJOLA, F. and MEIRELLES, A. J. A. Dispersed phase hold-up in a perforated rotating disc contactor (PRDC) using aqueous two-phase systems. **J. Chem. Eng. Japan**, v. 31 (2), p. 277–280, 1998.

COIMBRA, J. S. R.; THOMMES, J. and KULA, M. R. Continuous separation of whey proteins with aqueous two-phase systems in a Graesser contactor. **Journal Chromatography A**, v. 668, p. 85–94, 1994.

CROGUENNEC, T.; NAU, F.; PEZENNEC, S. and BRULE, G. Simple rapid procedure for preparation of large quantities of ovalbumin. **J. Agric. Food Chem.** v. 46, p. 4883-4889, 2000.

CUNNINGHAM, F. E. and LINEWEAVER, H. Stabilization of egg-white proteins to pasteurization temperatures above 60 °C. **Food Technology**. v.19, p. 1142-1447, 1965.

DONOVAN, J. W. and MAPES, C. J. A differential scanning calorimetric study of conversion of ovalbumin to s-ovalbumin. **Journal of Science Food and Agricultural**. v. 27 (2), p. 197-204, 1976.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (2004). Disponível em: www.fao.org .

FENNEMA, O. R. **Química de Los Alimentos**. 2^{ed}. Zaragoza: Ed. Acribia S.A, 1993.

GHOSH, R. and CUI, Z. F. Protein purification by ultrafiltration with pretreated membrane. **J. Membrane Science**, v. 167, p. 47–53, 2000.

GUÉRIN-DUBIARD, C; PASCO, M.; HIETANEN, A.; QUIROS DEL BOSQUE, A.; NAU, F. and CROGUENNEC, T. Hen egg white fractionation by ion-exchange chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1090, p.58–67, 2005.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: www.ibge.gov.br.

IBRAHIM, H. R. **Proceedings of the Xth European Symposium on the Quality of Eggs and Egg Products**, Ploufragan, France, p. 350, 2003.

LEVISON, P. R.; BADGER, S. E.; TOOME, D. W.; KOSCIELNY, M. L.; LANE, L. and BUTTS, E. T. Economic considerations important in the scale-up of an ovalbumin separation from hen egg-white on the anion-exchange cellulose DE92. **Journal of Chromatography A**, v.590 (1), p. 49-58, 1992.

LEVISON, P. R.; JONES, R. M. H.; TOOME, D. W.; BADGER, S. E.; STREATER, M. and PATHIRANA, N. D. Influence of flow-rate on the chromatographic performance of agarose- and cellulose-based anion-exchange media. **Journal of Chromatography A**, v. 734 (1), p. 137-143, 1996.

LI-CHAN, E. and NAKAI, S. Biochemical basis for properties of egg white. **Critical Review Poultry Biology**. v. 2 (1), p. 21-57, 1989.

LI-CHAN, E., NAKAI, S., SIM, J., BRAGG, D.B. and LO, K.V. Lysozyme separation from egg-white by cation-exchange column chromatography, **Journal of Food Science**, v. 51, p. 1032 - 1036, 1986.

LINDEN, G.E., LORIENT, D. **Bioquímica Agroindustrial**. Editorial Acribia, S.A., Zaragoza (España), 1996.

LOSSO, J. N.; NAKAI, S. and CHARRER, E.A. In: A.S. NAIDU (Ed.), **Natural Food Antimicrobial Systems**, CRC Press, Inc., New York, p. 185, 2000.

MINE, Y. Recent advances in the understanding of egg white protein functionally. **Trends in Food Science and Technology**, v. 6, p. 225- 231, 1995.

OSUGA, D. T. and FEENEY, R. E. Eggs Proteins. In: WHITAKER, J. R.; TANNENBAUM, S. R. **Food Proteins**, 2 Ed. Westport: Avi Publishing, p. 209-266, 1977.

OWEN, R. O. and CHASE, H. A. Direct purification of lysozyme using continuous counter-current expanded bed adsorption. **Journal of Chromatography A**, v. 757, p. 41-49, 1997.

SEIDMAN, W. E.; COTTERILL, O. J. and FUNK, E. M. Factors affecting heat coagulation of egg white. **Poultry Science**, v. 42, p. 406-417, 1963.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em Alimentos Protéicos: Propriedades, Degradações, Modificações**, Livraria Varela, São Paulo, 1996.

SHIBUSAWA, Y.; KIHIRA, S. and ITO, Y. One-step purification of proteins from chicken egg-white using counter-current chromatography. **Journal Chromatography B**, v. 709, p. 301–315, 1998.

SIM, J. S. **Eggs Uses and Processing Technologies: New Developments**. University of British Columbia: Columbia, CA, Marcel Dekker, Inc.: New York, NY, 1994.

STADELMAN, W.J. and COTTERILL, O J. **Egg Science and Technology**. 4^{ed}. Wesport: AVI Publischer Company, 449p. 1995.

TONG, X-D, DONG, X-Y. and SUN, Y. Lyzosome adsorption and purification by expanded bed chromatography with a small-sized dense adsorbent. **Biochemical Engineering Journal**, v. 12, p. 117-124, 2002.

TSUGE, Y.; SHIMOYAMADA, M. and WATANABE, K. Bindings of ovomucin to newcastle disease virus and anti-ovomucin antibodies and its heat stability based on binding abilities. **J. Agric. Food Chem.**, v. 45 (12), p. 4629-4634, 1997.

VACHIER, M. C.; PIOT M. and AWADE, A. C. Isolation of hen egg white lysozyme, ovotransferrin and ovalbumin, using a quarternaty ammonium bound to a highly crosslinked agarose matrix. **Journal of Cromatography B**, v. 664, p. 201-210, 1995.

VADEHRA, D. V. and NATH, K. R. Eggs as a source of protein. **Critical Review Food Technology**, v. 4, p. 193-308, 1973.

WATANABE, K.; TSUGE, Y.; SHIMOYAMADA, M.; OGAMA, N. and EBINA, T. Antitumor effects of pronase-treated fragments, glycopeptides, from ovomucin in hen egg white in a double grafted tumor system. **J. Agric. Food Chem.**, v. 46 (8), p. 3033-3038, 1998.

YANG, S. C. and BALDWIN, R. E. Functional properties of eggs in foods. In: STADELMAN, W. J.; COTTERILL, O. J. (Ed). **Egg Science and Technology**. 4 Ed. Binghamton: Food Products Press: Haworth Press, chap. 16, p. 405-463, 1995.

ZABIK, M. Eggs and Products. BOWERS, J. (Ed). In: **Food Theory and Applications**. 2 ed., Macmilian Publishing Co. chap. 6, p. 359-424, 1992.

CAPÍTULO 2 - ADSORÇÃO DAS PROTEÍNAS DA CLARA DO OVO EM LEITO EXPANDIDO

RESUMO

A adsorção em leito expandido (ALE) é uma técnica cromatográfica que opera com o leito com uma maior porosidade, e vem sendo utilizada na eliminação dos processos de filtração e/ou centrifugação, reduzindo-se assim o número de operações unitárias dentro da indústria de bioprocessos, uma vez que estas podem comprometer em até 80 % o custo de processo de recuperação da biomolécula. No presente trabalho estudou-se as condições de separação de duas frações protéicas presentes na clara do ovo, uma rica em ovalbumina e outra contendo lisozima e conalbumina, utilizando-se a resina de troca catiônica Streamline SP. Os resultados mostraram que foi possível obter duas frações protéicas da clara do ovo. Na primeira fração foi possível recuperar em torno de 95,0 % de ovalbumina. A segunda fração apresentou um rendimento semelhante para a lisozima e para a conalbumina, sendo necessário um próximo processo de separação para estas duas proteínas.

1. INTRODUÇÃO

A clara é uma fonte natural de proteínas de interesse tecnológico de reconhecido valor nutricional e biológico. Três proteínas de particular importância presentes na clara são a lisozima, conalbumina (ovotransferrina) e ovoalbumina. A lisozima (3,5 % do total de proteínas da clara) tem propriedades antibactericidas e é usada amplamente na preservação de alimentos e na indústria farmacêutica. A conalbumina (13 % do total de proteínas da clara) é uma glicoproteína com atuação no transporte do ferro e de ampla atividade antimicrobiana. A ovoalbumina (54 % do total de proteínas da clara) é uma glicoproteína com propriedades de coagulação e gelificação (VACCHIER et al., 1995; AWADE et al., 1994).

O potencial para aplicações tecnológicas destas proteínas tem estimulado o aparecimento de novas metodologias, para sua separação e purificação. A adsorção foi aplicada, em escala de laboratório, para a purificação das proteínas

da clara do ovo por LEVISON et al. (1992), AWADE et al. (1994), VACCHIER et al. (1995) e CROGUENNEC et al. (2000).

Pesquisas recentes apresentam a cromatografia por adsorção em leito expandido (ALE) como uma operação viável e com grande potencial para purificar a proteína desejada de um meio *in natura*. O uso de ALE pode representar uma forma de obtenção de proteínas, em relação aos processos convencionais de separação e purificação de biocompostos, por um custo menor, com maior produtividade e, em um menor tempo. Este fato decorre de uma redução no número de etapas que compõem o processamento, como clarificação, concentração e pré-purificação (SMITH et al., 2002; LYDDIATT, 2002).

Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar as condições ótimas para a aplicação da cromatografia de adsorção em leito expandido na separação das proteínas da clara do ovo ovalbumina, lisozima e conalbumina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Uso da Troca Iônica na Separação de Proteínas

A troca iônica é empregada usualmente em etapas iniciais de purificação, separando grupos de compostos baseados em suas cargas elétricas, sendo em geral necessárias outras etapas de purificação subseqüentes. É usada na separação de proteínas, baseando-se na carga da proteína que se quer isolar. Se esta possuir carga positiva, a solução deve passar por uma coluna com carga negativa (impedindo a passagem das proteínas com carga positiva). O processo de purificação por troca-iônica tem como objetivo a adsorção à matriz da proteína-alvo ou dos contaminantes, com posterior eluição (PESSOA e KILIKIAN, 2005).

O princípio básico da cromatografia de troca-iônica baseia-se na competição entre íons de interesse e contaminantes pelos grupos carregados da fase estacionária. As moléculas de proteína têm em sua superfície grupamentos com cargas positivas e negativas. As cargas positivas são oriundas, sobretudo, dos aminoácidos histidina, lisina, arginina e das aminas terminais, e as cargas negativas são devidas ao ácido aspártico e glutâmico e aos grupamentos carboxílicos terminais (PESSOA e KILIKIAN, 2005).

O primeiro estágio da cromatografia de troca-iônica é estabelecer o equilíbrio do trocador iônico em termos de pH e força iônica, que permitirão a sua ligação com as moléculas de soluto desejadas. Os grupos trocadores ficam associados com contra-íons, usualmente simples cátions ou ânions como cloreto ou sódio. O segundo estágio é a aplicação da amostra e sua subsequente adsorção. Nesta etapa as moléculas de soluto, carregadas com cargas apropriadas, deslocam os contra-íons e se ligam reversivelmente com a matriz. Substâncias não ligadas podem ser lavadas do leito trocador usando a fase móvel tamponante. No terceiro estágio, as substâncias são removidas da coluna por mudanças das condições de eluição desfavoráveis à ligação iônica das moléculas de soluto. Isto normalmente envolve o aumento da força iônica do tampão de eluição ou troca de seu pH. A dessorção é alcançada pela introdução de um gradiente crescente de concentração salina e as moléculas de soluto são liberadas da coluna na ordem de suas forças de ligação. As moléculas fracamente ligadas são eluídas primeiro. O quarto e o quinto estágios são: a remoção das substâncias não eluídas da coluna e o restabelecimento do equilíbrio da coluna para as condições iniciais para próxima purificação (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, 1997).

2.2. Cromatografia de Troca-Iônica por Adsorção em Leito Expandido

A disposição convencional do adsorvente na forma de um leito empacotado, exige a alimentação de meios isentos de partículas em suspensão, portanto, previamente clarificados o que demanda tempos elevados de operação devido, em geral, à reduzida difusividade do meio através do leito. Como alternativa ao leito empacotado, o meio adsorvente pode encontrar-se suspenso que, com o uso de adsorventes que reduzam a limitação difusional do líquido através deste, diminuem o tempo de processo (PESSOA e KILIKIAN, 2005).

As etapas de clarificação e concentração (captura) nos processos de purificação de uma biomolécula representam um grande problema a ser solucionado. Na maioria das vezes, utilizam-se técnicas centrifugação ou filtração. Ainda assim, tais técnicas podem não resolver o problema de clarificação da amostra, trazendo uma série de transtornos como a obtenção de uma solução ainda particulada. Este material particulado pode-se acumular nos distribuidores de fluxo da coluna ou nos espaços vazios existentes entre as partículas no leito fixo,

ocasionando o entupimento do leito, proporcionado um aumento na queda de pressão do sistema, inviabilizando o processo (PESSOA e KILIKIAN, 2005).

No entanto, pesquisas recentes (LYDDIATT, 2002) apresentam a cromatografia por adsorção em leito expandido (ALE) como uma operação viável e com grande potencial que necessita somente de um único passo para purificar a proteína desejada de um meio *in natura*. Assim, não seria necessário o emprego de uma clarificação inicial do meio nem da concentração ou mesmo da pré-purificação no processo (JANSON e RYDEN, 1998; SUBRAMANIAN, 1998).

A principal vantagem da utilização da adsorção em leito expandido, sobre a adsorção em leito fixo, é que a coluna pode ser alimentada com solução contendo material particulado, como células ou resíduos celulares em suspensão. Dessa forma, tem-se redução de uma operação unitária preliminar para separação dos contaminantes particulados, tais como a filtração ou a centrifugação, reduzindo o número de etapas no processo e evitando a perda da atividade da biomolécula alvo devido à presença de proteases, ácidos nucleicos, etc. (SANTOS, 2000).

Em termos gerais, um leito expandido é um sistema cuja porosidade é maior que a do leito empacotado ou sedimentado. Leitos expandidos são, algumas vezes, considerados parte integrante do campo de trabalho da tecnologia de leitos fluidizados, razão por que alguns autores não diferem essas duas expressões (VEREDAS, 2000).

Embora utilizados inicialmente na década de 70 como ferramenta para a recuperação de proteínas, os leitos fluidizados não mostraram na época muito interesse principalmente pelas dificuldades técnicas existentes, como por exemplo, a limitação das propriedades físicas das matrizes adsorventes (DASARI et al., 1993). É notável, porém, o crescente interesse pesquisadores a partir da década de 90 como CHASE (1994), CHASE e DRAEGER (1992), CHANG et al. (1993), DASARI et al. (1993), DE LUCA et al. (1994), McCREATH et al. (1995), FREJ et al. (1994), BATT et al. (1995), CHANG e CHASE (1996), FEUSER et al. (1999), LEVISON et al. (2000), SANTOS et al. (2000), TONG et al. (2002, 2003) e CHENG et al. (2003) para recuperar e purificar proteínas de soluções contendo ou não material particulado.

A adsorção em leito expandido baseia-se na fluidização. Dessa forma, partindo-se de um leito fixo e aumentando-se a vazão de fluido atinge-se uma

velocidade na qual a força de arraste iguala-se ao peso das partículas, ou seja, a força de arraste iguala-se a queda de pressão em uma determinada área transversal. Então, um leito fluidizado estável é formado quando as partículas adsorventes são suspensas devido ao equilíbrio entre a velocidade de sedimentação e a velocidade do fluido ascendente (DOS SANTOS, 2001).

A Figura 1 ilustra o princípio de funcionamento de um processo de adsorção em leito fixo e expandido. Pode-se observar que operando em leito fixo o material particulado bloqueia a coluna. Entretanto, ao ser operado de forma expandida o material particulado passa pelo leito sem haver a obstrução da coluna.

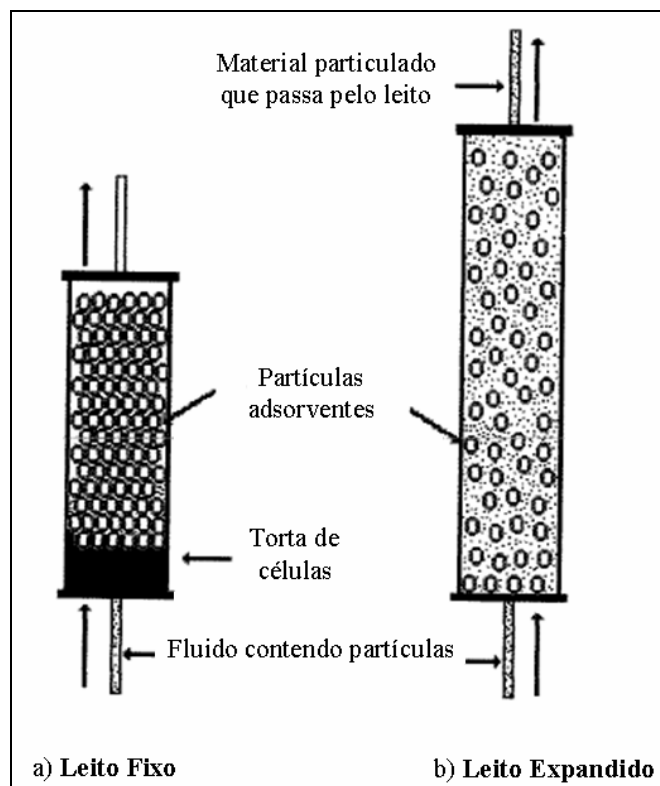


Figura 1. Processos de adsorção em leito fixo e leito expandido.

2.2.1. Princípio e Operação da ALE

O equipamento utilizado na adsorção em leito expandido consiste basicamente de uma coluna com um distribuidor e um pistão, que permite a mudança de posicionamento durante o processo, além dos acessórios comuns aos processos cromatográficos como bombas, registradores, etc. (DOS SANTOS, 2001).

O modo de operação da adsorção em leito expandido difere um pouco dos processos cromatográficos convencionais (leito fixo) uma vez que se opera com uma maior porosidade, da ordem de 0,7 a 0,8 para velocidade linear (na ordem de 300,0 a 400,0 cm/h), quando comparado com os processos em leito fixo cujos valores típicos de porosidade do leito são aproximadamente 0,4. É baseado nesse fato que se utiliza o leito expandido como alternativa para os processos biotecnológicos que contêm material particulado, uma vez que as células rompidas ou não, podem passar pelo leito sem obstruir a coluna (DOS SANTOS, 2001).

Na adsorção em leito expandido o equilíbrio entre o sistema tamponante e o adsorvente é realizado com o fluxo ascendente e com o leito na forma expandida. Ou seja, nessa etapa o pistão é posicionado na parte superior da coluna permitindo assim a expansão de leito. Após a etapa de equilíbrio, segue-se a etapa de aplicação do material. Essa etapa também é realizada com fluxo ascendente e com o leito na forma expandida, ou seja, com uma maior porosidade do leito. Aplicada a amostra, realiza-se a lavagem, também com fluxo ascendente, para se retirar do leito o material fracamente ligado ao adsorvente, tais como células residuais, outros tipos de materiais particulados e moléculas não adsorvidas (DOS SANTOS, 2001).

Em seguida, o fluxo de solução tamponante para o leito é interrompido, espera-se a sedimentação do adsorvente e o pistão é abaixado até a superfície do adsorvente. Nessa etapa, o sentido do fluxo é invertido e a eluição é realizada com o sentido do fluxo descendente com o leito fixo. Pode-se utilizar a eluição da proteína alvo com o leito expandido, porém o volume de eluição é maior, diluindo-se a proteína alvo na solução, o que não é interessante. Após a eluição, a regeneração do adsorvente é realizada *in situ*. Como na eluição, pode ser realizado tanto na forma expandida como em leito fixo, sendo que o procedimento de limpeza no modo fixo é mais comum (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, 1997).

A Figura 2 apresenta um esquema da seqüência de operações do processo de cromatografia em leito expandido, quais sejam: leito sedimentado, expansão do leito, aplicação do meio ao leito expandido, eluição com o leito empacotado e regeneração.

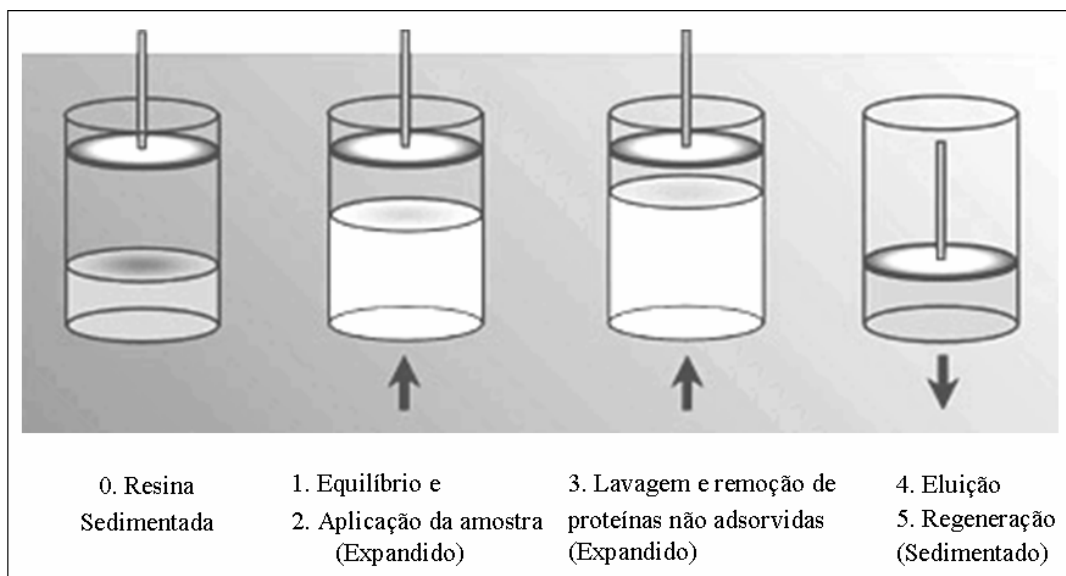


Figura 2. Etapas de um sistema de leito expandido.

2.2.2. Hidrodinâmica do Leito Expandido

O conhecimento do comportamento do leito em função das propriedades físicas das partículas e do fluido é de fundamental importância para as operações usando ALE. Essa caracterização baseia-se em especial na medida da expansão do leito em função da velocidade linear do fluido e, ainda, em função dos fatores distribuição de tamanho de partículas, viscosidade do fluido e presença de células. Tal caracterização é importante uma vez que a expansão do leito e os fatores a ela associados interferem na ligação proteína-adsorvente (PESSOA e KILIKIAN, 2005).

CHASE e DRAEGER (1992) mencionam que o sucesso da purificação de proteínas, usando a adsorção em leito expandido, depende crucialmente da habilidade do sistema em produzir um leito com expansão estável. Essa condição é fundamental para que se possa realizar um aumento de escala, partindo-se de resultados obtidos em escala de laboratório.

Na adsorção em leito expandido, correlaciona-se a expansão do leito devida à vazão usando a equação de RICHARDSON e ZAKI (1954). Para partículas rígidas estes autores propuseram que a relação entre a velocidade superficial do líquido (U) e a velocidade de equilíbrio (U_i) fosse dada por:

$$\frac{U}{U_t} = \varepsilon^n \quad (1)$$

onde ε é a porosidade do leito e n é o índice de expansão ou coeficiente de Richardson e Zaki.

A porosidade do leito expandido é determinada por uma relação do grau de expansão do leito. O grau de expansão do leito fornece a relação entre a altura final do leito após a expansão (H) e a altura do leito sedimentado (H_0).

$$\varepsilon = 1 - (1 - \varepsilon_0) \frac{H_0}{H} \quad (2)$$

sendo ε_0 a porosidade do leito fixo e H_0 é a altura do leito sedimentado. No leito empacotado, ε_0 é aproximadamente 0,4 (DOS SANTOS et al. 2002).

O valor de n é função de número de Reynolds terminal (Re_t) e da relação entre o diâmetro da partícula (d) e da coluna (D).

$$n = 4,65 + 20(d/D) \quad (Re_t < 0,2) \quad (3)$$

$$n = 4,40 + 18(d/D) Re_t^{-0,03} \quad (0,2 < Re_t < 1,0) \quad (4)$$

$$n = 4,40 + 18(d/D) Re_t^{-0,1} \quad (1,0 < Re_t < 200) \quad (5)$$

$$n = 4,40 Re_t^{-0,1} \quad (200 < Re_t < 500) \quad (6)$$

$$n = 2,40 \quad (Re_t > 500) \quad (7)$$

onde Re_t é dado pela expressão:

$$Re_t = \frac{v_t \rho d}{\mu_1} \quad (8)$$

em que d é o diâmetro da partícula, ρ a densidade do líquido, μ_1 a viscosidade do líquido e U_t a velocidade terminal ou de Stokes apresentada na equação (9):

$$v_t = \frac{d^2 g}{18 \mu_1} (\rho_s - \rho) \quad (9)$$

sendo ρ_s a densidade do sólido.

Através da linearização da equação (1) pode-se determinar a velocidade de equilíbrio de uma partícula e o coeficiente de Richardson e Zaki experimentais se a porosidade do leito for conhecida. A equação (10) apresenta a equação linearizada de Richardson e Zaki.

$$\ln U = \ln U_t + n \ln \varepsilon \quad (10)$$

sendo o coeficiente angular igual a n e o coeficiente linear igual a $\log U_T$.

Considerando ainda a formação de um leito estável, existem três modos de se avaliar a estabilidade do leito:

2.2.2.1. Observação Visual

A observação visual da estabilidade do leito é utilizada mais com o caráter confirmativo, por ser rápida e não dispendiosa, porém não se garante a reprodutibilidade dos resultados (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, 1997).

2.2.2.2. Grau de Expansão do Leito

O grau de expansão do leito (GE) é um número adimensional que consiste da medida relativa da altura do leito expandido (H), para uma determinada vazão, com a altura do leito fixo (H_0) do adsorvente (Figura 3) (DOS SANTOS, 2001).

$$GE = \frac{H}{H_0} \quad (11)$$

Valores de GE para sistemas operando em leito expandido giram em torno de 2 a 3. Nessa condição, a porosidade do leito é suficiente à passagem de células e seus fragmentos (DOS SANTOS, 2001).

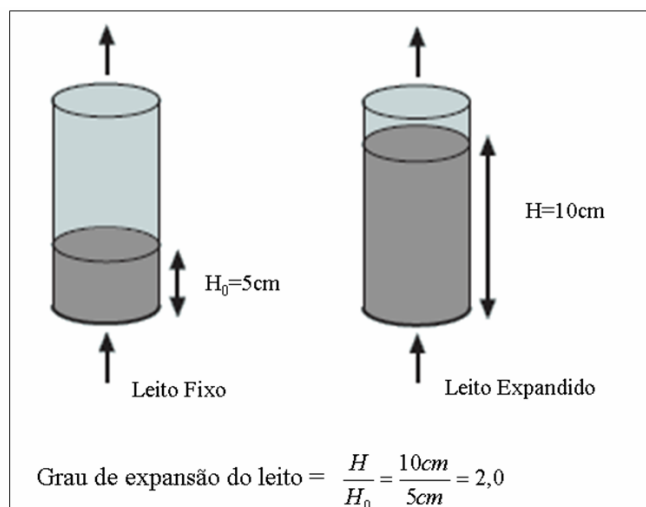


Figura 3. Grau de expansão do leito (H/H_0).

Muito embora o GE seja importante para avaliar a expansão do leito, este não indica diretamente o quão próximo está o leito expandido do empacotado. Entretanto, essa indicação pode ser obtida mediante análise da distribuição do tempo de residência (DTR), sobretudo a partir do valor do coeficiente de dispersão axial da fase fluida (D_{axi}) (PESSOA e KILIKIAN, 2005).

2.2.2.3. Distribuição do Tempo de Residência (DTR)

A distribuição do tempo de residência (DTR) é obtida utilizando-se uma técnica de estímulo e resposta por meio de um traçador. Este parâmetro caracteriza o tipo de escoamento existente dentro da coluna. O conhecimento do tipo de escoamento existente, ou seja, se o mesmo é empistonado, de mistura perfeita, ou se intermediário entre esses dois, é de fundamental importância, pois as diferentes características destes influenciam a cinética de adsorção proteína-adsorvente. Outro fator importante é que, a partir dos parâmetros obtidos da DTR pode-se avaliar a possibilidade, ou não, de se introduzir a amostra ao leito (DOS SANTOS, 2001).

Dentre as técnicas de estímulo e resposta existentes, as conhecidas como pulso e frontal são as mais aplicadas no estudo da expansão do leito. Usando-se a técnica frontal com sinal negativo e comparando-se as variâncias dos modelos de dispersão axial (D_{axi}) com os de tanques em série (FREJ et al., 1997), número de pratos teóricos (N) e altura de pratos podem ser obtidos. Dessa forma, a relação entre o número de pratos teóricos e o coeficiente de dispersão axial é dada por:

$$N = \frac{UH}{2\varepsilon D_{axi}} \quad (12)$$

sendo U a velocidade linear do fluido, D_{axi} , o coeficiente de dispersão axial da fase fluida, N o número de pratos teóricos, H a altura do leito expandido e ε a porosidade do leito.

Nesse procedimento de determinação da DTR a solução contendo o traçador, como uma solução de acetona (1,0 % v/v), é bombeada para o leito até que a leitura no detector seja máxima (100 %) (essa etapa refere-se ao sinal positivo). Uma vez que o traçador esteja produzindo resposta máxima, marca-se um tempo de referência (tempo zero) e espera-se que a resposta chegue à linha de base (essa etapa refere-se ao sinal negativo). Define-se então o tempo de

residência médio (t) como a distância do tempo zero até a leitura (absorbância) de 50 %. O desvio-padrão (σ) é definido como a metade da distância entre os pontos de leitura 15,85 % e 84,15 % da absorbância máxima. O número de pratos teóricos (N) é determinado pela técnica de sinal negativo pela equação abaixo:

$$N = \frac{t^2}{\sigma^2} \quad (13)$$

onde t é o tempo de residência e σ é o desvio padrão.

Os parâmetros mencionados são ilustrados na Figura 4, que apresenta o perfil de resposta da utilização da técnica frontal na determinação do DTR.

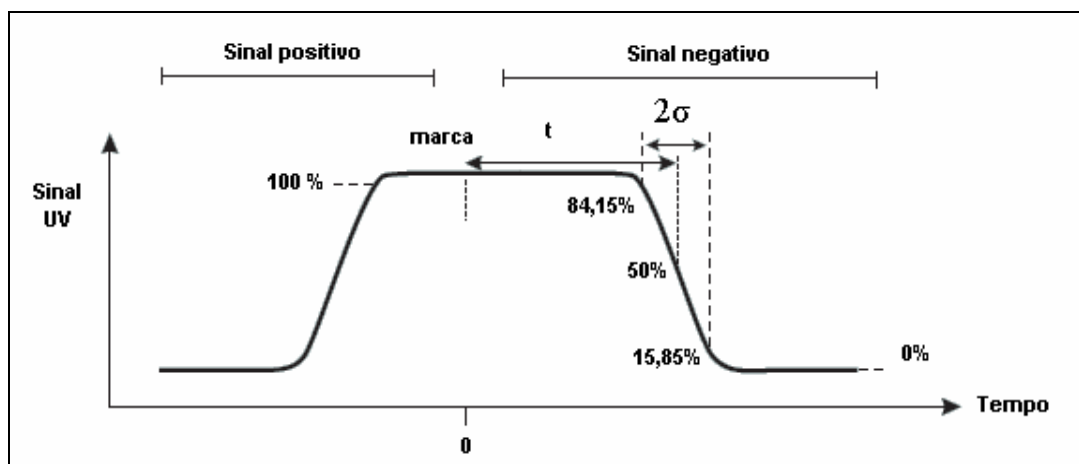


Figura 4. Distribuição do tempo de residência.

Os dados de literatura mostram que valores do coeficiente de dispersão da fase líquida para a adsorção em leito expandido variam entre 10 e $10^{-3} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, porém a maior parte apresenta valores de D_{axi} da ordem de $0,1 \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (DOS SANTOS, 2001).

2.2.2.4. Determinação do Coeficiente de Dispersão Axial

A importância do estudo da dispersão em fase fluida na ALE deve-se ao fato da DTR influenciar no processo de adsorção. A medida da mistura axial da fase líquida é realizada através da análise da DTR. Devido à mobilidade das partículas, os leitos fluidizados possuem uma tendência de comportarem-se como sistemas misturados. É possível também torná-los similares aos leitos empacotados (fixos), controlando a dispersão axial da fase líquida, sendo este um

dos principais fatores almejados (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, 1997).

2.2.3. Adsorventes

O emprego da fluidização do leito com os adsorventes convencionais utilizados na adsorção em leito fixo provocam elevada mistura entre o líquido e o adsorvente gerando uma dispersão axial elevada, diferindo do comportamento desejável de escoamento tubular apresentado pelo leito fixo e aproximando-se indesejavelmente ao comportamento de tanque agitado. Neste caso, a existência de apenas um estágio de equilíbrio compromete a eficiência do processo de separação por adsorção. Algumas alternativas foram criadas para limitar o grau de mistura existente do leito fluidizado. BUIJS e WESSELINGH (1980) desenvolveram uma coluna com bandejas, providas de distribuidores de fluxos, que serviam como suporte para o adsorvente sólido, entretanto, a redução do grau de mistura não foi suficiente para a melhoria da eficiência da coluna e do processo, se comparada com o leito fixo.

CHETTY e BURNS (1991) desenvolveram uma coluna de leito fluidizado estabilizado magneticamente usando adsorventes de afinidade não magnetizados, misturados com partículas de material magnetizado inerte em relação a adsorção; com esse procedimento obtiveram baixa mistura no leito. Porém, devido à complexidade do equipamento, não houve um favorecimento no que diz respeito ao aumento de escala para uso industrial.

No início dos anos 90, CHASE e DRAEGER (1992) desenvolveram uma coluna cromatográfica provida de um distribuidor de fluxo que permitia uma fluidização estável do leito com escoamento tubular mesmo utilizando adsorventes a base de agarose convencionalmente utilizados em adsorção em leito fixo. Essa fluidização estável só era conseguida quando baixas velocidades de fluxos eram utilizadas, provocando baixa produtividade no processo de purificação de biomoléculas a partir de meios complexos. Estes pesquisadores perceberam a necessidade de serem desenvolvidos adsorventes com alta velocidade de sedimentação. Surgiu então a necessidade de desenvolver adsorventes capazes de exibir características físicas e adsorptivas desejáveis para

que a técnica de fluidização sólido-líquido pudesse ser usada na separação de biomoléculas apresentando as mesmas características encontradas em leito fixo.

A escolha do adsorvente é um parâmetro muito importante quando se usa um leito expandido. Dessa forma, a capacidade física e química dos adsorventes deve ser considerada, uma vez que, a própria expansão do leito pode provocar a atrição das partículas adsorventes comprometendo assim o processo. A principal característica que um adsorvente deve apresentar para ser usado em leito expandido é uma maior massa específica que o meio de fluidização e uma distribuição de tamanho que favoreça a segregação do leito (SANTOS, 2000).

No ano de 1993, a Pharmacia Biotech introduziu no mercado novos tipos de adsorventes e colunas denominados de STREAMLINE, designados especialmente para a tecnologia de leito expandido. Estas resinas cromatográficas STREAMLINE, ao contrário das convencionais, permitem a adsorção de amostras contendo materiais particulados e/ou células como proteínas, enzimas, etc. (CHENG et al., 2003; TONG et al., 2003; DOS SANTOS et al., 2002; SMITH et al., 2002).

Os ligantes clássicos (SP-sulfapropil, DEAE – dietil aminoetil e IDA – ácido iminodiacético, para adsorção em troca iônica; IgG para adsorção por afinidade; Streamline Phenyl para a adsorção por hidrofobicidade) são acoplados ao suporte das partículas adsorventes (agarose-quartzo ou agarose-metal) elevando sua densidade e viabilizando a expansão do leito. Altas velocidades de fluxos podem ser usadas, durante a aplicação da amostra, devido às partículas de adsorventes possuírem altas velocidades de sedimentação conseguida através da inclusão de um núcleo de cristal de quartzo na matriz de agarose (TONG et al., 2002).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Os padrões de ovalbumina, lisozima e conalbumina foram adquiridas da Sigma Aldrich (St. Louis, USA). A resina empregada nos experimentos foi a resina de troca catiônica Streamline SP[®] (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden), com densidade e tamanho de partícula de 1,2 g mL⁻¹ e 100 a 300 µm,

respectivamente. Nos experimentos foram empregados água ultrapura (sistema Milli-Q, Millipore Inc., USA) e reagentes químicos de grau analítico ou cromatográfico.

Os ovos frescos foram adquiridos no mercado local da cidade de Viçosa - MG (Brasil). A clara *in natura*, separada manualmente da gema de ovo, foi pré-acondicionada em uma diluição de 1:1 (v/v) de clara e água deionizada. A mistura resultante foi agitada a 4 °C durante 1 hora. Esta solução foi posteriormente empregada nos experimentos.

3.2. Separação das Frações Protéicas da Clara usando Adsorção em Leito Expandido

Nesta etapa foi utilizada uma resina trocadora de cátions Streamline SP (Pharmacia Biotech) como fase estacionária. O sistema cromatográfico empregado foi o AKTA *Purifier 10/100* (Pharmacia Biotech).

Uma coluna XK 16/20 (Pharmacia Biotech) (altura: 20 cm, diâmetro interno: 1,6 cm) foi empacotada com a resina de trabalho e primeiramente expandida com água deionizada. Logo após, foi equilibrada com 5 volumes de coluna (VC) de tampão A (0,04 mol L⁻¹ de tampão citrato, pH 3,8), para condução do método de adsorção.

A amostra de clara pré-acondicionada foi diluída 1: 2 (v/v) em tampão A e, então, aplicada dentro da coluna em 3 VC, para a obtenção das curvas de ruptura, sendo a absorbância detectada na região de UV (215 nm). Foram testadas três vazões de trabalho (2, 3 e 4 mL min⁻¹).

Após a obtenção da curva de ruptura, o leito foi lavado com o tampão A (4 VC) para retirada das proteínas que não foram adsorvidas. Posteriormente, o escoamento do meio tamponante foi interrompido a fim de se obter uma sedimentação do leito. O fluxo pela coluna foi invertido e a etapa da eluição das proteínas foi efetuada utilizando-se um tampão B (0,5 mol L⁻¹ de NaCl em 0,04 mol L⁻¹ de tampão citrato, pH 3,8) em gradiente linear crescente, como apresentado na Tabela 1. Os experimentos foram realizados com duas repetições.

Tabela 1. Gradiente de eluição das proteínas da clara.

Estágio	% do Tampão A	% de Tampão B
01	100	0
02	30	70
03	0	100

Todas as soluções usadas para análise cromatográfica foram filtradas à vácuo utilizando filtros de acetato de celulose (0,45 μm) e posteriormente deixadas em ultra-som (Branson 1510, USA) por 15 min para desgaseificação.

3.3. Quantificação das Proteínas nas Frações Protéicas

O conteúdo protéico da clara diluída e das frações obtidas por ALE foi quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (ÄKTA Purifier 10/100, Pharmacia Biotech) usando uma coluna Mono S® HR 5/5 (Pharmacia Biotech) de troca catiônica. Foi utilizado um gradiente de fase móvel composto pelo tampão acetato 0,05 mol L⁻¹, pH 5,6 (tampão A) e tampão acetato 0,05 mol L⁻¹, pH 5,6 + 0,5 mol L⁻¹ de NaCl (tampão B). A vazão e volume de injeção de amostra foram de 1,0 mL min⁻¹ e 50 μL , respectivamente. A eluição das proteínas foi feita em gradiente e programada segundo a Tabela 2. O comprimento de onda utilizado na detecção das proteínas foi de 215 nm.

Tabela 2. Gradiente de eluição das proteínas da clara.

Tempo (min.)	% Tampão	
	A	B
0	100	0
1	100	0
3	65	35
7	65	35
9	25	75
14	25	75
15	0	100
18	0	100

3.4. Atividade Enzimática

A atividade enzimática da lisozima foi determinada empregando a *M. Lysodeikticus* (Sigma, USA) em uma concentração de 0,25 mg mL⁻¹ em tampão fosfato (0,06 mol.L⁻¹, pH 6,2) como substrato (TONG et al., 2002). Esta técnica baseia-se no decrescimento da absorvância do substrato lida a 450 nm (Cary 50, Varian, Austrália) pela adição de uma solução protéica contendo lisozima após 2 minutos de reação.

3.5. Grau de Expansão do Leito

O grau de expansão do leito (*GE*) é um número adimensional que consiste da medida relativa da altura do leito expandido (*H*), para uma determinada vazão, com a altura do leito fixo (*H_o*) do adsorvente, de acordo com a equação (11):

$$GE = \frac{H}{H_0} \text{ (DOS SANTOS, 2001).}$$

3.6. Distribuição do Tempo de Residência (DTR)

Os experimentos de DTR foram realizados objetivando determinar o coeficiente de dispersão axial do líquido para diferentes fluxos utilizados neste trabalho. Acetona a 1 % (v/v) em tampão fosfato (0,05 mol L⁻¹, pH 7,0) a 25 °C foi usada como traçador na técnica frontal com sinal negativo para se obter o número de pratos teóricos (*N*). O DTR foi determinado pela metodologia proposta por DOS SANTOS et al. (2002), os quais relacionam o número de pratos teóricos da coluna com o da distribuição de tempo de residência.

O tampão fosfato (0,05 mol L⁻¹, pH 7,0) foi bombeado pelo leito até a obtenção de uma resposta estável. O pistão móvel da coluna foi movido até a superfície do leito e o escoamento foi mantido até a estabilização da leitura no detector. Em seguida, a solução contendo o tampão fosfato e 1 % (v/v) de acetona foi introduzida na coluna sendo o escoamento mantido até obtenção da leitura máxima de absorvância (100 %). Essa etapa refere-se ao sinal positivo.

Nesse instante, troca-se a fase móvel por uma isenta de acetona e esse tempo é estabelecido como tempo zero. O escoamento é mantido até que se

verifique o registro da absorvância como zero. Define-se então o tempo de residência médio como o tempo gasto para que a absorvância seja igual a 50 % de seu valor máximo. O desvio padrão é dado como a metade do intervalo de tempo entre os valores respectivo a 15,85 % e 84,15 % da absorvância máxima. O número de pratos teóricos (N) é determinado por meio da técnica de sinal negativo segundo a equação (13).

3.7. Determinação do Coeficiente de Dispersão Axial (D_{axi})

O coeficiente de dispersão axial (D_{axi}) foi calculado empregando a equação abaixo que relaciona o número de pratos teóricos da coluna (N), a altura do leito expandido (H), a velocidade do fluido e a porosidade do leito expandido (ε) e a velocidade linear do fluido (U).

$$D_{axi} = \frac{U \cdot H}{2 \cdot \varepsilon \cdot N} \quad (14)$$

onde ε é determinado pela equação (2).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Expansão do Leito e Determinação do Coeficiente de Dispersão Axial

Em todos os experimentos realizados, o leito estudado apresentou, visualmente, uma boa estabilidade, sem que nenhum movimento característico de turbilhões fosse observado.

Na Figura 5, verifica-se que o grau de expansão do leito (H/H_o) varia linearmente com o aumento da vazão do tampão A. O mesmo comportamento foi observado por DOS SANTOS (2001) ao estudar os parâmetros hidrodinâmicos em diferentes resinas cromatográficas empregadas em leito expandido.

A vazão de 3 mL min^{-1} foi utilizada na etapa de adsorção das proteínas, pois neste caso, não foi observado o rompimento do leito, fenômeno que ocorre em valores de vazões superiores.

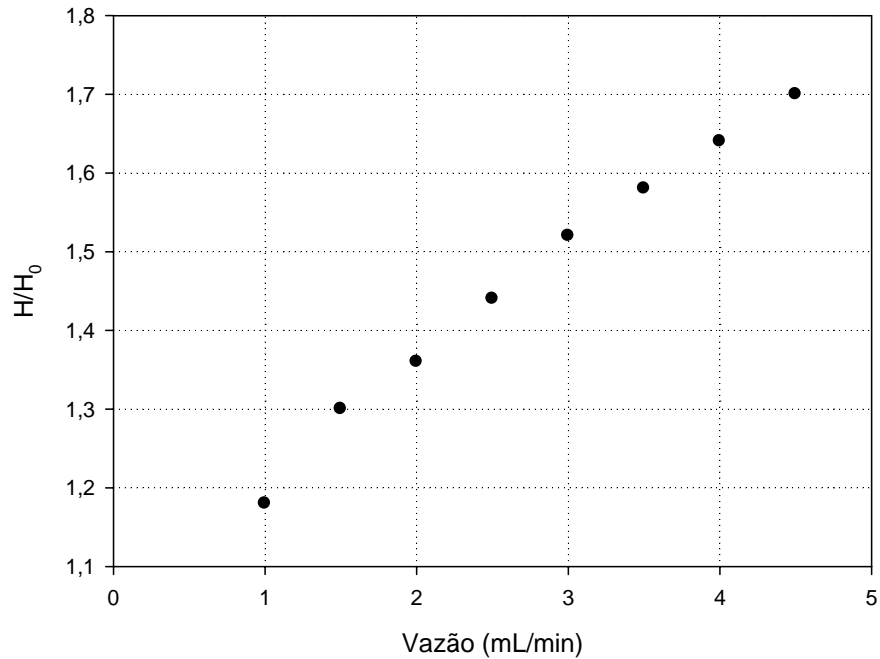


Figura 5. Expansão do leito (Streamline SP[®]) em função da vazão.

Na Figura 6 observa-se que houve uma variação linear nos valores do coeficiente de dispersão axial com a mudança de velocidade da fase móvel empregada, com R^2 de 0,99. Os valores de D_{axi} estão dentro da literatura para leito expandido. BATT et al. (1995) encontraram valores de D_{axi} iguais a $1,86 \times 10^{-6} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, para uma série de experimentos realizados para resinas Streamline, usando velocidades de 135 cm h^{-1} e altura de leito sedimentado de 8,6 cm. THOMMES et al. (1996) encontrou valores de D_{axi} na faixa de $6,0 \times 10^{-6}$ a $9,0 \times 10^{-6} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ em coluna com altura de leito 6,0 cm e velocidades lineares variando de 375 a 200 cm h^{-1} . TONG et al. (2003) pesquisaram o comportamento de dispersão axial da fase líquida em leito expandido com resina Streamline DEAE como função da vazão, encontrando valores de D_{axi} entre $2,2 \times 10^{-6}$ e $1,1 \times 10^{-5} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ para velocidades do líquido de 60 a 470 cm h^{-1} .

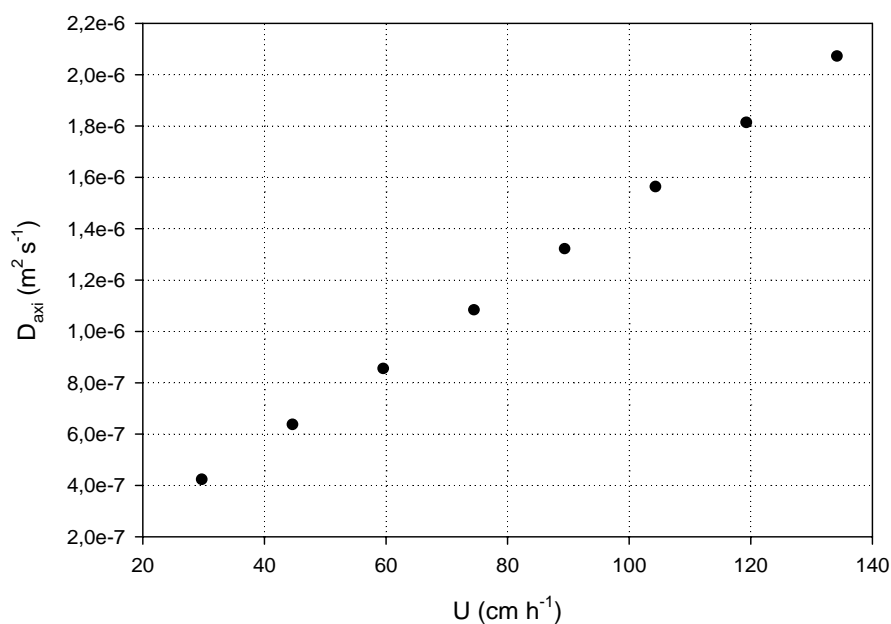


Figura 6. Coeficiente de dispersão axial em função da velocidade linear do fluido.

4.2. Adsorção e Dessorção das Proteínas da Clara *in natura* no Leito Expandido

Nas Figuras 7 e 8 são apresentadas as curvas de eluição associadas aos processos de adsorção e dessorção das proteínas da clara *in natura*, respectivamente. Na adsorção a vazão utilizada foi 3 mL.min⁻¹ e, na dessorção, foi empregada uma vazão de 2 mL min⁻¹.

No processo de dessorção foram obtidas duas frações de proteínas da clara. A ovalbumina é encontrada em maior porcentagem na primeira fração e lisozima e a conalbumina se concentram na segunda fração. Embora o gradiente de dessorção utilizado não tenha sido eficaz para separar a lisozima da conalbumina ele apresenta uma efetiva separação da ovalbumina das outras proteínas (fração 01). A fração 02 (que concentra lisozima e conalbumina) deverá ser submetida a outro processo de biosseparação para uma purificação completa, como o emprego de extração líquida por sistemas aquosos bifásicos.

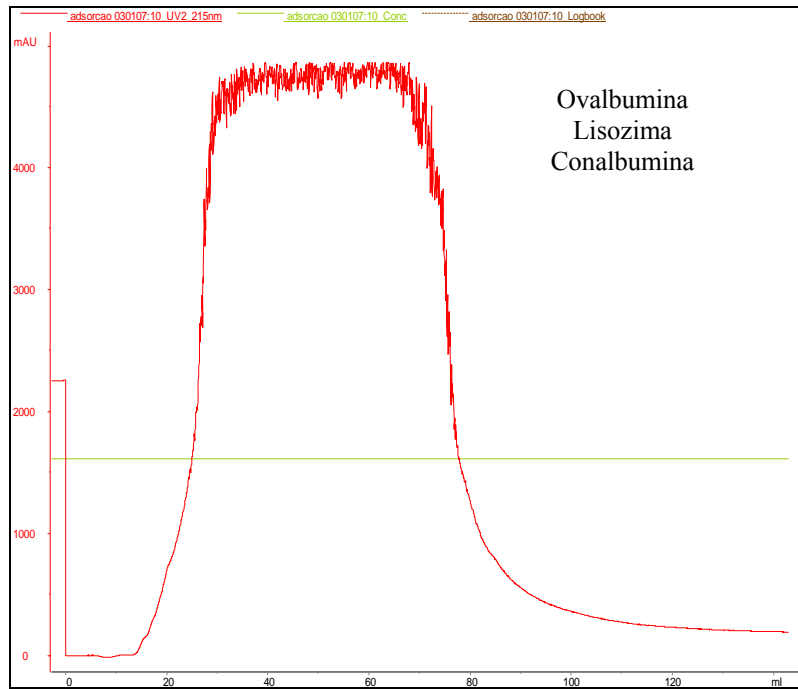


Figura 7. Cromatograma representativo da adsorção das proteínas da clara *in natura* no leito expandido.

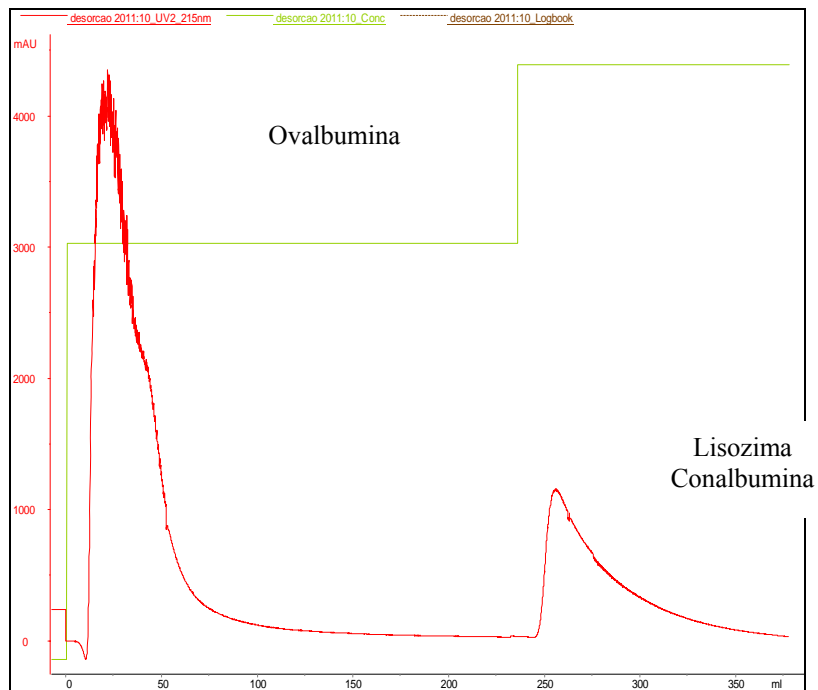


Figura 8. Cromatograma representativo da dessorção das proteínas da clara *in natura* no leito expandido.

De acordo com a Tabela 3, podemos verificar que aproximadamente 94,86 % da ovalbumina foram recuperados na fração 01 enquanto os índices de recuperação da conalbumina e da lisozima foram relativamente baixos na fração 02. Este fato pode ser devido a uma perda considerável das proteínas nas etapas de adsorção e lavagem.

O índice de recuperação foi calculado de acordo com a equação (15):

$$\text{Índice de recuperação (\%)} = \frac{C_e}{C_i} \times 100 \quad (15)$$

onde C_e é a concentração da proteína após eluição e C_i é a concentração inicial da mesma na alimentação.

Tabela 3. Índice de recuperação das frações obtidas após a eluição das proteínas da clara.

Fração	Índice de recuperação (%)			
	Ovalbumina	Conalbumina	Lisozima	UA*
Fração 01	94,86±1,05	9,16±1,47	N.D.	23,70±2,72
Fração 02	2,95±0,85	63,06±1,36	38,11±0,91	333,80±2,67

*Unidade de Atividade Enzimática (Lisozima).

4.2.1. Curvas de Ruptura

Monitorando-se a concentração do soluto na saída do leito, em função do tempo ou volume, obtém-se a curva de ruptura (*breakthrough curve*). A Figura 9 apresenta a curva de ruptura das proteínas da clara do ovo a uma vazão de 3 mL min⁻¹. Acima desta velocidade foi observada, visualmente, uma baixa estabilidade do leito. O aumento da velocidade linear provoca um aumento na expansão do leito o que ocasiona uma diminuição na eficiência da coluna em adsorver as proteínas.

TONG et al. (2002) e THOMMES et al. (1996) estudaram as curvas de ruptura obtidas experimentalmente para determinadas proteínas e analisaram principalmente o efeito da variação da velocidade linear sobre a adsorção das proteínas encontrando que um aumento neste valor diminuiu a capacidade dinâmica de adsorção da resina.

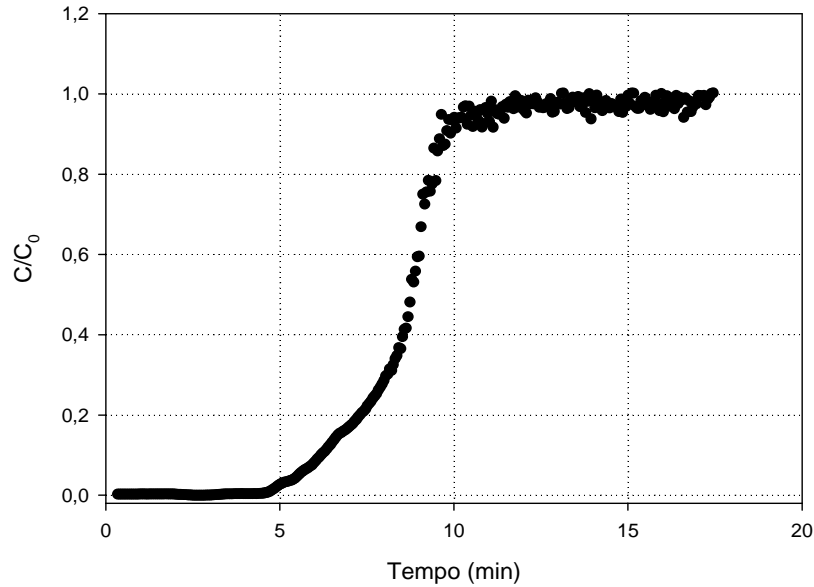


Figura 9. Curva de ruptura das proteínas da clara em leito expandido.

Via de regra, o tempo de ruptura diminui com o decréscimo da altura do leito, com o aumento do tamanho da partícula do adsorvente, com o aumento da velocidade do fluido através do leito e com o aumento da concentração inicial do soluto na alimentação. CHASE (1994) afirma que na prática deve-se interromper a alimentação na coluna quando a concentração de adsorbato na saída é aproximadamente 10 % da concentração inicial. Isto se deve ao fato de que acima deste ponto há uma perda considerável do composto de interesse, que passa pela coluna sem ser adsorvido.

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho, os resultados encontrados mostraram uma hidrodinâmica estável do leito expandido, com valores de coeficiente de dispersão axial de acordo com os valores encontrados na literatura. A resina de troca catiônica permitiu a separação de duas frações protéicas da clara do ovo. A análise do índice de recuperação das proteínas após a eluição demonstra uma boa eficiência na separação da ovalbumina, concentrada na fração 01, das outras proteínas da clara (lisozima e conalbumina), presentes na fração 02. Porém na segunda fração protéica obtida, foram encontrados baixos índices de recuperação das proteínas e,

portanto, esta fração poderia ser submetida a um próximo processo de separação, como o uso de extração líquido-líquido por sistemas aquosos bifásicos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, **EBA Handbook: Principles and Methods**. Uppsala, 1997.

AWADE, A. C., MOREAU, S., MOLLE, D., BRULÉ, G. and MAUBOIS, J. L. Two-step chromatographic procedure for the purification of hen egg white ovomucin, ovotransferrin and ovalbumin ad characterization of purified proteins. **Journal of Cromatography A**, v. 677, p. 279-288, 1994.

BATT, B. C., YABANNAVAR, V. M. and SINGH, V. Expanded bed adsorption process for protein recovery from whole mammalian cell culture broth. **Bioseparation**, v. 5, p.41-52, 1995.

BRUCE, L. J. and CHASE, H. A. Hydrodynamics and adsorption behavior within an expanded bed adsorption column studied using in-bed sampling. **Chem. Eng. Sci.** v. 56, p. 3149–3162, 2001.

BUIJS, A and WESSENLINGH, J.A. Batch fluidized ion-exchange column for streams containing suspended particles. **Journal of Chromatography A**, v.210, p.319-327, 1980.

CHANG, Y. K. and CHASE, H. A. Development of operating conditions for protein purification using expanded bed techniques: the effect of the degree of bed expansion on adsorption performance. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 46, p. 512-516, 1996.

CHANG, Y.K and CHASE, H. A. Ion exchange purification of G6PDH from unclarified yeast cell homogenates using expanded bed adsorption. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 49, p. 204-216, 1996.

CHANG, Y. K., McCREATH, G. E., DRAEGER, N. M. and CHASE, H. A. Novel Technologies for Direct Extraction of proteins. **Trans. Inst. Chem. Engs.**, v. 71 B, p. 299-303, 1993.

CHASE, H. A. Purification of proteins by adsorption chromatography in expanded beds, **TIBTECH**, vol. 12, p. 296-303, 1994.

CHASE, HA. and DRAEGER, N. M., Affinity purification of proteins using expanded beds. **Journal of Chromatography A**, v. 597, p.129-145, 1992.

CHENG, W-D, DONG, X-Y and SUN, Y. Modeling of the whole expanded-bed protein adsorption process with yeast cell suspensions as feedstock. **Journal of Chromatography A**. v. 1012, p.1-10, 2003.

CHETTY, A. S. and BURNS, M. A., Continuous protein separations in a magnetically stabilized fluidized bed using nonmagnetic supports. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 38, p.963-971, 1991.

CROGUENNEC, T., NAU, F., PEZENNEC, S. and BRULE, G. Simple rapid procedure for preparation of large quantities of ovalbumin. **J. Agric. Food Chem.** v. 46, p. 4883-4889, 2000.

DASARI, G.; PRINCE, I. and HEARN, M. T. W. High-performance liquid chromatography of amino acids, peptides and proteins. **Journal of Chromatography A**. v.631, p.115-124, 1993.

DE LUCA, L.; HELLENBROICH, D.; TITCHENER-HOOKER, N. J. and CHASE, HA., A study of the expansion characteristics and transient behavior of expanded beds of adsorbent particles suitable for bioseparations. **Bioseparation**, v.4, p.311-318, 1994.

DOS SANTOS, E. S., GUIRARDELLO, R. and FRANCO, T.T. Preparative chromatography of xylanase using expanded bed adsorption. **Journal of Chromatography A**. v. 944, p. 217-224, 2002.

DOS SANTOS, E. S. **Recuperação e purificação de enzimas usando adsorção em leito expandido**. Dissertação de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2001, 151 p.

FEUSER, J., HALFAR, M., LUTKEMEYER, D., AMESKAMP, N., KULA, M-R. and THÖMMES, J. Interaction of mammalian cell culture broth with adsorbents in expanded bed adsorption of monoclonal antibodies. **Process Biochemistry**, v. 34, p.159-165, 1999.

FREJ, A-K, B., HJORTH, R. and HAMMARSTROM, A., Pilot scale recovery of recombinant annexin V from unclarified *Escherichia coli* homogenate using expanded bed adsorption. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, p. 922-929, 1994.

FREJ, A-K. B., JOHANSSON, H. J., JOHANSSON, S. and LEIJON, P. Expanded bed adsorption at production scale: scale-up verification, process example and sanitization of column and adsorbent. **Bioprocess Engineering**, v. 16, p. 57-63, 1997.

HJORTH R. Expanded bed adsorption in industrial bioprocessing: recent developments. **Trends in Biotechnol.** v. 15, p. 230-235, 1997.

JANSON, J.C., RYDEN, L. **Protein purification**, Wiley-Liss, 2° ed., New York, 1998, 695p.

LEVISON, P.R., HOPKINS, A. K., HATHI, P., BADGER, S. E., MANN, F., DICKSON, N. and PURDOM, G., Suspended bed chromatography, a new approach in downstream processing. **Journal of Chromatography A**, v. 890, p. 45-51, 2000.

LEVISON, P.R., STEPHEN, E. B., THOME, D.W., KOSCIELNY, M.L., LANE, L. and BUTTS, E.T. Economic considerations important in the scale-up of an ovalbumin separation from hen egg-white on the anion- exchange cellulose DE92. **Journal of Chromatography A**, v. 590, p. 49-58, 1992.

LYDDIAT, A. Process chromatography: current constraints and future options for the adsorptive recovery of bioproducts. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 13, p. 95-103, 2002.

McGREATH, G. E., CHASE, H. A., OWEN, R. O. and LOWE, C. R., Expanded bed affinity chromatography of dehydrogenases from baker's yeast using dye-ligand perfluoropolymer supports. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 48, p.341-354, 1995.

PESSOA JR. A, HARTMANN R., VITOLO M. and HUSTEDT H. Recovery of extracellular inulinase by expanded bed adsorption, **Journal of Biotechnology**, v. 51, p. 89-95, 1996.

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

RICHARDSON, J. F. and ZAKI, W. N. Sedimentation and fluidization: part I. **Trans. Inst. Chem. Engs.**, v. 32, p. 35-53, 1954.

SANTOS, E. S.; GUIRARDELLO, R. and FRANCO T. T. In: Ion exchange at the millenium (proceedings of IEX2000), ed. by J. A. Greig, SCI press, London, 408p, 2000.

SMITH, M.P., BULMER, M.A., HJORTH, R. and TITCHENER-HOOKER, N.J. Hydrophobic interaction ligand selection and scale-up of an expanded bed separation of an intracellular enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chromatography A**, v. 968, p. 121-128, 2002.

SUBRAMANIAM, G. **Bioseparation and Bioprocessing**. New York, v.2, 474p, 1998.

THÖMMES, J., BADER, A., HALFAR, M. and KARAU, A. Isolation of monoclonal antibodies from cell containing hybridoma broth using a protein a coated adsorbent in expanded beds. **Journal Chromatography A**. v. 752, p. 111-122, 1996.

TONG, X-D, XUE, B. and SUN, Y. Modeling of expanded-bed protein adsorption by taking into account the axial particle size distribution. **Biochemical Engineering Journal**, v. 16, p. 265-272, 2003.

TONG, X-D, DONG, X-Y., SUN, Y. Lysozyme adsorption and purification by expanded bed chromatography with a small-sized dense adsorbent. **Biochemical Engineering Journal**, v. 12, p. 117-124, 2002.

VACHIER, M. C., PIOT M. and AWADE, A. C. Isolation of hen egg white lysozyme, ovotransferrin and ovalbumin, using a quaternary ammonium bound to a highly crosslinked agarose matrix. **Journal of Chromatography B**, v. 664, p. 201-210, 1995.

VEREDAS, V. **Purificação da (alfa)-Lactalbumina a partir do Soro de Leite em Leito Fixo e Expandido de Resinas**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas, SP, 2000.

CAPÍTULO 3 - PARTIÇÃO DAS PROTEÍNAS DA CLARA DO OVO (LISOZIMA E CONALBUMINA) EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar a influência do tipo de sal e da concentração de polietilenoglicol (PEG) no coeficiente de partição da lisozima e da conalbumina da clara do ovo. Os sistemas aquosos bifásicos (SAB) avaliados foram compostos por PEG 1500 e sais inorgânicos (fosfato de potássio, citrato de sódio, sulfato de lítio e sulfato de sódio), a temperatura de 25 °C e pH 7,0. As concentrações de PEG 1500 g mol⁻¹ testadas foram 14 %, 16 % e 18 % (em massa). Foram também determinados os parâmetros termodinâmicos ($\Delta_{tr}G$, $\Delta_{tr}H$ e $\Delta_{tr}S$) associados à transferência de cada proteína para cada uma das fases. Os sistemas testados podem ser empregados na separação destas duas proteínas da clara, dado que a lisozima migra preferencialmente para a fase superior e a conalbumina para a fase inferior. Entre os sistemas avaliados os que proporcionaram as melhores condições para a extração de lisozima foram PEG1500-citrato de sódio e PEG1500-sulfato de sódio. No SAB PEG1500-sulfato, a lisozima proveniente da fração 2 do leite expandido, apresentou a maior porcentagem de recuperação teórica na fase superior (95,0 %). A partição da lisozima em SAB PEG-citrato foi entalpicamente dirigida, entretanto, em SAB PEG-sulfato foi entropicamente dirigida. Verificou-se uma alta recuperação da conalbumina na fase inferior nos SAB PEG-sulfato, sendo a partição entalpicamente dirigida.

1. INTRODUÇÃO

A clara de ovos é uma fonte natural de proteínas com alto valor nutricional e biológico. Entre estas, a lisozima e a conalbumina apresentam particular importância devido ao elevado valor nutricional e funcional, despertando amplo interesse no desenvolvimento de novas técnicas para sua separação e purificação visando manter suas características funcionais inalteradas (ROJAS et al., 2006).

Os SAB têm adquirido importância e crescente sucesso para a concentração, isolamento e separação de proteínas. Estes sistemas são constituídos

por duas fases imiscíveis, que promovem a separação de biomoléculas, em condições amenas e em um ambiente adequado, de forma que sejam preservadas as suas principais características. A alta concentração de água, de 65 % a 90 % em massa, em tais sistemas favorece a estabilidade das proteínas durante a separação, quando comparados com sistemas de extração líquida tradicionais, compostos com solventes orgânicos. Apresentam também vantagens como rapidez da separação, baixo custo e possibilidade de aplicação em grande escala. Têm sido importante ferramenta na partição e/ou concentração de compostos como células animais ou vegetais, microorganismos, fungos e seus esporos, cloroplastos, mitocôndrias, membrana vesicular, enzimas, proteínas, ácidos nucleicos, vírus, metais, entre outros (ZASLAVSKY, 1995; ALBERTSSON, 1986).

Assim, os objetivos deste capítulo foram: (i) avaliar o emprego de SAB compostos por polietilenoglicol (PEG), sal e água como técnica de separação das proteínas: lisozima e conalbumina; (ii) estudar a influência do tipo de sal formador do SAB (citrato de sódio, fosfato de potássio, sulfato de lítio e sulfato de sódio) e da concentração de PEG (14, 16 e 18 % em massa), sobre a partição das proteínas e (iii) obter os parâmetros termodinâmicos associados à transferência das proteínas para cada uma das fases.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Sistemas Aquosos Bifásicos (SAB)

A extração de biomoléculas em sistemas de duas fases líquidas imiscíveis, constituídas de uma fase aquosa e um solvente orgânico, é utilizada há cerca de 60 anos na purificação de antibióticos e ácidos orgânicos. Para proteínas, no entanto, tais sistemas não são adequados devido à sensibilidade dessas moléculas à desnaturação promovida pelos solventes orgânicos. Alternativamente à extração em solventes orgânicos, as proteínas podem ser purificadas em sistemas constituídos por duas fases aquosas imiscíveis. A purificação é resultado de uma partição diferenciada da molécula-alvo e impurezas entre as duas fases líquidas (PESSOA e KILIKIAN, 2005).

Os sistemas aquosos bifásicos (SAB) são formados por espécies químicas que, quando misturadas em determinadas faixas de composição e temperatura,

dividem-se em duas fases com composições diferentes, em equilíbrio termodinâmico. As fases são regiões que possuem propriedades termodinâmicas intensivas diferentes, como densidade, índice de refração e composição. Mas como as duas fases dos SAB estão em equilíbrio, nenhuma propriedade termodinâmica está variando em uma dimensão temporal, ou ainda, não há troca resultante de matéria entre as fases. Estas fases estão separadas por uma interface que é a região na qual as propriedades termodinâmicas intensivas de cada fase transitam para valores diferentes, sempre tendendo para o valor daquela propriedade no seio da outra fase em equilíbrio (CARVALHO, 2004).

A formação dos SAB é conhecida desde o final do século 19. Em 1896, Beijerinck descobriu que soluções aquosas de gelatina e ágar ou gelatina e amido solúvel, misturadas em uma dada faixa de temperatura e concentração, formavam misturas turvas que, em repouso, separavam espontaneamente em duas fases líquidas límpidas. A fase mais densa era enriquecida em ágar (ou amido) e a fase superior em gelatina, sendo que a água era o componente majoritário em ambas as fases. Posteriormente, Ostwald e Hertel em 1929, continuaram os estudos sobre esses sistemas e verificaram que amidos provenientes de origens distintas (arroz, milho, etc.), isto é, possuindo diferentes frações de amilose e amilopectina, produziam diferentes diagramas de fase. Esses resultados mostravam a grande influência que pequenas variações nas interações intermoleculares têm sobre as composições das fases em equilíbrio. Com objetivo de verificar uma possível generalidade do fenômeno de separação de fase em sistemas contendo macromoléculas, Dobry e Boyer-Kawenoki, no final da década de 40, estudaram a miscibilidade de um grande número de diferentes pares de polímeros, dissolvidos em solventes orgânicos ou em soluções aquosas. Estes autores constataram que dos 35 pares de macromoléculas estudados, apenas 4 não produziram a formação das duas fases, e puderam concluir que a incompatibilidade entre polímeros era um fenômeno geral (DA SILVA e LOH, 2006).

Porém, foi apenas com os trabalhos de ALBERTSSON (1986), em meados da década de 50, que ficou evidente para a comunidade científica a grande potencialidade de aplicação destes sistemas à partição/purificação de materiais biológicos, desde proteínas até células. Nestes casos, a extração através de SAB é adequada para substituir a extração convencional por solventes orgânicos, pois, pelo fato do solvente ser a água, são ambientalmente seguros e permitem a

separação de partículas sensíveis à desnaturação em outros solventes (GUSTAFSSON et al., 1986). Desde então, as pesquisas nesta área têm-se aprofundado, tornando a utilização dos SAB importante ferramenta na partição e, ou concentração de compostos como células animais ou vegetais, microorganismos, fungos e seus esporos, cloroplastos, mitocôndrias, membrana vesicular, enzimas, proteínas, ácidos nucleicos, vírus, metais, entre outros (HATTI-KAUL, 2001).

Nos últimos anos a extração líquido-líquido usando sistemas aquosos bifásicos (SAB) tem adquirido importância e crescente sucesso para a concentração, isolamento e separação de proteínas (PESSOA e KILIKIAN, 2005). JOHANSSON et al. (1996) estudaram os efeitos de íons na partição da lisozima em sistemas aquosos bifásicos compostos por óxido de etileno e copolímeros de óxido de propileno. PENG et al. (1995) desenvolveram correlações para predição do coeficiente de partição da lisozima em sistemas contendo PEG e K_2HPO_4 - KH_2PO_4 . FARRUGGIA et al. (2004) avaliaram a influência de altas concentrações de cátions monovalentes na partição de ovalbumina e lisozima em SAB compostos por PEG1500 e fosfato de potássio. SU e CHIANG (2006) investigaram o comportamento de partição da lisozima em SAB PEG1500 variando os sais (fosfato de sódio, citrato de sódio e sulfato de sódio). PICÓ et al. (2007) realizaram uma investigação calorimétrica das interações proteína-polímero e suas relações com a partição das proteínas. SHIBUSAWA et al. (1998) determinaram os coeficientes de partição de ovalbumina, conalbumina e lisozima em sistemas PEG1000-fosfato de potássio.

A base da partição em SAB é a distribuição seletiva de compostos entre as duas fases. Esta distribuição é governada por um grande número de fatores, por exemplo: natureza e tamanho da partícula alvo; constituição, tamanho e estrutura molecular do polímero; temperatura; natureza do eletrólito e pH do sistema bifásico (ALBERTSSON, 1986). Por isto, a predição e a interpretação da partição de biopartículas em sistemas aquosos bifásicos é uma difícil tarefa, embora a manipulação das propriedades do sistema tornando predominante um determinado tipo de interação venha a ser uma forma de controlar a partição (HATTI-KAUL, 2001).

2.1.1. Tipos de Sistemas Aquosos Bifásicos

Sistemas de duas fases aquosas são formados pela reunião de determinados polímeros, polieletrólitos, ou ainda, polímeros em combinação com solutos de baixa massa molar, em uma mesma solução, formando quatro grupos. Em um primeiro grupo podem ser considerados os sistemas formados por dois polímeros não-iônicos, como polietilenoglicol (PEG)/dextrana, PEG/polivinil álcool, polipropilenoglicol (PPG)/dextrana e Ficoll/dextrana. No segundo grupo tem-se um polieletrólito e um polímero não-iônico como, por exemplo, carboximetilcelulose de sódio/metil celulose. Os SAB formados por dois eletrólitos constituem o terceiro grupo: sulfato dextrana de sódio/carboximetildextrana de sódio. Finalmente, em um quarto grupo, tem-se um polímero não-iônico e um composto de baixa massa molar: PPG/fosfato de potássio, PEG/fosfato de potássio, PPG/glicose, PEG/glicose e PEG/citrato de sódio (PESSOA e KILIKIAN, 2005). Exemplos de sistemas aquosos bifásicos são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Sistemas aquosos bifásicos e seus componentes.

Polímero	Polímero
Polipropileno glicol	Polietileno glicol (PEG)
Polietileno glicol	Dextrana (Dx)
	Polivinil álcool (PVA)
	Maltodextrina (MD)
	Dextrana (Dx)
	Ficoll
	Hidroxipropil-amido (HPS)
	Polivinil alcohol (PVA)
	Polivinil pirrolidona (PVP)
	Maltodextrina (MD)
Polímero	Componente de baixa massa molar
Polietileno glicol e copolímeros	Sais inorgânicos: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{NH}_2\text{CO}_2\text{NH}_4$, Na_2HPO_4 , K_2CO_3 , K_3PO_4 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , Na_2SO_4 , Li_2SO_4 , FeSO_4 , Na_3Cit
Polietileno glicol	Glicose, maltose
Polipropileno glicol	Sais inorgânicos: K_2HPO_4 , KH_2PO_4 Glicerol

Fonte: ZASLAVSKY, 1995.

Em princípio, todos os tipos de sistemas aquosos bifásicos podem ser empregados na separação de biomoléculas. Mas, dentre os diferentes sistemas, o mais estudado é aquele composto por PEG, dextrana e água. Os sistemas PEG-dextrana e PEG-sais são normalmente usados também por se encontrarem disponíveis no mercado em grandes quantidades e não serem tóxicos, mas para uso em escala industrial, a dextrana apresenta custo muito alto. Os SAB formados por polímero-sal-água apresentam vantagens em relação aos compostos por polímero-polímero-água como baixo custo e menor tempo de separação de fases. Assim, os sistemas PEG-sal têm sido usados para a extração em larga escala. Estes sistemas podem ser formados a temperatura ambiente, sendo a fase superior rica em PEG e a fase inferior rica em sal, a separação de fases é atingida mais rapidamente devido à menor densidade de uma das fases, o que facilita o uso destes sistemas em aplicações industriais (SALABAT, 2001; GIRALDO-ZUÑIGA et al., 2000; HUSTED et al., 1985).

2.1.2. Constituintes das Fases

2.1.2.1. Polietilenoglicol (PEG)

O polietileno glicol, $\text{HO}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{H}$, é um polímero sintético, hidrofílico, não iônico, de cadeia linear ou ramificada, com massa molar variável e juntamente com outros polímeros sintéticos, constitui a base para as indústrias de plásticos, embalagens, fibras, adesivos, tintas e esmaltes. É solúvel em água e em vários solventes orgânicos. É produzido mundialmente em grandes quantidades e com massas molares variando de poucas centenas a milhares de Daltons, sendo obtido a partir da ligação de polímeros de oxietileno de massa molar menor que 40000 g mol^{-1} com metóxido de sódio ou hidróxido alcalino (CARVALHO, 2004).

A designação PEG é usada para compostos de baixa massa molar (abaixo 20000 g mol^{-1}) e a designação PEO poli (óxido de etileno) é restrita para compostos de altas massas molares (maiores que 20000 g mol^{-1}). Os métodos de produção para PEG e PEO são distintos: PEG é produzido pela polimerização do óxido de etileno com um catalisador solúvel em meio ácido ou básico (mais comum), enquanto que a preparação de PEO emprega catalisadores insolúveis. Os

PEG's com massas molares menores que 1000 g mol^{-1} são fornecidos na forma de soluções incolores estáveis ou pastas. Os de massas molares elevadas, acima de 1000 g mol^{-1} , são encontrados na forma de pó ou flocos brancos. PEG's são higroscópicos e absorverão quantidades significativas de água se expostos a alta umidade. Antioxidantes são frequentemente adicionados ao PEG para evitar decomposição oxidativa (ALVES, 2003).

A utilização do PEG é de grande interesse na biotecnologia principalmente por excluir, em ambiente aquoso, outros polímeros de sua vizinhança, não se solubilizando com eles. Por serem compostos biodegradáveis e atóxicos, a descarga de PEG não é problemática para o meio ambiente. O PEG possui uma variedade de propriedades pertinentes para aplicações biomédicas, são elas: insolubilidade em água a elevadas temperaturas, forma complexos com cátions metálicos, alta mobilidade com grande poder de volume excluído em água, agente precipitante de proteínas e ácidos nucleicos. Uma propriedade do PEG muito importante para sua aplicação comercial é sua atoxicidade. Segundo COIMBRA (1995), o PEG foi aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration), sendo considerado não antigênico nem imunogênico. Estas características têm permitido a larga utilização de PEG e seus derivados em alimentos, cosméticos, sabões e medicamentos. Vale ressaltar que na indústria de alimentos, é regulamentada a sua utilização como veículo em adoçantes de mesa (Portaria nº 38, de 13 de janeiro de 1998) e em suplementos vitamínicos e ou minerais (Resolução - RDC nº 2, de 2 de janeiro de 2001). Possivelmente, essa característica do PEG ser inerte está relacionada à manutenção da viabilidade das células sujeitas à partição em sistemas aquosos bifásicos.

O polietileno glicol, (Figura 1), é formado por unidades de óxido de etileno, em que cada unidade contém sítios ativos (oxigênios portadores de pares de elétrons livres), onde são formadas as interações com as moléculas de água e com os íons dissociados do sal (cátions e ânions).

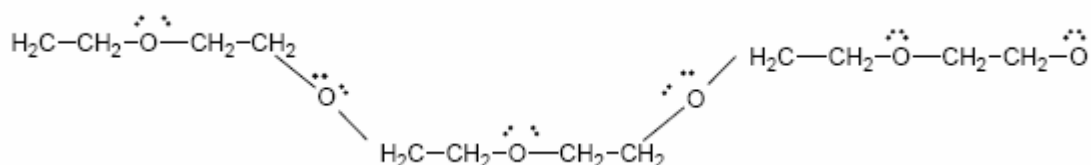


Figura 1. Representação planar parcial da molécula de PEG com os sítios disponíveis para as interações com os demais componentes do sistema.

2.1.2.2. Sais

a) Fosfato de Potássio Monobásico e Dibásico

O fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) possui cor branca e é granulado. Apresenta solubilidade em água igual a 22,2 g/100mL a 20 °C. É insolúvel em álcool. Possui o pH entre 4,4 e 4,7, quando em solução de 50 g/L d'água. O fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) é branco, higroscópico, solúvel em água e ligeiramente solúvel em álcool. Pode ser convertido em pirofosfato por ignição. A solução aquosa formada com este sal é ligeiramente alcalina (pH entre 8,7 e 9,3 quando em solução aquosa de concentração de 50 g/L). A solubilidade em água a 20 °C é igual a 160 g/100mL (SIGMA-ALDRICH, 2001).

b) Citrato de Sódio

Também chamado de citrato trissódico, o citrato de sódio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_8$) apresenta-se na forma de cristais brancos, inodoros e estáveis em ar. É normalmente comercializado na forma de citrato trissódico dihidratado, com massa molar de 294,10 g/mol. Apresenta solubilidade de 42,5 g/100mL em água a 25 °C. Possui pH entre 7,5 e 9,5 a 20 °C quando em solução de 50 g/L de citrato trissódico dihidratado em água. É usado em fotografia como agente seqüestrante para remover traços de metais, como anticoagulante e na indústria de alimentos como emulsificante, acidulante e seqüestrante (CARVALHO, 2004). Citrato de sódio é biodegradável, atóxico e pode ser descarregado em plantas de tratamento biológico de água residuária (ALVES, 2003).

c) Sulfato de Lítio

O sulfato de lítio (Li_2SO_4) possui solubilidade de 35,64 g/100mL em água a 18°C. É um componente de interesse tecnológico com aplicações na detecção de radiação a laser, como um elemento ótico de transmissão de imagens, na fabricação de cristais de alta resistência na indústria farmacêutica. Este sal pode ser também utilizado na recuperação de soluções com a adição de agentes precipitantes, como anti-solventes, em função da sua solubilidade invertida e da pequena variação da solubilidade com a temperatura. Esta técnica é uma alternativa para a recuperação deste sal visando substituir a precipitação por congelamento e evaporação (TABOADA, 2002).

d) Sulfato de Sódio

O sulfato de sódio (Na_2SO_4) é um sal branco, cristalino, com solubilidade em água de 16,86 g/100mL a 18 °C. Apresenta pH entre 5,2 e 9,2 a 20 °C quando em solução de 50 g/L de sulfato de sódio em água (CARVALHO, 2004). Possui larga aplicação industrial e em particular nas indústrias têxtil, de papel, detergente e vidro.

2.1.3. Diagrama de Fases do Sistema Aquoso Bifásico

Para a utilização de SAB é necessário o conhecimento do comportamento das fases nos sistemas. Para isto são efetuados os diagramas de fases para os componentes, nos quais as composições dos constituintes para a separação das fases são determinadas. As Figuras 2 e 3 apresentam exemplos de diagrama de fases, mostrando a composição das fases em equilíbrio, em coordenadas triangulares e retangulares, respectivamente.

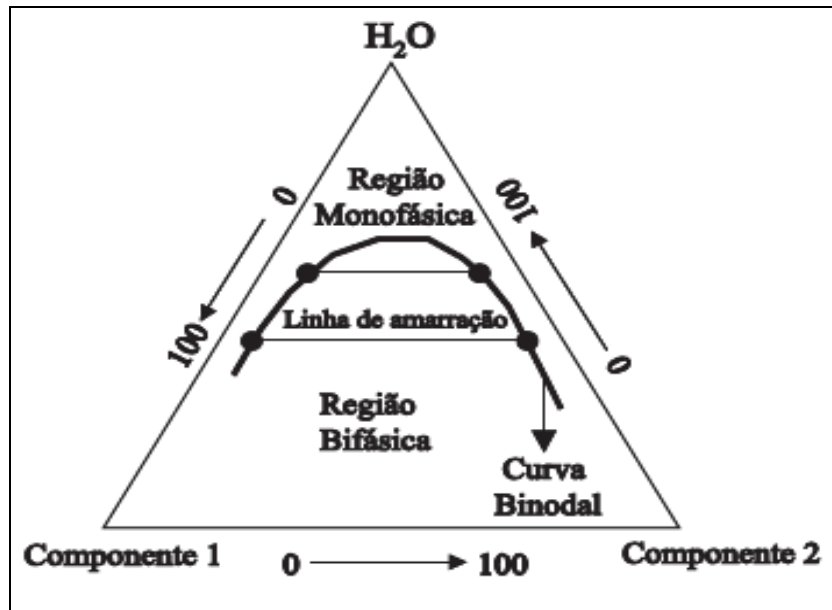


Figura 2. Diagrama de fase para sistemas aquosos bifásicos, expresso em coordenadas triangulares.

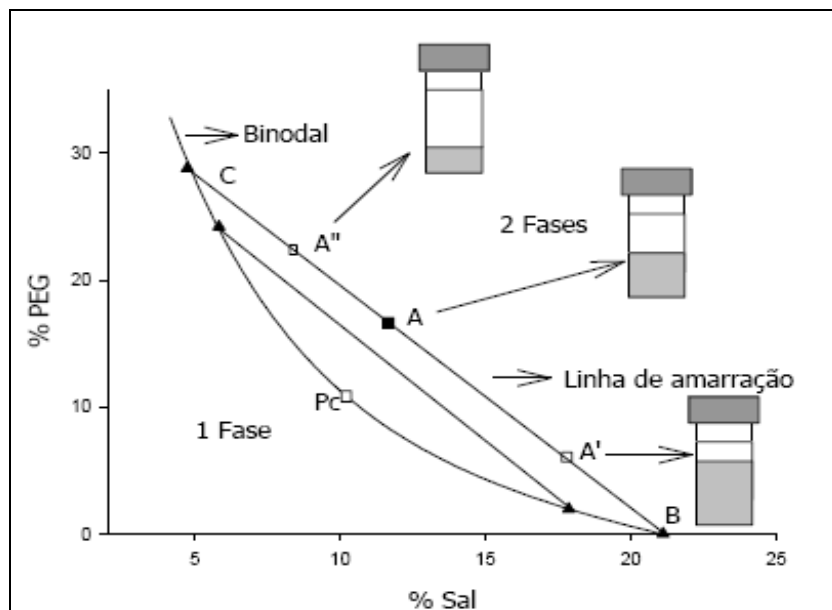


Figura 3. Diagrama de fase para sistemas aquosos bifásicos, expresso em coordenadas retangulares.

Convencionalmente, os componentes presentes em maior quantidade nas fases inferior e superior são representados no eixo das abscissas e das ordenadas, respectivamente. A quantidade de água é calculada por diferença. A curva que

divide a região em duas fases é chamada de curva binodal ou curva de equilíbrio. A região acima da curva binodal é chamada de bifásica e a abaixo, monofásica (ALBERTSSON, 1986).

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

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

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

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

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

2.1.4. Variáveis que Influenciam o Sistema Aquoso Bifásico

São diversas as variáveis que influenciam na formação e na partição de biomoléculas dos sistemas bifásicos aquosos. Entretanto, ao se fazer um estudo da partição de biomoléculas é necessário conhecer os dados de equilíbrio para todos os sistemas. Para cada sistema seja polímero/polímero ou polímero/sal existe um diagrama de fases que define as proporções entre os componentes formadores das fases. Alguns desses diagramas estão disponíveis na literatura (ALBERTSSON, 1986), porém é importante que ao testar um novo sistema se construa um diagrama nas condições de trabalho a serem utilizadas na extração (temperatura, pH, massa molar do PEG e adição de suspensões biológicas).

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

2.1.4.1. Massa Molar e Concentração do Polímero

Em geral, um aumento da massa molar do polímero do sistema de duas fases aquosas, para uma determinada composição de fases, diminui a partição de material biológico para a fase rica em polímero. Quanto maior for a massa molar do polímero, menor é o volume de solvente disponível, o que implica em uma diminuição de solubilidade das proteínas na fase rica em polímero e conseqüentemente uma diminuição do coeficiente de partição (ALBERTSSON, 1986).

O efeito da massa molar dos polímeros por sua vez depende da massa molar da biomolécula a ser separada. No caso de proteínas, aquelas com massas

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

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

2.1.4.2. Tipo de Cátion e pH

A redução do pH desloca a curva de equilíbrio para a direita. Assim, as concentrações necessárias à formação de duas fases líquidas, em um sistema polímero e sal, aumentam. Em relação à partição de proteínas, o pH altera as cargas da superfície das proteínas e, conseqüentemente, o seu coeficiente de partição (LEHNINGER, 1976). Um exemplo clássico é a desnaturação de proteínas devido à redução de pH. A distribuição de proteínas desnaturadas em soluções líquidas é diferente daquela obtida em seu estado natural, por apresentarem área superficial significativamente maior que na forma nativa. Contudo, a influência da carga da biomolécula depende muito do tipo de sal presente no sistema, uma vez que diferentes sais dão origem a diferentes potenciais elétricos entre as fases.

Mudanças no pH podem também induzir mudanças conformacionais na estrutura das proteínas, causando mudança em seus comportamentos de separação. Em condições extremas de pH é possível que ocorra a desnaturação das proteínas.

Geralmente, a partição de proteínas desnaturadas é diferente da partição das mesmas proteínas na forma nativa, o que pode ser atribuído não só a maior área superficial da forma desnaturada, mas também ao fato da superfície exposta desta ser muito mais hidrofóbica. Como regra geral as proteínas carregadas mais negativamente (nos casos em que o pH é superior ao pI) tem maior afinidade pela fase superior que é rica em PEG (ALBERTSSON, 1986, FORCINITI e HALL, 1991).

2.1.4.3. Tipo e Concentração de Sal

A composição do sal é outra variável de suma importância na partição de todas as espécies de moléculas e partículas celulares (COSTA et al., 1998). Sais que possuem distribuição diferenciada entre as duas fases são importantes para o sistema, pois eles terão grande influência na diferença de potencial elétrico entre as fases. A adição de sais, mesmo que em concentrações milimolares, influencia fortemente a partição de materiais eletricamente carregados. Embora os sais se distribuam quase que igualmente entre as fases, existem pequenas diferenças nos coeficientes de partição de diferentes sais, o que significa que diferentes íons possuem diferentes afinidades pelas fases, criando uma diferença de potencial elétrico entre as fases, que por sua vez direciona a partição de materiais biológicos carregados (SARUBBO, 2000). A adição de sais, tais como NaCl, em um sistema PEG e dextrana tende a diminuir o coeficiente de partição das proteínas carregadas negativamente e tende a aumentar o coeficiente de partição das proteínas carregadas positivamente (CASCONI et al., 1991; SCHIMIDT et al., 1996).

2.1.4.4. Temperatura

A influência da temperatura é bastante complexa devido ao seu efeito na composição das fases em equilíbrio, assim como a alteração da estrutura da biomolécula e desnaturação (SARUBBO, 2000). Geralmente, para baixas temperaturas (menores que 20°C) a curva binodal desloca-se em direção às baixas concentrações dos componentes que formam as fases, resultando no aumento do comprimento das linhas de amarração. Os sistemas de fases próximos do ponto

crítico podem ser mais influenciados pela mudança de temperatura devido à sua instabilidade, quando a curva binodal é deslocada, podendo assim o sistema passar facilmente para a região monofásica (BAMBERGER et al., 1985; TJERNELD et al., 1985).

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

2.1.5. Coeficiente de Partição

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

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

onde $[P]_{\text{sup}}$ e $[P]_{\text{inf}}$ são as concentrações de equilíbrio da proteína particionada nas fases ricas em PEG-(superior) e salina-(inferior), respectivamente.

Entre as relações capazes de expressar o coeficiente de partição pode ser citada, por exemplo, segundo DIAMOND e HSU (1989) a expressão:

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

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

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

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

3. MATERIAIS E MÉTODOS

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

3.1. Materiais

A lisozima e a conalbumina foram adquiridas da Sigma Aldrich (USA). Polietilenoglicol (PEG) 1500 g mol⁻¹ (SYNTH, Brasil), fosfato de potássio (monobásico e dibásico) (VETEC, Brasil), sulfato de sódio, citrato de sódio e sulfato de lítio (CROMOLINE, Brasil) foram utilizados no preparo dos SAB.

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, não necessitando de maiores purificações. Nos experimentos foram empregados água ultrapura (sistema Milli-Q, Millipore Inc., USA) e reagentes químicos de grau analítico ou cromatográfico.

3.2. Escolha dos Sistemas de Trabalho

Os dados de equilíbrio para os sistemas aquosos bifásicos utilizados neste trabalho foram obtidos por CARVALHO (2004) e OLIVEIRA (2006). A partir dos sistemas bifásicos contendo PEG de massa molar 1500 g mol⁻¹ e do sal

formador da fase (fosfato de potássio, citrato de sódio, sulfato de lítio ou sulfato de sódio), foram obtidos os coeficientes de partição da lisozima e da conalbumina na temperatura de 25 °C em função da concentração do PEG (14 %, 16 % e 18 % em massa) e do tipo de sal. As análises foram conduzidas em duplicata.

3.3. Preparo dos Sistemas Aquosos Bifásicos (SAB)

Sistemas aquosos bifásicos foram preparados pela mistura de PEG 1500 g mol⁻¹ e um sal (fosfato de potássio, citrato de sódio, sulfato de lítio ou sulfato de sódio). Para preparar os SAB, soluções estoques dos componentes das fases PEG 1500, a 50 % em massa, fosfato de potássio, pH 7,0, a 30 % em massa, e água foram misturados até a obtenção da composição total do sistema. Para o preparo de uma solução estoque de fosfato de potássio, o ajuste do pH em 7,0 foi obtido adicionando fosfato de potássio monobásico e dibásico na proporção de 1:1,82, respectivamente. O sulfato de sódio, o sulfato de lítio e o citrato de sódio foram empregados pela pesagem de sua forma sólida. Os valores de pH das soluções salinas utilizadas de sulfato de sódio e sulfato de lítio eram próximos de 7,0, não necessitando de ajustes.

Todos os sistemas foram preparados em tubos de centrífuga graduados. A massa total do sistema em cada tubo foi de 12 g, sendo que a quantidade de cada proteína (lisozima e conalbumina) adicionada ao sistema foi de 5,0 mg (Balança analítica, M-310, DENVER INSTRUMENT, USA). As proteínas foram os últimos componentes a serem adicionados. Cada tubo foi agitado manualmente por, aproximadamente, 3 minutos e então centrifugado (EPPENDORF 5702, Brasil) a 4000 rpm por 10 minutos, objetivando acelerar a formação das fases. Os tubos foram colocados em um banho termostático (TE-184, TECNAL, Brasil) na temperatura de trabalho (25 °C), sendo mantidos em repouso durante 20 horas.

Após esse tratamento, para determinar a concentração das proteínas em cada uma das fases, amostras de ambas as fases foram coletadas usando uma pipeta para a fase superior e uma seringa com uma agulha longa e fina para a fase inferior. Os volumes foram determinados em tubos graduados.

O comprimento da linha de amarração, usualmente referido como TLL, foi calculado, a partir das concentrações dos componentes nas fases, pela equação (1).

3.4. Medida do Volume das Fases

Para cada tubo (ou célula de equilíbrio) foi obtida uma relação entre a massa de água e a altura da coluna de água atingida por esta massa. A partir da densidade da água, na temperatura ambiente, e da relação $\rho = \frac{m}{V}$, uma curva analítica para a determinação do volume das fases nos tubos foi construída em função do volume de água e da altura da coluna de água. Desta forma, antes da retirada das alíquotas das fases, a altura de cada fase foi medida com régua e o volume calculado. A altura da fase inferior foi lida a partir do fundo do tubo até a interface e a altura da fase superior foi calculada subtraindo a altura total (medida do fundo do tubo até a superfície da fase superior) da altura da fase inferior.

3.5. Quantificação das Proteínas Presentes nas Fases

A quantificação das proteínas (lisozima e conalbumina) presentes em cada fase, salina e polimérica, foi conduzida por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em um sistema ÄKTA Purifier[®] 10/100 (Amersham Pharmacia Biotech, Suécia), usando uma coluna Mono S[®] HR 5/5 (Pharmacia Biotech, Suécia) de troca catiônica. O eluente foi monitorado pela absorção UV (UV-900) a 215 nm e a condutividade foi medida em uma célula de fluxo pH/C-900. As amostras foram injetadas por meio de um loop de 50 µl. Todas as amostras foram previamente filtradas utilizando filtros Millipore de 0,22 µm. Para a eluição das proteínas foi utilizado um gradiente de fase móvel composto pelo tampão fosfato pH 7,0 (A) e tampão fosfato pH 7,0 + 0,5 mol/L de NaCl, a uma vazão de 1,0 mL.min⁻¹, de acordo com a Tabela 2. A pressão máxima no leito da coluna foi de 2,0 MPa. Devido a sua alta viscosidade, a fase polimérica foi diluída antes de ser injetada em 1:2 (amostra:água).

Tabela 2. Gradiente de eluição das proteínas das fases dos SAB.

Tempo (min.)	% Tampão	
	A	B
0	100	0
1	100	0
3	65	35
7	65	35
9	25	75
14	25	75
15	0	100
18	0	100

3.6. Cálculo do Coeficiente de Partição

Após a análise cromatográfica a concentração de proteína em cada fase foi encontrada relacionando a área do pico da proteína com uma curva analítica (área versus concentração), obtida usando as proteínas puras. Após encontrar a concentração de cada proteína (lisozima e conalbumina) em cada fase determinou-se o coeficiente de partição, utilizando a equação (2).

Este coeficiente é usado para quantificar o grau de separação alcançado em um processo de extração. Os experimentos foram feitos em duplicata e a média dos resultados foram os valores empregados neste trabalho. Para selecionar os SAB com a melhor capacidade de purificação das proteínas, foi calculada uma recuperação teórica (y , %) nas fases superior e inferior, respectivamente, por meio da seguinte equação:

$$y_{\text{sup}} (\%) = \frac{100}{1 + (1/RK)} \quad (5)$$

$$y_{\text{inf}} (\%) = \frac{100}{1 + (1/RK_M)} \quad (6)$$

em que $R = V_s/V_I$, V_s e V_I correspondem aos volumes das fases superior e inferior, respectivamente. Para a conalbumina $R=V_I/V_s$.

Foi proposta uma nova fórmula para cálculo das porcentagens de recuperações teóricas da lisozima e da conalbumina na fase extratora, como modificação do parâmetro K pelo parâmetro K_M . Como a conalbumina é extraída na fase inferior, no caso desta proteína:

$$K_M = \frac{C_i}{C_s} \quad (7)$$

onde C_i é a concentração da conalbumina na fase inferior e C_s é a sua concentração na fase superior.

3.7. Determinação da Entalpia de Transferência

A variação da entalpia de transferência, $\Delta_{tr}H$, de um soluto entre duas fases líquidas praticamente imiscíveis pode ser obtida tanto diretamente (por calorimetria) quanto indiretamente (por exemplo, a partir da equação de van't Hoff).

Neste trabalho, a determinação da $\Delta_{tr}H$ foi realizada diretamente por microcalorimetria de titulação isotérmica. Esta técnica, permitiu a obtenção do calor de transferência a partir da adição de uma fase extratora (polimérica, no caso da lisozima e salina, no caso da conalbumina) diretamente na fase onde a proteína se encontra dissolvida. As vantagens desta técnica em comparação com a microcalorimetria de solução são: a menor quantidade de reagente necessária para a determinação de $\Delta_{tr}H$ e a possibilidade de executar o experimento de transferência estando presentes as duas fases.

As medidas de entalpia de transferência foram feitas utilizando-se um microcalorímetro de titulação isotérmica, CRC (USA, modelo ITC 4200). Este microcalorímetro é composto por um par de celas com capacidade para 1,8 mL de solução, sendo uma para a amostra e outra para a referência e uma seringa que adiciona volumes determinados da solução titulante (fase extratora) ao mesmo tempo em que agita a solução a uma determinada temperatura. Os experimentos de titulação consistiam de injeções consecutivas de alíquotas de 10 μ L da fase superior (em uma concentração de PEG pré-estabelecida) ao vaso calorímetro contendo 1,8 mL da fase inferior, com 3 mg/mL da proteína (lisozima). Para a obtenção da energia de transferência descontou-se da energia total (descrita acima) a energia associada à formação de microfases da fase superior dispersa na fase inferior. Para isso, alíquotas da fase superior foram também injetadas na fase inferior pura (ausência de proteína).

A quantidade de proteína presente na fase salina ao ser transferida para a gota da solução polimérica adicionada, registrava picos cujas áreas eram proporcionais à energia relativa à transferência da proteína para a fase superior presente na seringa (Figura 4). A integral da curva potência x tempo fornece a entalpia decorrente do processo de transferência.

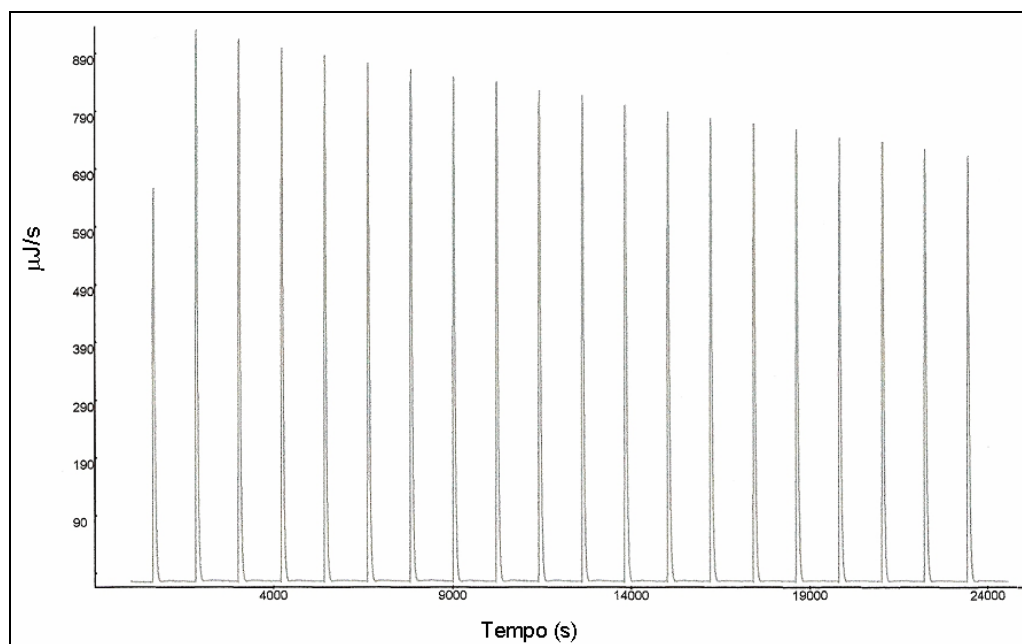


Figura 4. Registro de um experimento realizado no ITC 4200.

Os valores de variação da entalpia de transferência foram calculados levando-se em conta a quantidade de mols de proteína transferidos em cada injeção, utilizando-se para isso os valores de coeficiente de partição obtidos experimentalmente. Em cada experimento foram feitas 20 adições.

No caso da conalbumina, foi realizado um procedimento inverso ao descrito anteriormente, ou seja, foram feitas injeções sucessivas da fase salina na fase superior contendo a proteína dissolvida.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Sistemas aquosos bifásicos (SAB) compostos por PEG 1500-sal foram aplicados para investigar o comportamento de partição das proteínas da clara do ovo (lisozima e conalbumina). A mudança do tipo e concentração do sal pode

alterar o comportamento de partição de materiais biológicos (ALBERTSSON, 1986).

Então, quatro sistemas PEG 1500-sal foram usados para investigar o efeito do sal formador de fase na partição das proteínas a temperatura de 25 °C e pH 7,0. Os SAB PEG-fosfato, PEG-citrato e PEG-sulfato são adequados para purificação em larga escala de materiais de origem biológica e permitem o uso de equipamentos tradicionais de extração líquido-líquido (COIMBRA et al., 1994, 1995). Sistemas PEG-fosfato são os mais utilizados em biotecnologia de purificação de proteínas devido ao seu baixo custo e a possibilidade de reciclagem dos componentes. Citrato foi usado devido a suas baixas propriedades poluentes. O sulfato foi usado pela sua habilidade em promover interações hidrofóbicas entre proteínas (SU e CHIANG, 2006).

As composições de equilíbrio dos SAB estudados são mostradas no Anexo A.

SU e CHIANG (2006) estudaram sistemas compostos por PEG 1500 variando-se os sais (sulfato, citrato e fosfato) (pH 7,0, 25 °C) e encontraram que, em todos os casos, a lisozima migrou para a fase superior. SHIBUSAWA et al. (1998) avaliaram a partição de lisozima e conalbumina em sistema PEG 1000-fosfato de potássio (pH 7,0, 25 °C) e encontraram que a lisozima particiona-se preferencialmente para a fase polimérica e a conalbumina para a fase salina. Os autores encontraram coeficientes de partição para conalbumina próximos de 0,5 e para a lisozima próximos de 1,5. PENG et al. (1995) estudaram a partição da lisozima em sistema PEG 4000-fosfato (pH 7,0, 25°C) e encontraram valores de K próximos de 1,5.

4.1. Influência do Comprimento da Linha de Amarração (TLL) na Partição das Proteínas

Na Tabela 3 são apresentados os valores de coeficiente de partição (K) e as recuperações teóricas ($\nu\%$) para lisozima e conalbumina. Podemos observar que a lisozima concentra-se na fase superior enquanto a conalbumina transfere-se preferencialmente para a fase inferior. As maiores porcentagens de recuperação da lisozima na fase superior e da conalbumina na fase inferior foram encontradas nos sistemas PEG 1500-citrato de sódio.

Nos sistemas PEG 1500-fosfato de potássio não se observou uma variação dos valores de K em relação ao aumento da TLL, possivelmente devido a uma precipitação da proteína na interface (como observado visualmente). BABU et al. (2008) observaram este mesmo fato estudando a partição de bromelina e PPO (polifeniloxidase) em sistemas PEG 1500 (12 % em massa) e fosfato de potássio (14-20 % em massa).

Tabela 3. Coeficientes de partição e recuperação teórica de lisozima (na fase polimérica) e da conalbumina (na fase salina) para os SAB PEG-sal a 25 °C, pH 7,0.

SAB	PEG (% m/m)	Lisozima		Conalbumina	
		K	y_{sup} (%)	K	y_{inf} (%)
PEG -	14,00	1,72±0,04	60,63±0,50	0,31±0,02	78,33±0,96
Citrato de	16,00	2,30±0,01	70,44±0,06	0,24±0,03	82,63±2,04
Sódio	18,00	3,85±0,17	77,39±0,79	0,21±0,01	84,28±0,82
PEG -	14,00	1,12±0,06	61,79±1,23	0,35±0,04	67,27±0,02
Fosfato de	16,00	1,13±0,01	61,85±0,16	0,33±0,01	68,40±0,05
Potássio	18,00	1,18±0,02	63,73±0,11	0,30±0,01	70,27±0,16
PEG -	14,00	1,39±0,25	61,99±3,22	0,20±0,02	81,23±0,93
Sulfato de	16,00	1,85±0,13	66,17±0,31	0,19±0,05	82,33±0,33
Lítio	18,00	2,04±0,03	64,12±4,27	0,18±0,01	83,48±0,68
PEG -	14,00	1,01±0,03	63,97±4,46	0,20±0,03	80,94±0,29
Sulfato de	16,00	1,18±0,01	66,90±1,63	0,18±0,04	83,33±0,05
Sódio	18,00	1,46±0,21	72,44±0,28	0,18±0,01	82,61±0,05

O comprimento da linha de amarração (“tie line length”, TLL) pode ser considerado uma medida de como as composições das fases variam com a modificação das propriedades do sistema. Este parâmetro também influencia a partição das proteínas nos sistemas PEG-sal. Nas Figuras 5 e 6 observa-se o comportamento do $\ln K$ em função do TLL, para lisozima e para conalbumina, respectivamente.

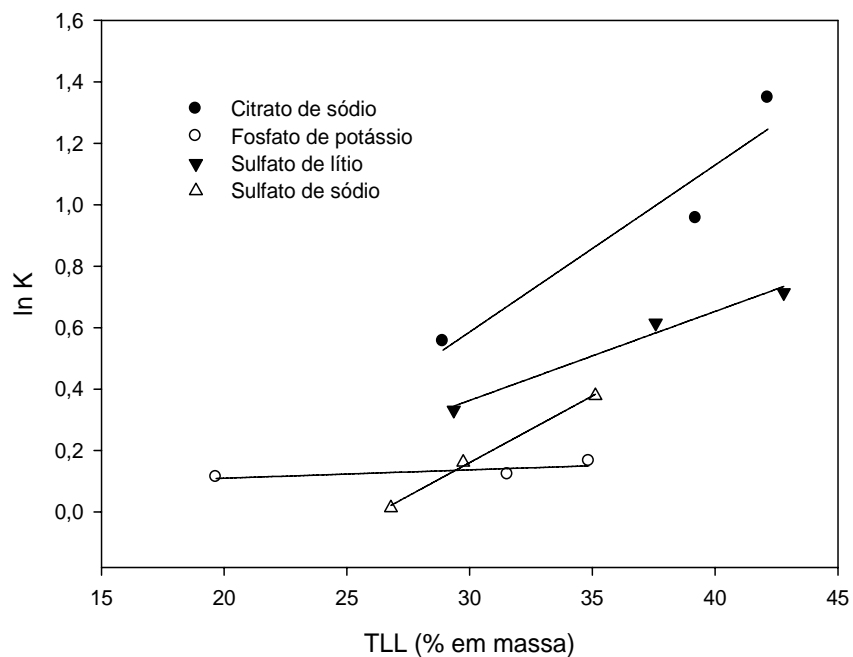


Figura 5. Influência da TLL no lnK para a lisozima.

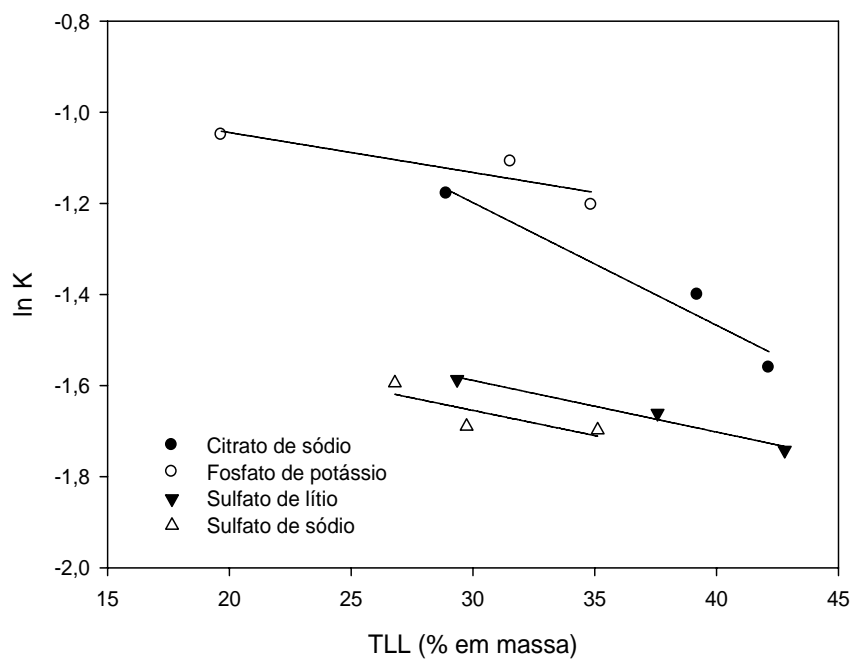


Figura 6. Influência da TLL no lnK para a conalbumina.

Os resultados mostram que a partição da lisozima para fase superior aumenta com o incremento do TLL, enquanto o comportamento contrário é observado para a conalbumina.

Para a lisozima, verificou-se um aumento do coeficiente de partição à medida que se elevava a concentração de PEG na fase superior e a concentração de sal na fase inferior. ALBERTSSON (1986) observou a mesma tendência ao particionar albumina de soro bovino (BSA) utilizando SAB compostos por PEG e Dextrana. BLÁSQUEZ et al. (1998) encontraram o mesmo comportamento estudando a partição de α -amilase em sistemas PEG-sulfato de magnésio. RODRIGUES (2001) também verificou que a β -lactoglobulina dirigiu-se mais para a fase superior com o aumento na concentração de PEG em sistemas PEG-sulfato de amônio. BABU et al. (2008) verificaram que um aumento na concentração de fosfato de potássio de 14 % a 20 % (em massa) resultou em um aumento nos coeficientes de partição de PPO e bromelina.

No caso da conalbumina, pode ser observado na Tabela 3 que um aumento na concentração de PEG resultou em um decréscimo na partição da proteína para a fase superior. BABU et al. (2008) encontraram este mesmo comportamento ao estudar a partição das enzimas PPO (polyphenol oxidase) e bromelina, obtidas do abacaxi, em sistemas PEG 1500 e fosfato de potássio, aumentando a concentração de PEG de 12 % para 18 %. RODRIGUES (2001), de um modo geral, observou-se esta tendência estudando a partição de α -lactalbumina, ou seja, um incremento da concentração de PEG resultou numa diminuição da partição da α -lactalbumina para a fase superior.

4.2. Coeficientes de Partição da Fração Protéica da Clara do ovo *In Natura* obtida por Adsorção em Leito Expandido

No Capítulo 2 foi descrito o procedimento de adsorção em leito expandido (ALE) para separação de duas frações protéicas da clara do ovo. A fração 1 continha ovalbumina em maior porcentagem. Porém, foram encontrados baixos índices de recuperação para a lisozima e conalbumina que estavam presentes na fração 2. Assim, para separar estas duas proteínas seria necessária a condução de uma nova etapa de purificação das mesmas. Portanto, foi estudado o comportamento de partição das proteínas presentes na fração 2 da ALE em SAB visando a separação destas.

De acordo com o estudo realizado com as proteínas puras foi observado que os sistemas PEG-citrato e PEG-sulfato apresentaram maiores porcentagens de

recuperação das proteínas. Entre os sais sulfato de sódio e sulfato de lítio foi escolhido o sistema sulfato de sódio para estudar a partição das proteínas presentes na fração devido a este sistema ter apresentado os menores erros no cálculo de K com proteínas puras. Além disso, os sistemas contendo sulfato de lítio apresentaram maior tempo para a separação de fases. Segundo (DA SILVA et al., 2006), a eficácia do Na_2SO_4 em induzir a formação de sistemas aquosos de duas fases é maior que a do Li_2SO_4 . Outro fato é que os parâmetros termodinâmicos obtidos para o sulfato de lítio foram inconsistentes.

A Tabela 4 apresenta os valores de coeficiente de partição para as duas proteínas e a recuperação da lisozima na fase superior (y_{sup} %) e da conalbumina na fase inferior (y_{inf} %). Pode-se verificar que o sistema PEG1500-sulfato de sódio apresentou as maiores de porcentagens de recuperação da lisozima presente na fração 2 do leite expandido. Entretanto, as maiores porcentagens de recuperação da conalbumina na fase inferior foram encontradas para os SAB compostos por PEG-citrato de sódio.

Assim, a integração dos processos de adsorção em leite expandido e sistemas aquosos bifásicos poderia ser utilizada para separação da lisozima da clara do ovo.

Tabela 4. Coeficientes de partição e recuperações teóricas da lisozima e da conalbumina da fração 2 da ALE em SAB.

SAB	TLL	Lisozima		Conalbumina	
		K	y_{sup} %	K	y_{inf} %
PEG - Citrato de Sódio	28,91	9,64±2,54	89,20±2,87	0,53±0,18	71,58±0,95
	39,22	7,70±2,64	87,82±2,22	0,44±0,58	73,88±2,30
	42,15	6,26±0,01	82,41±0,04	0,39±0,29	85,66±0,82
PEG - Sulfato de Sódio	26,79	9,33±0,49	92,85±0,36	0,43±0,51	64,75±0,40
	29,74	10,66±1,49	93,38±0,93	0,42±0,04	65,49±0,36
	35,12	12,60±0,02	95,52±0,01	0,42±0,03	65,32±0,30

Outro fato a ser observado é que há uma diferença entre o comportamento de partição das proteínas puras comparado ao comportamento das mesmas em um sistema real (clara do ovo). A conalbumina apresentou o mesmo comportamento de partição já discutido para a proteína pura. Entretanto sua porcentagem de recuperação foi menor utilizando a fração 02. No SAB PEG-citrato, o

comportamento de partição da lisozima presente na fração 2 seguiu uma tendência diferente da verificada para a proteína pura, pois houve uma diminuição no valor de K com o incremento da TLL. Além disso, outra diferença observada para a fração 2 é que os coeficientes de partição da lisozima em citrato foram menores que os encontrados para o sulfato.

Assim, as proteínas se comportam de maneiras distintas quando presentes em um sistema real. Este fato pode ser explicado considerando-se que diversas variáveis podem afetar os valores de K , tais como o tamanho da biomolécula, as características físicas dos sistemas utilizados, hidrofobicidade, carga elétrica, pH, afinidade, interações entre as moléculas de proteínas, entre outros.

4.3. Análise Termodinâmica da Partição

Um parâmetro termodinâmico muito utilizado para relacionar as contribuições entálpicas e entrópicas para a partição das proteínas é a energia livre de transferência ($\Delta_{tr}G$). Esta variável termodinâmica é a mudança na energia livre molar associada com o processo de transferência da proteína da fase salina para a fase polimérica e é calculada pela equação da termodinâmica clássica, a partir do valor do coeficiente de partição (K):

$$\Delta_{tr}G = -RT \ln K \quad (8)$$

As Figuras 7 e 8 mostram as relações entre as variáveis $\Delta_{tr}G$ e a TLL para os quatro tipos de SAB estudados a temperatura de 25 °C. Para a lisozima foi observada uma diminuição linear da energia livre do sistema com o aumento da TLL. Entretanto, para a conalbumina foi verificado o comportamento contrário.

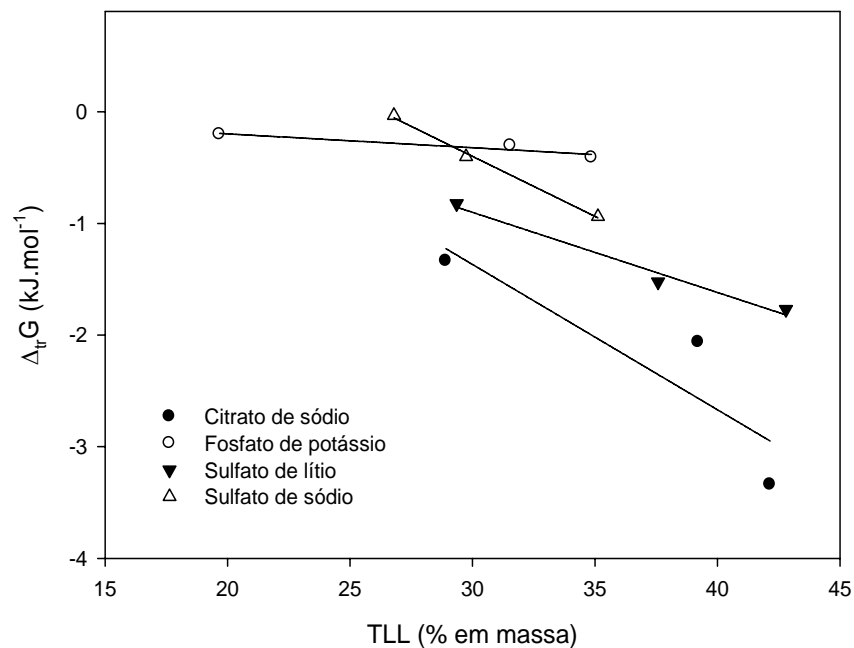


Figura 7. Influência da TLL no $\Delta_{tr}G$ para a lisozima.

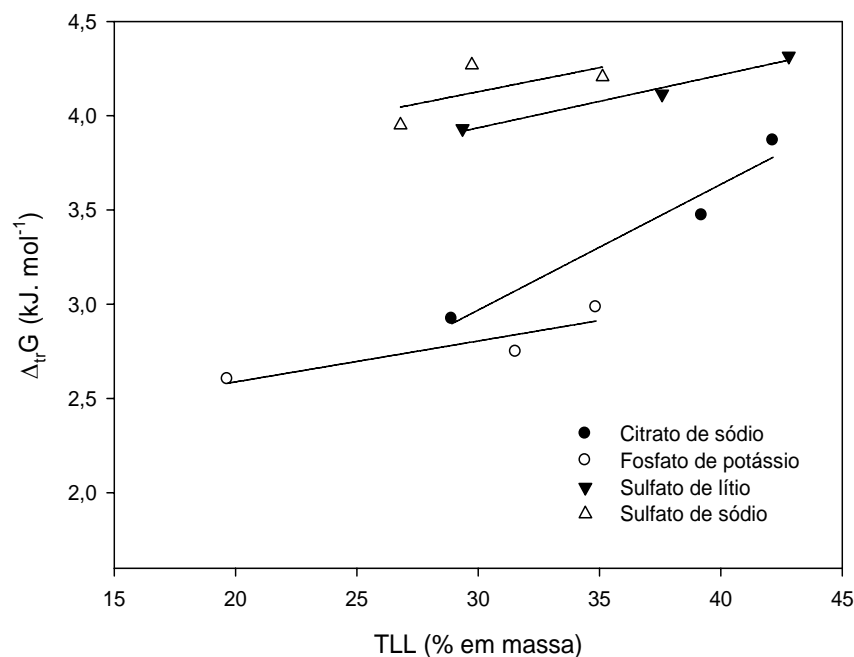


Figura 8. Influência da TLL no $\Delta_{tr}G$ para a conalbumina.

Termodinamicamente, $\Delta_{tr}G$ pode ser dividida em duas contribuições, uma entálpica ($\Delta_{tr}H$) e outra entrópica ($\Delta_{tr}S$). O modelo teórico desenvolvido por JOHANSSON (1998), que é baseado na teoria de Flory e Huggins, descreve as

forças motrizes que regem a partição de um soluto em SAB através de duas equações analíticas, uma relacionada à contribuição entálpica e outra à entrópica.

A entalpia de transferência ($\Delta_{tr}H$) foi obtida pela microcalorimetria de titulação isotérmica e foi utilizada para investigar a contribuição das entalpias de interações entre os diferentes componentes na transferência da proteína. Para a obtenção de $\Delta_{tr}H$ foi calculado o número de mols da proteína transferido para a fase extratora em cada injeção. E, então, foi plotado um gráfico da energia associada à transferência em relação ao número de mols particionados.

As Figuras 9 e 10 ilustram os gráficos de entalpia integral de transferência em função da quantidade de substância transferida em relação ao número de mols. Após se ajustar uma equação linear, foi obtido o coeficiente angular da reta que é o $\Delta_{tr}H$.

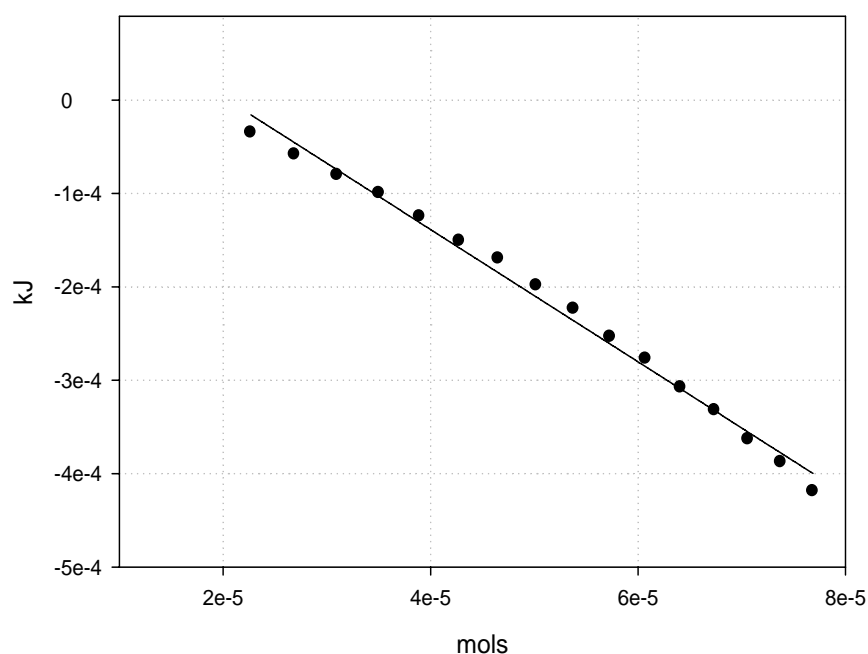


Figura 9. Gráfico de entalpia integral de transferência em função da quantidade de substância transferida em relação ao número de mols para a lisozima em SAB PEG1500-citrato de sódio.

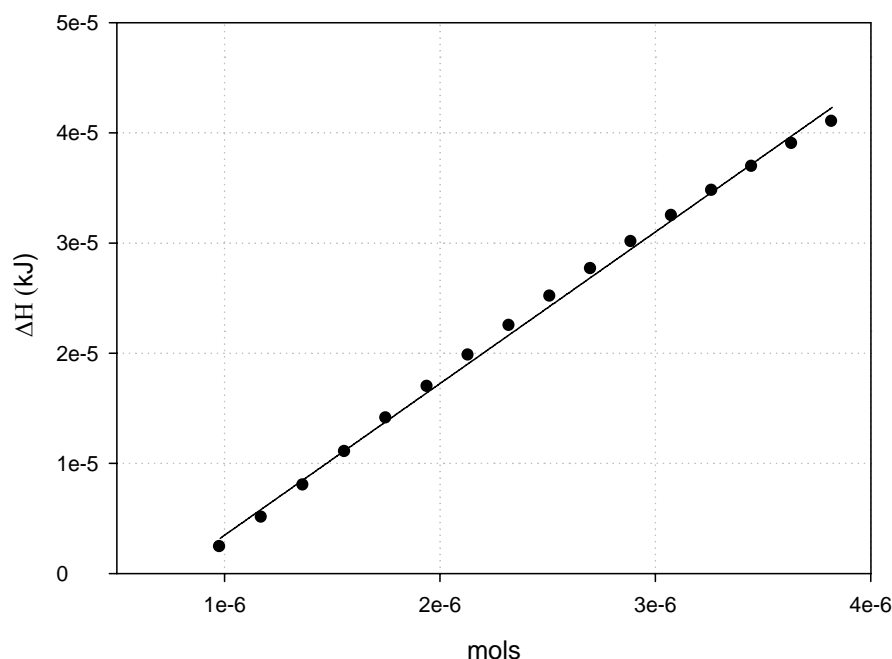


Figura 10. Gráfico de entalpia integral de transferência em função da quantidade de substância transferida em relação ao número de mols para a conalbumina em SAB PEG1500-citrato de sódio.

A partir dos valores de $\Delta_{tr}G$ e de $\Delta_{tr}H$, usando a equação da termodinâmica clássica é possível calcular a entropia de transferência.

$$\Delta_{tr}S = \frac{-(\Delta_{tr}G - \Delta_{tr}H)}{T} \quad (9)$$

No modelo de JOHANSSON (1998), a contribuição da entropia no processo de transferência de um soluto para umas das fases será descrita pela equação 10.

$$\ln K = \frac{MM_s}{\rho} \left(\frac{n^s}{V^s} - \frac{n^i}{V^i} \right) \quad (10)$$

onde K é o coeficiente de partição da proteína, MM_s a sua massa molar, ρ é a densidade numérica molecular global do sistema aquoso bifásico, n^s e V^s são o número de moléculas presentes na fase superior e o seu volume, respectivamente, n^i e V^i correspondem ao número de moléculas na fase inferior e o seu corresponde volume.

A equação 10 é aplicada quando consideramos ausentes as contribuições entálpicas na partição de um soluto. Com isso, um soluto irá se transferir

preferencialmente para uma fase se o número de moléculas por unidade de volume das fases forem diferentes. De acordo com estas condições, a partição ocorrerá para a fase que possuir a maior densidade numérica de moléculas $\left(\frac{n}{V}\right)$, a qual é determinada, principalmente, pelo número de moléculas de água em cada fase. De modo geral, a fase com a maior densidade numérica poderá acomodar o soluto de várias formas diferentes (diferentes configurações), aumentando a partição para aquela fase.

Considerando agora as contribuições entrópicas negligenciáveis, ou seja, um SAB onde as densidades numéricas das fases sejam idênticas, a contribuição da entalpia para a partição de um soluto é dada pela equação 11.

$$\ln K = -\frac{MM_s}{RT} \left[\sum_{i=1}^3 (\phi_i^S - \phi_i^I) w_{iS} - \sum_{i=1}^2 \sum_{j=2}^3 (\phi_i^S \phi_j^S - \phi_i^I \phi_j^I) w_{ij} \right] \quad (11)$$

sendo Φ_i^S e Φ_i^I as frações volumétricas do componente “*i*” na fase superior e inferior, respectivamente. Enquanto que w_{ij} ou w_{iS} são os pares potenciais efetivos, dados pela equação 12.

$$w_{ij} = z \left[\varepsilon_{ij} - \frac{1}{2} (\varepsilon_{ii} - \varepsilon_{jj}) \right] \quad (12)$$

onde w_{ij} é o par efetivo entre os componentes formadores do SAB “*i*” e “*j*”; w_{iS} é o par efetivo entre o componente “*i*” na fase superior ou inferior com o soluto “*s*”; z é o total de pares potenciais que ocorrem entre os componentes do SAB “*i*” e “*j*” ou com o soluto “*S*”; ε_{ij} , ε_{ii} e ε_{jj} são os pares potenciais. Um valor positivo de w_{ij} indica uma interação endotérmica (ou entalpicamente repulsiva) entre os componentes *i* e *j*.

A equação 10 mostra dois termos entálpicos que refletem as diferentes causas que podem promover a partição de um soluto.

O primeiro termo, $\left[\sum_{i=1}^3 (\phi_i^S - \phi_i^I) w_{iS} \right]$, refere-se à diferença de energia devida a todos os tipos de interações que ocorrem entre a proteína e os componentes presentes tanto na fase superior ou inferior. Logo, este termo reflete a tendência da proteína se transferir para a fase onde existe a maior concentração do componente com o qual tem a maior interação, ou seja, o menor valor de w_{iS} .

O segundo termo da equação, $[\sum_{i=1}^2 \sum_{j=2}^3 (\phi_i^S \phi_j^S - \phi_i^I \phi_j^I) w_{ij}]$, demonstra a diferença do conteúdo entálpico entre as fases, sendo esta energia proveniente somente das diferentes interações dos componentes formadores do sistema aquoso bifásico. O termo não expressa as interações devidas à proteína.

Desta forma, $\sum_{i=1}^2 \sum_{j=2}^3 (\phi_i^S \phi_j^S) w_{ij}$, define a auto-energia de cada fase. A dependência de K com as auto-energias das fases é relacionada ao fato de que a inserção da proteína em uma fase requer a quebra de interações entre os componentes da mesma para criar uma cavidade dentro da qual a proteína se encaixa. Se estas interações são atrativas, o rompimento das mesmas será energeticamente desfavorável. Se, contudo, as interações são repulsivas, a formação da cavidade é favorável. Conseqüentemente, a proteína irá se transferir para a fase de maior (mais positiva) auto-energia, ou seja, onde se gastará menor energia para quebrar e formar novas interações.

A partir dos cálculos das variáveis termodinâmicas de transferência pode-se explicar porque a lisozima se concentra na fase superior e a conalbumina na fase inferior.

As Tabelas 5 e 6 apresentam os valores dos parâmetros termodinâmicos associados a cada SAB estudado para a lisozima e a conalbumina, respectivamente.

Tabela 5. Parâmetros termodinâmicos para a lisozima em SAB formados por PEG 1500 e três diferentes sais a 25 °C.

SAB	TLL	$\Delta_{tr}G$ (kJ mol ⁻¹)	$\Delta_{tr}H$ (kJ mol ⁻¹)	$T\Delta_{tr}S$ (kJ mol ⁻¹)
PEG - Citrato de Sódio	28,91	-1,34	-1,31	-0,03
	39,22	-2,06	-6,90	-4,84
	42,15	-3,34	-9,16	-5,82
PEG - Sulfato de Sódio	26,79	-0,03	2,32	2,35
	29,74	-0,40	-	-
	35,12	-0,94	6,44	7,37

Tabela 6. Parâmetros termodinâmicos para a conalbumina em SAB formados por PEG 1500 e três diferentes sais a 25 °C.

SAB	TLL	$\Delta_{tr}G$ (kJ mol ⁻¹)	$\Delta_{tr}H$ (kJ mol ⁻¹)	$T\Delta_{tr}S$ (kJ mol ⁻¹)
PEG - Citrato de Sódio	28,91	2,92	-13,80	-16,72
	39,22	3,47	-46,64	-50,11
	42,15	3,87	-48,90	-52,77
PEG - Sulfato de Sódio	26,79	3,95	42,47	46,42
	29,74	4,27	80,03	75,76
	35,12	4,21	23,57	19,37

Os valores ausentes nas Tabelas 5 e 6 são devidos a resultados incoerentes ou à não reprodutibilidade dos dados encontrados.

Na Tabela 5 é possível observar que a partição da lisozima para a fase superior é um processo espontâneo ($\Delta_{tr}G < 0$). No sistema PEG-citrato, o que dirige a lisozima para a fase superior é a contribuição entálpica ($\Delta_{tr}H < 0$) que se sobrepõe à contribuição entrópica. Assim, pode-se constatar que a partição é governada por interações moleculares. É possível notar também que quando se aumenta a concentração de PEG na fase superior e, conseqüentemente, a concentração de sal na fase inferior, a entalpia se torna mais negativa, ou seja, mais favorável.

Esta entalpia favorável, de acordo com a equação 10, tem duas contribuições, uma devido à interação molecular entre a proteína e os componentes de cada fase e outra devida à auto-energia das fases. Aumentando-se a concentração de PEG, aumentam as interações intermoleculares entre a proteína e o polímero e, assim, mais energia é liberada pelo sistema. Por exemplo, no sistema PEG-citrato, a fase PEG tem maior auto-energia (menor gasto de energia para separar a ligação PEG-água do que a ligação água-sal) porque contém significativas concentrações de PEG e sal os quais se repelem entre si. Assim, com o aumento da concentração de PEG a auto-energia da fase superior também aumenta, favorecendo a partição da proteína para esta fase.

Além disto, no sistema PEG-citrato, a fase salina tem maior densidade numérica. Por isto, a partição da proteína para fase superior resulta um decréscimo da entropia. Então, para a lisozima, o efeito entálpico compensa a alta densidade numérica da fase salina, direcionando a proteína para a fase superior.

Analisando os parâmetros termodinâmicos para lisozima nos SAB contendo sulfato de sódio, constata-se que a partição é governada pela entropia.

Entretanto, esta entropia não é a entropia configuracional. Duas hipóteses podem ser discutidas para explicar porque a partição da lisozima para a fase superior em sistema PEG-sulfato de sódio foi entropicamente dirigida. A primeira é que, possivelmente, a lisozima ao migrar para a fase superior promove a liberação de moléculas de água que estavam interagindo com o PEG, o que aumenta a entropia do sistema. A segunda é que, ao migrar para a fase superior a lisozima pode estar alterando sua carga (devido à mudança de pH entre as fases) e não leva consigo os íons com os quais interagia na fase inferior, formando a dupla camada elétrica. Como os íons permanecem na fase inferior, com um maior grau de liberdade e ocorre um aumento da entropia do sistema.

A Tabela 6 apresenta os parâmetros termodinâmicos relacionados à transferência da conalbumina da fase inferior para a fase superior no sistema PEG-citrato. Conclui-se que a transferência da conalbumina para a fase inferior é espontânea e, ao se transferir para esta fase, o sistema absorve energia, realizando um processo endotérmico. Isto significa que a partição não é governada por interações intermoleculares e sim pelo número de configurações que a proteína pode assumir na fase salina, devido ao maior conteúdo de moléculas presentes nesta fase (maior entropia). A transferência da conalbumina para fase superior é entalpicamente favorável, porém a contribuição entrópica para a transferência se sobrepõe à entálpica.

De acordo com a equação 9, a proteína irá particionar para a fase com maior densidade numérica (fase salina). Este fato provém de que a entropia aumenta proporcionalmente ao número de configurações distintas que a proteína poderá assumir na fase. Além disto, esta força entrópica aumenta linearmente com o tamanho do soluto e, como a conalbumina é uma proteína de alto peso molecular (77700 g.mol^{-1}) torna-se mais entropicamente favorável a sua concentração na fase salina (JOHANSSON et al., 1998). Outro fato a ser discutido é que, com o aumento da TLL, ocorre um incremento na diferença de concentração de água entre as fases, tornando mais entropicamente favorável a partição da conalbumina para a fase inferior.

Em relação ao sulfato de sódio, a Tabela 4 indica que a partição da conalbumina para fase inferior é governada pela entalpia, que é favorável à transferência da proteína para fase inferior. Esta maior contribuição entálpica pode

ser devida ao aumento das interações moleculares entre a conalbumina e o sulfato de sódio na fase inferior.

5. CONCLUSÃO

A lisozima e a conalbumina são proteínas da clara do ovo com grandes potenciais tecnológicos. Os sistemas aquosos bifásicos (SAB) podem ser utilizados para separação destas proteínas, uma vez que os resultados obtidos neste trabalho mostraram que a lisozima tende a se concentrar na fase superior e a conalbumina na fase inferior em todos os SAB avaliados. Assim, foram avaliadas as influências do tipo de sal e da concentração de PEG na partição das proteínas em SAB. Os maiores índices de recuperação da lisozima na fase superior e da conalbumina na fase inferior foram encontrados nos sistemas PEG-citrato e PEG-sulfato, podendo os mesmos serem usados para separação destas proteínas da fração da clara obtida por ALE.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, J. G. L. F. **Estudo do equilíbrio líquido-líquido, da partição de insulina e da pré-purificação da proteína de fusão precursora da insulina humana em Sistemas Aquosos Bifásicos do tipo PEG/Sal.** Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, SP, 2003.

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

ANSELMO, A. G. **Termodinâmica da partição do poli (óxido de propileno) em sistemas bifásicos aquosos/orgânicos.** Dissertação de Mestrado. Departamento de Físico-Química, UNICAMP, Campinas, SP, 2006.

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

BABU, B. R., RASTOGI, N. K. and RAGHAVARAO K. S. M. S. Liquid-liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase system. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 47 (1), p. 83-89, 2008.

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

BLÁZQUEZ, G.; CAMACHO, F.; GONZÁLEZ-TELLO, P and ALARCÓN, F. J. Partition coefficients of α -amylase in aqueous two-phase systems PEG+MgSO₄.7H₂O+H₂O at 298K. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1379, p. 191–197, 1998.

BROOKS D. E., SHARP K. A. and FISHER D. **Theoretical Aspects of Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems. IN: Protein Purification Process Engineering** Ed. KUBEK, D. J., HARRISON, R. G. (Ed.), p. 89-114, 1994.

CARVALHO, C. **Estudo de Equilíbrio de Fases para Sistemas Aquosos Bifásicos Compostos por Polietileno Glicol, Sais e Água**. Dissertação de Mestrado, Departamento de Tecnologia de Alimentos, UFV, Viçosa, 2004.

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

COIMBRA, J. D.; THOMMES, J.; MEIRELLES, A. J. and KULA, M. R. Performance of a Graesser contactor in the continuous extraction of whey proteins: Mixing, mass transfer and efficiency. **Bioseparation**. v. 5 p. 259-268, 1995.

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

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

DA SILVA, L. H. M.; LOH, W. Calorimetric investigation of the formation of aqueous twophase systems in ternary mixtures of water, poly(ethylene oxide) and electrolytes (or dextran). **J. Phys. Chem. B**, v. 104, p. 10069-10073, 2000.

DA SILVA, L. H. M.; DA SILVA, M. C. H.; AQUINO, R. A. N.; FRANCISCO, K. R.; CARDOSO, M. V. C.; MINIM, L. A. and COIMBRA, J. S. R. Nitroprusside-PEO enthalpic interaction as a driving force for partitioning of the [Fe(CN)₅NO]₂⁻ anion in aqueous two-phase systems formed by poly(ethylene oxide) and sulfate salts. **J. Phys. Chem. B**, v. 110, p. 23540-23546, 2006.

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

FARRUGGIA, B.; RIGATUSO, R.; CAPEZIO, L.; DIEZ, V. and PICÓ, G. Influence of high concentration monovalent cations on the protein partitioning in polyethyleneglycol 1500-phosphate aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**, v. 809, p.301–306, 2004.

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

GIRALDO ZUÑIGA A.D. **Sistemas Aquosos Polietileno glicol-Sal: Separação de α -lactoglobulina e β -lactoglobulina do Soro de Queijo e Hidrodinâmica em um Extrator Graesser**. Dissertação Mestrado, Departamento de Tecnologia de Alimentos, UFV, Viçosa, 2000.

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

GUSTAFSSON, A.; WENNERSTRUM, H. and TJERNELD, F. Aqueous polymer two-phase systems in biotechnology. **Fluid Phase Equilibria**, v. 29, p. 365-371, 1986.

HATTI-KAUL, R. Aqueous Two-Phase Systems: A General Overview. **Molecular Biotechnology**, v. 19, p. 269-277, 2001.

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

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

JOHANSSON, H. O.; LUNDH, G.; KARLSTROM, G. AND TJERNELD, F. Effects of ions on partitioning of serum albumin and lysozyme in aqueous two-phase systems containing ethylene oxide/propylene oxide co-polymers. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1290, p. 289-298, 1996.

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

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

OLIVEIRA, G. G. G.; SILVA, D. P.; ROBERTO, I. C.; VITOLO, M.; PESSOA-JUNIOR, A. Partition behavior and partial purification of hexokinase in aqueous two-phase polyethylene glycol/citrate systems. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 105-108, p. 787-797, 2003.

OLIVEIRA, L. A.; SARUBBO, L. A.; PORTO, A. L. F.; LIMA-FILHO, J. L.; CAMPOSTAKAKI, G. M.; TAMBOURGI, E. B. Physical and rheological characterization of polyethylene glycol-cashew-nut tree gum aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**. v. 766, p. 27-36, 2001.

OLIVEIRA, R. M. **Equilíbrio de fases de sistemas aquosos bifásicos compostos por polietilenoglicol, sulfato de zinco, sulfato de cobre e citrato de sódio sob diferentes temperaturas**. Dissertação de Mestrado, UFV; Viçosa; 2006.

PENG, Q.; LI, Z. and LI, Y. Experiments, correlation and prediction of protein partition coefficient in aqueous two-phase systems containing PEG and K_2HPO_4 - KH_2PO_4 . **Fluid Phase Equilibria**. v. 107, p. 303-315, 1995.

PESSOA, J. e KILIKIAN, B. V. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**. Manole, Barueri, SP, 2005.

PICÓ, G.; BASSANI, G.; FARRUGGIA, B. and NERLI, B. Calorimetric investigation of the protein-flexible chain polymer interactions and its relationship with protein partition in aqueous two-phase systems. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 40, p. 268-275, 2007.

RODRIGUES, L. R. M. **Valorização da Fração Proteica do Soro de Queijo**. Dissertação de Mestrado. Escola de Engenharia, Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, 2001.

ROJAS, E. E. G.; COIMBRA, J. S. R.; MINIM, L. A.; SARAIVA, S. H. and SILVA, C. A. S. Hydrophobic interaction adsorption of hen egg white proteins albumin, conalbumin, and lysozyme. **Journal of Chromatography B**, v. 840, p. 85-93, 2006.

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

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

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

SHIBUSAWA, Y.; KIHARA, S. and ITO, Y. One-step purification of proteins from chicken egg-white using counter-current chromatography. **Journal Chromatography B**, v. 709, p. 301–315, 1998.

SIGMA-ALDRICH; Catálogo 2001.

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

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

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

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

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

CAPÍTULO 4 - SOLUBILIDADE DAS PROTEÍNAS DA CLARA DO OVO: OVALBUMINA, CONALBUMINA E LISOZIMA

RESUMO

Neste trabalho foram avaliados os dados de solubilidade das proteínas da clara do ovo (lisozima, conalbumina e ovalbumina) em diferentes valores de pH e concentração salina (0,4; 0,5; 0,6; 0,7 e 0,8) mol L⁻¹, para dois tipos de sais (citrato de sódio e sulfato de sódio) a temperatura ambiente (25 ± 2) °C. A solubilidade das proteínas variou com a concentração de sal e o pH da solução. De modo geral, para as três proteínas em estudo os valores de solubilidade diminuíram com o aumento da concentração salina. O modelo polinomial (4^a ordem) empregado na correlação dos dados para a ovalbumina e conalbumina apresentou valores de R² >0,90 mostrando bom ajuste do modelo aos dados experimentais nas condições estudadas. Entretanto, para a lisozima, um modelo de regressão de 2^a ordem (R²>0,94) se ajustou bem aos dados experimentais.

1. INTRODUÇÃO

A clara do ovo é um ingrediente essencial, que tem sido usado por muitos anos na indústria de alimentos devido às suas excelentes propriedades tecnológicas. As proteínas da clara do ovo são de elevado valor nutricional e biológico (STADELMAN e COTTERILL, 1995). Devido às suas propriedades funcionais únicas, tais como gelatinização e formação de espuma, as proteínas da clara têm sido extensivamente usadas como ingredientes em alimentos processados, tais como nos produtos de padaria, merengues, biscoitos e derivados de carne (WONG et al., 1996; GUÉRIN-DUBIARD et al., 2005; ROJAS, 2006).

Entre as propriedades funcionais das proteínas, a solubilidade é empregada como um parâmetro para as possíveis aplicações dos ingredientes protéicos em diferentes condições de processamento sendo, então um pré-requisito crítico para uso da proteína em bebidas, alimentos fluidos, emulsões e formação de espuma (KINSELLA, 1982).

Assim o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do pH, da concentração de sal (0,4; 0,5; 0,6; 0,7 e 0,8) mol L⁻¹ e do tipo de sal (citrato de

sódio e sulfato de sódio) na solubilidade das proteínas da clara do ovo (ovalbumina, conalbumina e lisozima). Correlações polinomiais empíricas foram empregadas para modelar os dados nas condições estudadas.

2. REVISAO DE LITERATURA

2.1. Proteínas da Clara do ovo

A clara do ovo é um ingrediente de grande relevância industrial devido à sua complexa mistura de proteínas. As proteínas da clara conferem aos produtos alimentícios uma alta qualidade nutricional e múltiplas propriedades funcionais. Estas proteínas têm valores biológicos tão altos que são utilizadas como padrões para medida da qualidade nutricional de outras proteínas. Entre suas propriedades funcionais destacam-se gelificação, emulsificação, formação de espuma, modificação de textura, entre outras. Três proteínas da clara de particular importância funcional são ovalbumina, conalbumina ou ovotransferrina e lisozima (ROJAS et al., 2006).

A ovalbumina compreende em torno de 54 % do total de proteínas e apresenta propriedades de coagulação e gelificação (VACCHIER et al., 1995; AWADE et al., 1994). A ovotransferrina (conalbumina) representa em torno de 13 % do total de proteínas da clara e tem atuação no transporte do ferro além de ampla atividade antimicrobiana. A lisozima (3,5 % do total de proteínas da clara) tem propriedades antibactericidas sendo usada na preservação de alimentos e na indústria farmacêutica (FENNEMA, 1993; SIM, 1994; ALLEONI e ANTUNES, 2004; GUÉRIN-DUBIARD et al., 2005).

2.2. Solubilidade Protéica

A solubilidade de uma proteína é, termodinamicamente, a atividade da proteína no solvente em um sistema simples ou de duas fases em estado de equilíbrio (VOJDANI, 1996). Matematicamente, o grau de solubilidade de uma proteína é a quantidade de proteína presente na fase líquida em relação à quantidade total de proteína nas fases sólida e líquida em equilíbrio. Tecnicamente, a solubilidade da proteína é um parâmetro operacional

determinado pela retenção da proteína no sobrenadante após centrifugação da solução por um dado tempo e sob determinada força centrífuga (MORRISEY et al., 1982).

A importância primária da solubilidade protéica é devida à sua influência nas outras propriedades funcionais das proteínas. Ou seja, o fator primordial para que as proteínas exibam características gelatinizantes, espumantes e emulsificantes é que tais proteínas sejam solúveis (NAKAI e CHAN, 1985; PELEGRINE e GASPARETTO, 2005). Além disso, a precipitação de proteínas induzida por sais em soluções aquosas é geralmente um primeiro estágio para posterior purificação da proteína por métodos tais como cromatografia ou eletroforese. Os dados de solubilidade são empregados na determinação das condições ótimas de extração e purificação de proteínas (FENNEMA, 1993). O entendimento das forças intermoleculares entre moléculas de proteínas é também vital para a ciência e tecnologia de cristalização de proteínas (FORSYTHE et al., 1999; GRIGSBY et al., 2000). Daí a importância de um estudo detalhado da solubilidade das proteínas presentes na clara do ovo.

A solubilidade das proteínas se relaciona com interações hidrofóbicas de superfície (proteína-proteína) e interações hidrofílicas (proteína-água). A proporção relativa de superfície hidrofóbica e grupos hidrofílicos determina o grau de solvatação de uma proteína. A solubilidade da proteína pode ser aumentada pelo incremento do número de grupos hidrofílicos presentes, o que poderia ser obtido por desaminação ou pela ligação covalente de resíduos de aminoácidos hidrofílicos, glicogrupos ou grupos fosfato (CHOBERT et al., 1987).

Muitos pesquisadores têm tentado aumentar a solubilidade das proteínas por diferentes técnicas para melhorar as propriedades funcionais. Alguns concentrados de proteínas são naturalmente insolúveis ou parcialmente insolúveis por tratamentos os quais desnaturam proteínas. Outros concentrados de proteínas tendem a ser insolúveis em pHs ácidos ou próximos ao ponto isoelétrico e requerem condições de pH mais altas para sua solubilização. Suplementação de bebidas levemente acidificadas ou sucos cítricos com proteínas, por exemplo, requerem a solubilização das proteínas em valores de pH ácidos. Tais aplicações requerem teste de solubilidade como um teste primário. Contudo, a falta de testes de solubilidade de proteína padrão bem como outras funcionalidades de proteínas

torna difícil correlacionar os resultados de diferentes estudos (MORR e HA, 1993; VOJDANI, 1996).

KAKALIS e REGENSTEIN (1985) e MACHADO et al. (2007) estudaram a solubilidade das proteínas da clara do ovo desidratada em função do pH, da concentração salina e do tipo de sal. PELEGRINE e GASPARETTO (2005) analisaram a influência da temperatura e do pH na solubilidade das proteínas da clara do ovo. Porém estes estudos não foram realizados com proteínas puras. HEGG e LOFQUIST (1979) estudaram o efeito do pH e de sais neutros no grau de agregação térmica da ovalbumina na presença de SDS, enquanto HEGG et al. (1978, 1979) avaliaram o comportamento de agregação térmica e desnaturação para ovalbumina, conalbumina e lisozima. Em 1982, este mesmo autor estudou a qualidade de agregados termicamente induzidos de conalbumina e lisozima em várias concentrações de sal e valores de pH. JUDGE et al. (1996) determinaram dados de solubilidade para a ovalbumina em soluções de sulfato de amônio em função do pH. ATAKA e TANAKA (1986) determinaram curvas de solubilidade de lisozima em diferentes valores de pH, concentrações de sal e de proteína. RIES-KAUTT e DUCRUIX (1989) e BÉNAS et al. (2002) estudaram a efetividade relativa de vários íons na solubilidade de lisozima. FORSYTHE et al. (1999) estudaram a solubilidade da lisozima cristalizada em sua forma tetragonal em soluções de cloreto de sódio com variação da temperatura.

2.2.1. Fatores que Influenciam a Solubilidade da Proteína

Vários fatores influenciam na solubilidade das proteínas, tais como, a composição dos aminoácidos, o estado das proteínas (natural ou desnaturado) e fatores do meio como pH, força iônica, temperatura, composição do solvente e outros componentes do alimento (VOJDANI, 1961; WONG, 1995).

2.2.1.1. pH da Solução

A solubilidade das proteínas é influenciada pelo pH da solução devido a que este afeta a distribuição das cargas líquidas na superfície da proteína. Geralmente, as proteínas são mais solúveis em valores de pH baixos (ácidos) e altos (básicos) porque o excesso de cargas do mesmo sinal produz repulsão entre

as mesmas moléculas aumentando a interação água-proteína, porém aumenta a solubilidade (FENNEMA, 1993).

De acordo com as observações de vários autores (KAKALIS e REGENSTEIN, 1986; WIT, 1989; VOJDANI, 1996; WONG et al., 1996), as proteínas apresentam uma menor solubilidade no seu ponto isoelétrico (pI) onde, em sistema aquoso, apresenta carga líquida igual a zero. As interações proteína-proteína aumentam porque as forças eletrostáticas das moléculas são mínimas e há menor interação da água com as moléculas da proteína. A precipitação das proteínas não ocorre, necessariamente, no pI, sendo dependente também de outras perturbações nas propriedades do solvente, como a adição de um sal.

Em pHs extremos, ácidos ou básicos, a proteína deve desdobrar-se expondo mais grupos hidrofóbicos. Devido ao decréscimo nas ligações eletrostáticas ocorre a desnaturação das proteínas seguida por agregação e precipitação (VOJDANI, 1996).

2.2.1.2. Força Iônica

Os sais podem também afetar as interações eletrostáticas entre as macromoléculas, contribuído pela força iônica (FENNEMA, 1993). No entanto isto vai depender da concentração e tipo de sal presente no meio. KINSELLA (1982) mostrou que uma concentração de NaCl de 0,15 mol/L é suficiente para causar mudanças na estrutura da água e na conformação das proteínas.

Para globulinas e algumas albuminas, a solubilidade aumenta com o aumento da concentração de sais neutros até uma concentração máxima a partir da qual a solubilidade diminui. Neste ponto há uma competição entre proteína e íons salinos pela água. Sais neutros em uma concentração de 0,1 a 1,0 mol L⁻¹ podem aumentar a solubilidade das proteínas dependendo da proteína, sal, pH e temperatura. Os íons salinos interagem com grupos de cargas opostas na proteína para formar uma dupla camada de grupos iônicos o que diminui as interações eletrostáticas entre as moléculas causando maior solvatação das proteínas e então, aumentando a solubilidade. O efeito de salting-out é dependente da natureza dos íons e segue a série de Hofmeister. Para ânions esta série é: SO₄²⁻ > HPO₄²⁻ > CH₃COO⁻ > Cl⁻ > Br⁻ > I⁻ > SCN⁻ e para cátions é dada por: NH₄⁺ > K⁺ > Na⁺ > Li⁺ > Mg⁺² > Ca⁺² > Ba⁺² (VOJDANI, 1996).

Em concentrações maiores que 1 mol/L, os íons à esquerda da série diminuem a solubilidade das proteínas (salting-out) aumentando as interações hidrofóbicas e a agregação e competindo com a proteína pela água. Em altas concentrações de íons salinos, a maior parte das moléculas de água está fortemente ligada aos íons salinos, enquanto há alguma reorganização das moléculas de água ao redor da molécula de proteína. Isto poderia resultar em interação proteína-proteína (principalmente via interação por superfície hidrofóbica) mais forte que a interação proteína-água, resultando em associação seguida de precipitação (VOJDANI, 1996).

A força iônica da solução pode ser calculada por:

$$\mu = \frac{1}{2} \sum C_i Z_i^2 \quad (1)$$

onde μ é a força iônica, C é a concentração dos íons, Z é a valência dos íons e o subscrito i se refere a cada tipo de íon presente na solução.

Durante salting-out, a solubilidade da proteína afetada é dada como se segue:

$$\log S = -K\mu + \log S_0 \quad (2)$$

onde S é a solubilidade em g L⁻¹ de solução, μ é a força iônica em mol/L de solução, S_0 é a solubilidade em força iônica igual a zero e K é a constante de salting-out, a qual depende da proteína, pH, temperatura e, particularmente, da natureza específica do sal. K é a inclinação da curva de $\log S$ x μ , extrapolada para o zero de força iônica dado por $\log S_0$ (VOJDANI, 1996).

Sais comumente usados para precipitação de proteínas são: sulfato de amônio, cloreto de sódio, fosfato de potássio, cloreto de magnésio e sais citrato (OLLIS e WHITE, 1990).

2.2.1.3. Presença de Outros Componentes

Outros componentes na solução tais como certos íons ou solventes orgânicos imiscíveis, podem afetar o comportamento de solubilidade das proteínas. Íons metálicos como Zn⁺², Cd⁺² e Ba⁺² podem precipitar proteínas dependendo do pH, força iônica ou temperatura. Solventes orgânicos imiscíveis em água como acetona, etanol e metanol desnaturam proteínas em altas temperaturas. Entretanto,

eles podem ser usados a 0-5/C para manter o estado nativo das proteínas. O polietilenoglicol (PEG) também pode diminuir a solubilidade das proteínas. Este componente é usado para precipitação e produção de cristais de proteínas, afetando a solubilidade das proteínas por mudança nas propriedades dielétricas da solução e por competição pela água (OLLIS e WHITE, 1990). Agentes ativos de superfície como dodecilsulfato de sódio (SDS) são agentes fortemente desnaturantes e solubilizam a proteína por enovelamento da estrutura nativa e ligação com regiões hidrofóbicas das proteínas desnaturadas (VOJDANI, 1996).

2.2.1.4. Concentração de Proteínas

A solubilidade é também uma função da concentração da proteína. Usualmente nos testes de solubilidade, a concentração da proteína precisa estar na faixa de 1-20 mg de proteína/mL. A agregação das proteínas aumenta em altas concentrações (HARRIS e ANGAL, 1990).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Ovalbumina (9006-59-1/A-5503), conalbumina (CAS 1391-06-6) e lisozima (EC 3.2.1.17) foram adquiridas da Sigma (St. Louis, MO, USA). Citrato de sódio e sulfato de sódio foram adquiridos da Cromoline (Brasil). Todos os reagentes usados foram de grau analítico e a água foi deionizada usando um aparelho Milli-Q (0,22 μm , Millipore Inc., USA).

3.2. Determinação da Solubilidade

Os dados de solubilidade foram obtidos segundo a metodologia proposta por ANTON e GANDEMER (1997). O sal avaliado (citrato de sódio ou sulfato de sódio) foi dissolvido na solução tampão, nas concentrações pré-definidas (0,4; 0,5; 0,6; 0,7 e 0,8 mol L⁻¹). Posteriormente, foram pesadas 15 mg de proteína (lisozima ou ovalbumina) nos tubos de centrífuga ou 8 mg (quando no caso da conalbumina) e, então, adicionados aos tubos 20 mL da solução tampão contendo

o sal. Os valores de pHs avaliados para cada proteína foram: ovalbumina (3,0; 4,5; 6,0; 7,0 e 8,0); conalbumina (3,0; 5,0; 6,0; 7,0 e 9,0) e lisozima (3,0; 6,0; 8,0; 10,0 e 12,0).

A mistura foi agitada por 2 h, a temperatura ambiente (25 ± 2) °C, utilizando-se um agitador proposto por FERREIRA (2001) e logo centrifugada a 9000 rpm por 20 min a 4 °C (Beckman, J2MC, USA) . Após centrifugação, recolheu-se o sobrenadante para análises. Os tampões utilizados foram glicina-HCl (pH 3,0), acetato (pH 4,5), citrato de sódio (pH 5,0), fosfato (pH 6,0 e 7,0 e 8,0), glicina-NaOH (pH 9,0) e carbonato (pH 10,0 e 12,0) (MOHAN, 1995). A solubilidade (S , g/100g) foi definida como quantidade de proteína no sobrenadante (g)/100 g de sobrenadante e calculada pela fórmula:

$$S = \frac{M.P}{M.S} * 100 \quad (3)$$

onde $M.P$ é a massa de proteína no sobrenadante (g) e $M.S$ é a massa de sobrenadante (g).

Os experimentos foram realizados com duas repetições sendo o conteúdo de proteína solúvel resultante da média dos dois valores.

3.3. Análises das Proteínas

As concentrações de proteína foram determinadas por leitura da absorbância a 280 nm empregando o espectrofotômetro Cary 50 (Varian, Austrália). As curvas analíticas foram construídas com as proteínas puras adquiridas da Sigma Chemicals (St. Louis, USA), em soluções de concentrações crescentes (0,1 a 1,0) mg mL⁻¹.

3.4. Análise Estatística

Os dados experimentais foram analisados usando o pacote estatístico SAS® versão 9.0, procedimento REG (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). A confiabilidade da equação do modelo polinomial obtido foi avaliada utilizando o coeficiente de determinação R^2 , o resultado das análises de variância (ANOVA) e o nível de significância estatístico pelo teste de Fisher (F). Os coeficientes do

modelo foram analisados empregando o procedimento BACKWARD (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) e o nível de significância dos coeficientes da regressão foi obtido pelo teste de Student (*t*).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Efeitos do pH e da Concentração Salina na Solubilidade das Proteínas da Clara

Os maiores valores de solubilidade foram encontrados no intervalo de pH 6,0 a 8,0 para as três proteínas. O pH da clara no ovo fresco é de 7,6 a 7,9, aumentando para até 9,7, durante o armazenamento de acordo com a temperatura e a difusão do CO₂ através da casca (BELITZ E GROSCH, 1988). MORR e HA et al. (1985) avaliaram a solubilidade das proteínas da clara em pH 3,0 e em pH 7,0, encontrando os maiores valores para o pH 7,0. MACHADO, et al. (2007) encontraram que a solubilidade das proteínas da clara *in natura* aumentou com o pH, apresentando maiores valores em pH 9,0 e os menores em pHs 3,0 e 4,6. A menor solubilidade foi observada ao redor do pH 4,5 que é o pI da ovalbumina, a qual é a proteína de maior porcentagem na clara (54 %).

Em todos os valores de pH estudados foi verificada uma redução da solubilidade com o aumento da concentração de sal para as três proteínas. Comportamento semelhante foi verificado por KAKALIS e REGENSTEIN (1986) em baixos valores de pH, ao avaliarem a influência da concentração do sal e pH na solubilidade das proteínas da clara do ovo. Tal comportamento pode ser provavelmente devido a que um baixo valor de pH, associado a uma concentração de sal crescente, aumenta a quantidade de interações hidrofóbicas (proteína-proteína), com conseqüente agregação das moléculas devido à competição com a proteína pelas moléculas de água, causando, então, a precipitação da proteína e reduzindo assim sua solubilidade na água (PHARMACIA, 1993; FENNEMA, 1993; KIOSSEGLOU, 1989).

Os valores de solubilidade da ovalbumina em citrato de sódio são apresentados na Figura 1 e na Tabela 1.

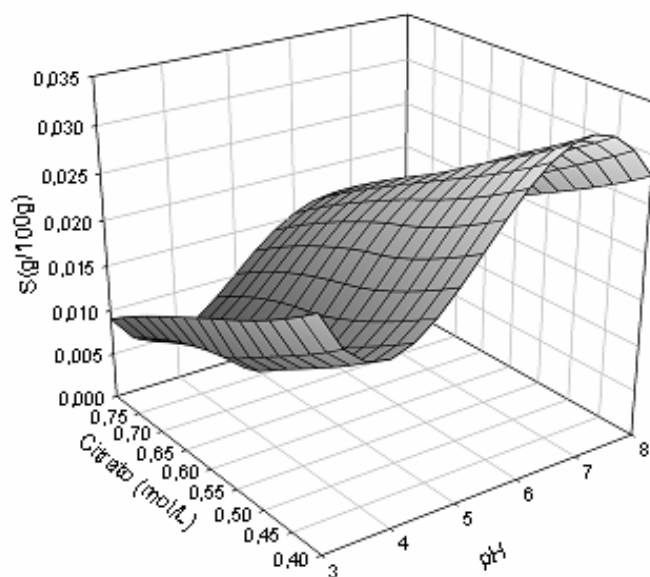


Figura 1. Solubilidade da ovalbumina em citrato de sódio em função do pH e da concentração salina.

Tabela 1. Solubilidade (g proteína/100g sobrenadante) da ovalbumina em função do pH e da concentração salina.

Citrato de sódio (mol/L)	pH				
	3,0	4,5	6,0	7,0	8,0
0,4	0,026	0,014	0,035	0,030	0,029
0,5	0,020	0,012	0,033	0,023	0,026
0,6	0,017	0,011	0,027	0,020	0,0212
0,7	0,013	0,009	0,024	0,015	0,017
0,8	0,008	0,007	0,021	0,012	0,008

Os valores mínimos foram encontrados em pH 4,5, que é o seu pI (STADELMAN e COTTERILL, 1995; AWADÉ e EFSTATHIOU, 1999). Nesta condição, as interações proteína-proteína aumentam porque as forças eletrostáticas das moléculas são menores e uma menor quantidade de água interage com as moléculas de proteína. JUDGE et al. (1996) estudaram a solubilidade da ovalbumina em soluções de sulfato de amônio na faixa de pH de 4,58 a 5,4 e encontram também a menor solubilidade em pH 4,5. Neste estudo, a solubilidade também diminuiu com o aumento da concentração salina.

Nas Figuras 2 e 3 são apresentadas as curvas de solubilidade para a conalbumina em citrato e em sulfato, respectivamente.

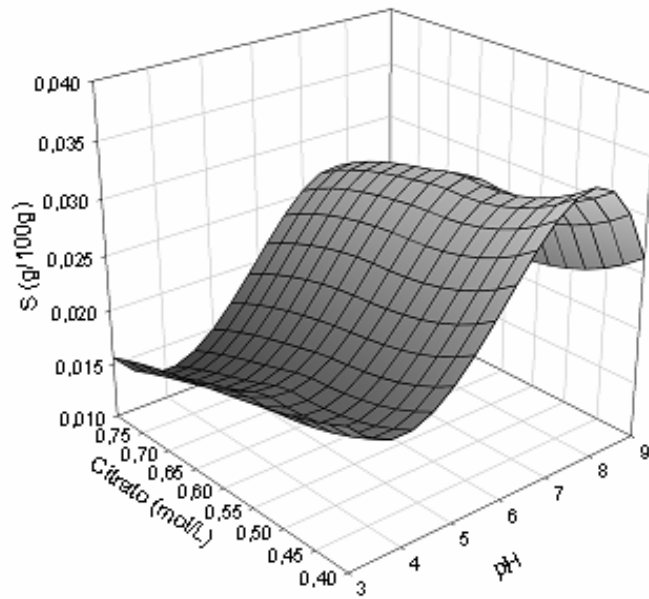


Figura 2. Solubilidade da conalbumina em citrato de sódio em função do pH e da concentração salina.

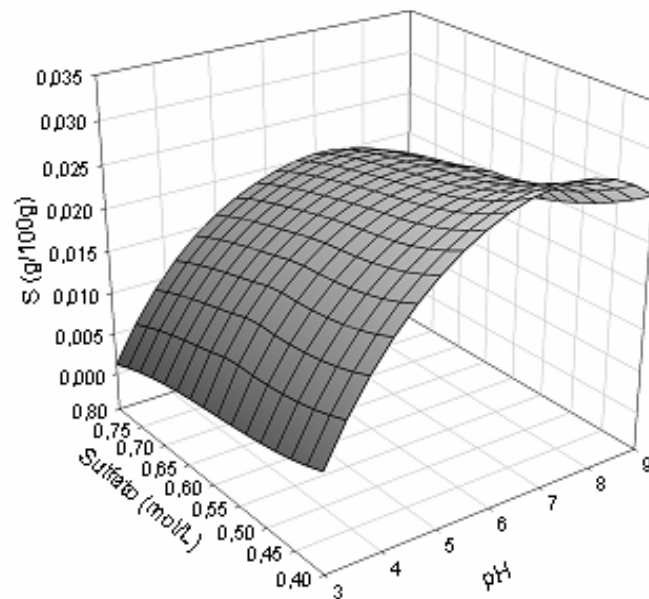


Figura 3. Solubilidade da conalbumina em sulfato de sódio em função do pH e da concentração salina.

Os dados de solubilidade para a conalbumina são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2. Solubilidade (g proteína/100g sobrenadante) da conalbumina em função do pH, do tipo de sal e da concentração salina.

	pH				
	3,0	5,0	6,0	7,0	9,0
Citrato de sódio (mol/L)					
0,4	0,022	0,025	0,021	0,036	0,028
0,5	0,022	0,023	0,019	0,031	0,022
0,6	0,018	0,022	0,017	0,032	0,021
0,7	0,016	0,020	0,017	0,032	0,019
0,8	0,017	0,016	0,017	0,026	0,019
Sulfato de sódio (mol/L)					
0,4	0,006	0,025	0,022	0,032	0,028
0,5	0,004	0,025	0,020	0,028	0,019
0,6	0,004	0,021	0,018	0,027	0,017
0,7	0,003	0,022	0,018	0,024	0,017
0,8	0,003	0,015	0,018	0,021	0,017

Para o sulfato de sódio, foi observado que a solubilidade aumentou com o aumento do pH. De acordo com FENNEMA (1993), em valores de pHs alcalinos as moléculas apresentam cargas negativas em sua superfície, aumentando a repulsão entre elas e aumentando as interações proteína-água. Em pH 3,0 foram observados baixos valores de solubilidade. Em valores de pH extremos (ácidos ou básicos) a proteína pode desnaturar-se expondo mais grupos hidrofóbicos devido a um decréscimo nas ligações eletrostáticas. Assim, as moléculas de proteína se agregam com conseqüente precipitação.

Verificou-se também que em pH 6,0 a conalbumina apresentou baixos valores de solubilidade para os dois sais avaliados. Este valor de pH é referido em literatura como o pI desta proteína (STADELMAN e COTTERILL, 1995).

As Figuras 4 e 5 representam as curvas de solubilidade da lisozima. Na Tabela 3 são apresentados os valores de solubilidade para os dois sais estudados. Os menores valores de solubilidade são encontrados em torno do pH 12,0. LI-CHAN e NAKAI (1989) e STADELMAN e COTTERILL (1995) citam que o pI da lisozima é em torno de 10,7. FORSYTHE et al. (1999) estudou a solubilidade da lisozima cristalizada em sua forma tetragonal em soluções de cloreto de sódio. A autora observou um decréscimo na solubilidade com o aumento da concentração de sal.

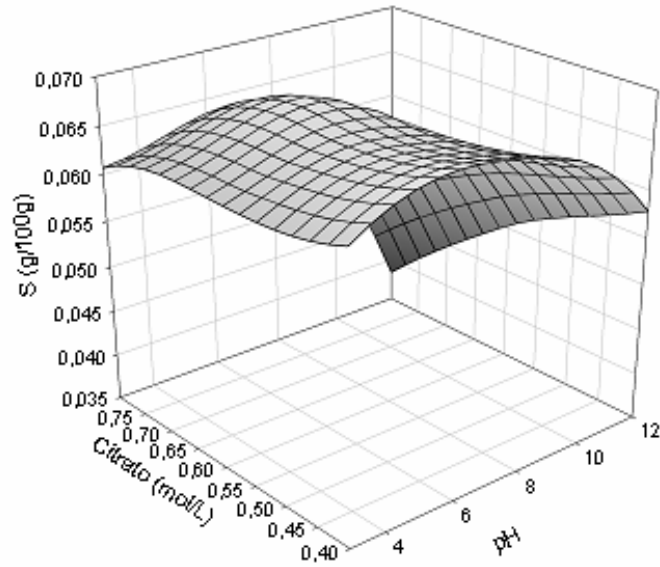


Figura 4. Solubilidade da lisozima em citrato de sódio em função do pH e da concentração salina.

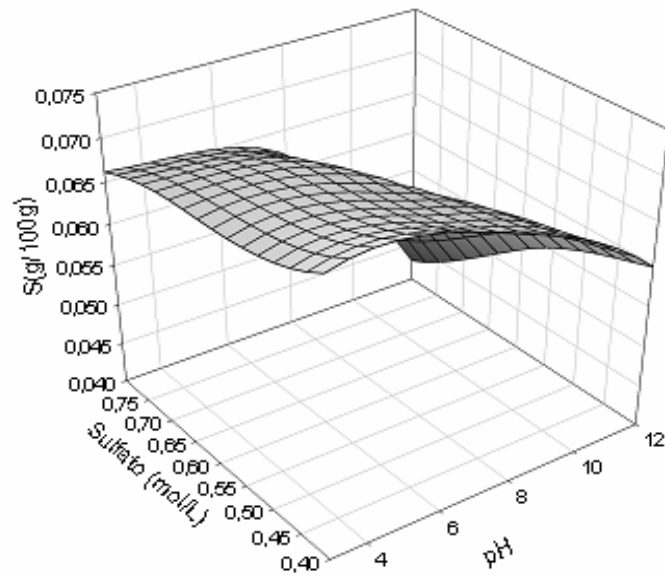


Figura 5. Solubilidade da lisozima em sulfato de sódio em função do pH e da concentração salina.

Tabela 3. Solubilidade (g proteína/100g sobrenadante) da lisozima em função do pH, do tipo de sal e da concentração salina.

	pH				
	3,0	7,0	8,0	10,0	12,0
Citrato de sódio (mol/L)					
0,4	0,064	0,067	0,067	0,062	0,064
0,5	0,0640	0,065	0,065	0,061	0,059
0,6	0,063	0,066	0,066	0,060	0,054
0,7	0,062	0,066	0,067	0,058	0,039
0,8	0,062	0,066	0,065	0,054	0,028
Sulfato de sódio (mol/L)					
0,4	0,072	0,073	0,067	0,066	0,062
0,5	0,068	0,068	0,066	0,061	0,060
0,6	0,069	0,068	0,066	0,061	0,059
0,7	0,067	0,067	0,064	0,059	0,040
0,8	0,067	0,067	0,063	0,054	0,035

Em relação ao tipo de sal, foi observado que a lisozima apresentou maiores valores de solubilidade em presença de sulfato de sódio. De acordo com LEÓN (2004), o citrato de sódio apresenta um maior efeito salting-out em relação ao sulfato de sódio. Segundo estes autores, os íons citrato diminuem a solubilidade da proteína por aumentarem as interações hidrofóbicas e a agregação entre as moléculas devido a uma competição dos íons salinos pela água. Em altas concentrações dos íons salinos, a maior parte das moléculas de água está fortemente ligada à aos íons salinos, enquanto há alguma reorganização das moléculas de água em torno das moléculas de proteína. Isto poderia resultar em uma interação proteína-proteína (principalmente via interação hidrofóbica) maior que a interação proteína-água, o que resulta em associação, seguida de precipitação.

4.2. Análise Estatística

Um modelo polinomial de 4ª ordem foi usado para ajuste dos dados de solubilidade de ovalbumina em citrato de sódio e conalbumina em citrato de sódio e sulfato de sódio.

$$S = a + bpH + cCs + dpHCs + epH^2 + fpH^2Cs + gpH^3 + hpH^4 \quad (4)$$

onde C_s é a concentração de sal (mol.L^{-1}) e $a-h$ são os parâmetros da regressão ajustada.

Entretanto os dados de solubilidade da lisozima para os dois sais avaliados se ajustaram a um modelo de 2ª ordem:

$$S = a + bpH + cC_s + dpHC_s + epH^2 + fpH^2C_s \quad (5)$$

O resultado da análise de variância da regressão indica que o modelo de quarta ordem ajustado é significativo ao nível de 0,05 de probabilidade [($p_{\text{modelo}} > F$)=0,0001].

Nas Tabelas 4, 5 e 6 são apresentadas as estimativas de cada parâmetro dos modelos ajustados para cada proteína. Pode-se observar que todos os parâmetros são significativos a um nível de 0.05 em todos os casos estudados. Segundo BOX et al. (1978), altos valores de t e baixos de Pr levam a uma significância maior dos parâmetros estudados.

Tabela 4. Coeficientes do modelo de 4ª. ordem ajustado aos dados de solubilidade da ovalbumina em citrato de sódio em função do pH e da concentração salina.

Parâmetro*	a	b	c	d	e	f	g	h	R ²
Valor	1,1677	-0,8933	-0,1136	0,0349	0,2509	-0,0035	-0,030	-0,001	0,92

* $p < 0,05$

Tabela 5. Coeficientes do modelo de 4ª. ordem ajustado aos dados de solubilidade da conalbumina em função do pH, tipo de sal e da concentração salina.

Parâmetro*	a	b	c	d	e	f	g	h	R ²
Citrato	-0,8171	0,6755	-0,0171	0	-0,1908	0	0,0228	-0,0009	0,90
Sulfato	-0,7393	0,5750	-0,0181	0	-0,1546	0	0,0178	-0,0007	0,95

* $p < 0,05$

Tabela 6. Coeficientes do modelo de 2^a. ordem ajustado aos dados de solubilidade da lisozima em função do pH e da concentração salina.

Parâmetro	a	b	c	d	e	f	R ²
Citrato	0,0968	-0,0083	-0,0539	0,0177	0,0006	-0,0015	0,95
Sulfato	0,0954	-0,0117	-0,0775	0,0297	0,0010	-0,0025	0,94

*p<0,05

5. CONCLUSÃO

A solubilidade é uma propriedade funcional usada como pré-requisito crítico para potenciais aplicações dos ingredientes protéicos em alimentos e pode influenciar as outras propriedades funcionais das proteínas. Adicionalmente, dados de solubilidade são utilizados para determinação de condições ótimas de extração e purificação de proteínas. Neste trabalho foi avaliada a influência do pH, tipo de sal e da concentração salina na solubilidade das proteínas da clara. Cada proteína apresentou um comportamento específico para cada tipo de sal. De modo geral, a solubilidade diminuiu com o aumento da concentração de sal no meio.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEONI, A. C. C. and ANTUNES, A. J. Internal quality of eggs coated with whey protein concentrate. **Scient. Agric.** V. 61, p. 276–280, 2004.

ANTON, M., GANDEMER, G. Composition, solubility and emulsifying properties of granules and plasma of egg Yolk. **J. Food Science**, v. 62, p. 484-487, 1997.

ATAKA, M. and TANAKA S. The growth of large single crystals of lysozyme. **Biopolymers**. v. 25(2), p.337–350, 1986.

AWADE, A. C.; MOREAU, S.; MOLLE, D.; BRULÉ, G. and MAUBOIS, J. L. Two-step chromatographic procedure for the purification of hen egg white ovomucin, ovotransferrin and ovalbumin ad characterization of purified proteins. **Journal of Chromatography A**, v. 677, p. 279-288, 1994.

AWADE, A. C. and EFSTATHIOU, T. Comparison of three liquid chromatographic methods for egg-white protein analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 723 p. 69–74, 1999.

BELITZ, H.D.; GROSCH, W. **Química de los alimentos**. Zaragoza: Acribia. 1988. p.433-446.

BÉNAS, P.; LEGRAND, L. and RIÈS-KAUTT, M. Strong and specific effects of cations on lysozyme chloride solubility. **Acta Cryst.** D58, 1582-1587, 2002.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G. and HUNTER J. S. **Statistic for Experimenters**. New York: John Wiley and Sons, 1978.

CHOBERT, J. M.; SITOBY, M. and WHITAKER, J. R. Specific limited hydrolysis and phosphorylation of food proteins for improvement of functional and nutritional properties. **J. Amer. Oil Chem. Soc.**, v. 64, p. 1704-1711, 1987.

FENNEMA, O. R. **Química de Los Alimentos**. 2^{ed}. Zaragoza: Ed. Acribia S.A, 1993.

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

FORSYTHE, E. L.; JUDGE, R. A. and PUSEY, M. L. Tetragonal chicken egg white lysozyme solubility in sodium chloride solutions. **J. Chem. Eng. Data**, v. 44, p. 637-640, 1999.

GRIGSBY, J. J.; BLANCH, H. W. and PRAUSNITZ, J. M. Diffusivities of lysozyme in aqueous MgCl₂ solutions from dynamic light-scattering data: effect of protein and salt concentrations. **J. Phys. Chem. B**, v. 104, p. 3645-3650, 2000.

GUÉRIN-DUBIARD, C.; PASCO, M.; HIETANEN, A.; QUIROS DEL BOSQUE, A.; NAU, F. and CROGUENNEC, T. Hen egg white fractionation by ion-exchange chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1090, p.58–67, 2005.

HARRIS, E. L. V. and ANGAL, S. Protein purification applications. A Practical Approach, IRL Press, Oxford, 1990.

HEGG P.O. 1978. Thermal aggregation and denaturation of egg white proteins. A model study of food protein behaviour, Ph.D. thesis, Univ. of Lund, Lund, Sweden.

HEGG, P.O., MARTENS, H. and LÖFQUIST, B. Effects of pH and neutral salts on the formation and quality of thermal aggregates of ovalbumin: A study on thermal aggregation and denaturation. **J. Sci. Food Agric.** v. 30, p. 981, 1979.

HEGG, P.O., Conditions for the formation of heat-induced gels of some globular food proteins. **Journal of Food Science.** v. 47, p. 1241-44, 1982.

JUDGE, R. A.; JOHNS, M. R. and WHITE, E. T. Solubility of ovalbumin in ammonium sulfate solutions. **J. Chemical Engineering Data**, v. 41, p. 422-424, 1996.

KAKALIS, L.T. and REGENSTEIN J. M. Effect of pH and salts on the solubility of egg white protein. **Journal of Food Science**, v. 51 (6), p.1445-1447, 1986.

KINSELLA, J.E. Structure and Functional Properties of Food Proteins. In: Fox, P.P., Condon, J.J., **Food Proteins**, Applied Science Published, p. 72-85, 1982.

KIOSSEOGLOU, V. D. Egg Yolk. In: **Developments in Food Science.** v. 19. Ed. Charalambous, G. and Doxastakis, G., Elsevier, Amsterdam, p. 63, 1989.

LEÓN, T. L. **Efectos Hofmeister en Sistemas Coloidales.** Universidad de Granada, Facultad de Ciencias, Departamento de Física Aplicada, Grupo de Coloides y Fluidos, Tesis Doctoral, 2006.

LI-CHAN, E.; NAKAI, S. Biochemical basis for properties of egg white. **Critical Review Poultry Biology.** v.2 (1), p. 21-57, 1989.

MACHADO, F. F.; COIMBRA, J. S. R.; ROJAS, E. E. G.; MINIM, L. A.; OLIVEIRA, F. C. and SOUSA, R. C. S. Solubility and density of egg white proteins: Effect of pH and saline concentration. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40 (7), p. 1304-1307, 2007.

MOHAN, C. **Buffers: A Guide for the Preparation and Use of Buffers in Biological Systems**; Calbiochem-Novabiochem: San Diego, USA, 1995.

MORR, C. V. and HA, E. Y. W. Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. **CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 33, p. 431-476, 1993.

MORRISEY, P. A.; MULVIHILL, D. M. and O'NEILL, M. O. Functional properties of muscle proteins. In: B. J. F. HUDSON (Ed), **Developments in Food Proteins**, vol. 5, pp. 195-256, 1982.

NAKAI, S. and CHAN, L. Structure modification and functionality of whey proteins : Quantitative structure- activity relationship approach. **Journal of Dairy Science**, v. 68 (10), p. 2763-2772, 1985.

OLLIS, D. and WHITE, S. Protein Crystallization. In: **Methods in Enzymology**, vol. 182 (ed. M. P. Deutscher), Academic Press Inc., New York, pp. 646-659, 1990.

PELEGRINE, D.H. and GASPARETTO, C. A. Whey proteins solubility as function of temperature and pH. **LWT- Food Science and Technology**, v. 38, p. 77-80, 2005.

PHARMACIA BIOTECH. **Hydrophobic Interaction Chromatography: Principles and Methods**. Uppsala, Sweden, 1993.

RIÈS-KAUTT, M. M. and DUCRUIX, A. F. Relative effectiveness of various ions on the solubility and crystal growth of lysozyme. **Journal of Biological Chemistry**. v. 264, 2, p. 745-748, 1989.

ROJAS, E. E. G.; COIMBRA, J. S. R.; MINIM, L. A.; SARAIVA, S. H. and SILVA, C. A. S. Hydrophobic interaction adsorption of hen egg white proteins albumin, conalbumin, and lysozyme. **Journal of Chromatography B**, v. 840, p. 85-93, 2006.

SAS Institute, Inc. 1998. SAS / STAT User's Guide Release 6.03. Ed. SAS Institute Inc., Cary, NC.

SIM, J. S. **Eggs Uses and Processing Technologies: New Developments**. University of British Columbia: Columbia, CA, Marcel Dekker, Inc.: New York, 1994.

STADELMAN, W.J. and COTTERILL, O J. Egg Science and Technology. 4^{ed}. Wesport: AVI Publischer company, 1995. 449p.

VACHIER, M. C., PIOT, M. and AWADE, A. C. Isolation of hen egg white lysozyme, ovotransferrin and ovalbumin, using a quaternary ammonium bound to a highly crosslinked agarose matrix. **Journal of Chromatography B**, v. 664, p. 201-210, 1995.

VOJDANI, F. Solubility. In: G. M. Hall (Ed), **Methods of Testing Protein Functionality**. London: Blackie Academic & Professional, p. 11-46, 1996.

WIT, J. N. Functional properties of whey proteins. In: P. F. Fox (Ed), **Developments in dairy chemistry**, vol. 4 (pp. 285-321). London: Elsevier Applied Science). 1989.

WONG, D. W. S. **Química de los alimentos: Mecanismos y teoría.** Zaragoza, Editorial Acribia S.A. 1995.

WONG, W. S., CAMIROND, W. M. and PAVLATH, A. E. Structures and functionality of milk proteins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 36 (8), p. 807-844, 1996.

CONCLUSÃO GERAL

A clara de ovos é uma fonte natural de proteínas com alto valor nutricional e biológico. Três proteínas de particular importância presentes na clara são a lisozima, a conalbumina e a ovoalbumina que apresentam altos valores nutricionais e funcionais, despertando amplo interesse no campo de ensino e pesquisa, bem como na esfera industrial. O potencial para aplicações tecnológicas das proteínas da clara tem estimulado o desenvolvimento de processos integrados para sua separação e purificação visando manter suas características funcionais inalteradas. O uso combinado dos processos de adsorção em leito expandido com sistemas aquosos bifásicos (SAB) pode representar uma forma de separação simples e eficiente para o isolamento destas proteínas. A resina de troca catiônica empregada na adsorção em leito expandido permitiu a separação de duas frações protéicas da clara do ovo. A análise do índice de recuperação das proteínas após a eluição demonstrou uma boa eficiência na separação da ovalbumina, concentrada na fração 01, das outras proteínas presentes na fração 02. A fração 02 rica em lisozima e conalbumina foi submetida a um próximo processo de separação usando sistemas aquosos bifásicos. De acordo com os resultados, a lisozima tende a se concentrar na fase superior e a conalbumina na fase inferior. Os maiores IR da lisozima na fase superior e da conalbumina na fase inferior foram encontrados nos sistemas PEG-citrato e PEG-sulfato, podendo os mesmos serem usados para separação destas proteínas da fração da clara obtida por ALE.

ANEXO A

Frações mássicas (% m/m) para os sistemas formados por PEG 1500g.mol⁻¹ e sais, a 25 °C, pH 7,0.

SAB	TOTAL			FASE SUPERIOR			FASE INFERIOR			TLL
	PEG (% m/m)	Sal (% m/m)	Água (% m/m)	PEG (% m/m)	Sal (% m/m)	Água (% m/m)	PEG (% m/m)	Sal (% m/m)	Água (% m/m)	
PEG - Citrate de Sódio	14,00	14,89	71,11	19,02	5,73	75,25	3,80	20,76	75,44	28,91
	16,00	16,10	67,90	27,69	3,86	68,45	8,92	25,11	65,97	39,22
	18,00	17,28	64,72	28,13	3,32	68,55	10,30	26,41	63,29	42,15
PEG - Fosfato de Potássio	14,00	10,52	75,48	21,37	6,82	71,81	7,05	16,43	76,52	19,67
	16,00	11,43	72,57	27,78	4,99	67,23	5,34	20,71	73,95	31,55
	18,00	11,45	70,55	31,13	4,50	64,38	5,63	21,65	72,72	34,86
PEG - Sulfato de Lítio	14,00	11,61	74,39	34,44	5,30	60,26	6,85	15,54	77,61	29,35
	16,00	12,63	71,37	39,18	4,15	56,67	6,60	16,85	76,55	37,57
	18,00	12,81	69,19	44,40	3,25	52,35	5,91	19,32	74,77	42,79
PEG - Sulfato de Sódio	14,00	7,53	78,47	32,36	2,84	64,80	2,47	15,63	81,90	26,79
	16,00	7,84	76,16	34,51	2,16	63,33	2,12	17,77	80,11	29,74
	18,00	8,53	73,47	37,94	1,95	60,11	1,86	19,45	78,69	35,12