

RONEY ALVES DA ROCHA

**COMBINAÇÃO DAS TÉCNICAS DE PRECIPITAÇÃO ÁCIDA E COMPLEXAÇÃO PARA OBTENÇÃO DE FRAÇÕES ENRIQUECIDAS DE  $\alpha$ -LACTOALBUMINA E  $\beta$ -LACTOGLOBULINA DO ISOLADO PROTÉICO DE SORO DE LEITE**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2008

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

T

R672c  
2008

Rocha, Roney Alves da, 1975-

Combinação das técnicas de precipitação ácida e complexação para obtenção de frações enriquecidas de  $\alpha$ -lactoalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina do isolado protéico de soro de leite \ Roney Alves da Rocha – Viçosa, MG, 2008. xvi, 74f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Luis Antônio Minim

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 70-74

1. Proteína do soro do leite. 2.  $\alpha$ -lactoalbumina - Recuperação. 3.  $\beta$ -lactoglobulina - Recuperação. 4. Proteína de leite - Produção. 5. Recuperação de proteína. 6. Isolados protéicos. 7. Albuminas. 8. Globulinas.

I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 664.62

RONEY ALVES DA ROCHA

**COMBINAÇÃO DAS TÉCNICAS DE PRECIPITAÇÃO ÁCIDA E COMPLEXAÇÃO PARA OBTENÇÃO DE FRAÇÕES ENRIQUECIDAS DE  $\alpha$ -LACTOALBUMINA E  $\beta$ -LACTOGLOBULINA DO ISOLADO PROTÉICO DE SORO DE LEITE**

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

APROVADA: 30 de julho de 2008.

---

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

---

Prof<sup>a</sup>. Maria do Carmo Hespanhol da Silva

---

Prof. Antônio Fernandes de Carvalho

---

Prof<sup>a</sup>. Maria Cristina Baracat Pereira

---

Prof. Luis Antônio Minim  
(Orientador)

*À Maria da Glória,  
minha querida mãe, e  
à minha irmã, Flávia.*

*Sem o incentivo, a dedicação e o apoio de  
vocês, o sonho de vir estudar em Viçosa não  
teria se tornado uma realidade ...*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo o que tem feito e ainda fará em minha vida. Por estar sempre presente. Por quebrar as correntes que me atavam a superstições, crenças e tradições que ofuscavam o brilho de Sua verdadeira Majestade. Por ter me permitido a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), que se tornaram minha segunda casa.

À *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)* pelo apoio financeiro.

Ao professor Luis Antônio Minim, agradeço pela amizade, paciência, ensinamentos, oportunidades, e por ser meu orientador. Obrigado por compartilhar com nós, seus orientados, a sua postura profissional e seu amplo conhecimento científico e tecnológico nos domínios da Engenharia.

À professora Jane Sélia dos Reis Coimbra, pela amizade, pelos ensinamentos, pelas dicas, e por gentilmente ter me recebido em seu gabinete todas as vezes em que tive necessidade de contar com suas opiniões e sugestões.

Ao professor Luis Henrique Mendes da Silva e sua esposa, professora Maria do Carmo, pela amizade, pela cordialidade, inigualável atenção, ensinamentos, e pelo incentivo.

À professora Valéria Paula Rodrigues Minim, pela gentileza, pela simpatia, pelos ensinamentos e pelas valiosas contribuições em minha formação pessoal e profissional.

Ao professor Antônio Fernandes de Carvalho e à professora Maria Cristina Baracat Pereira, que gentilmente aceitaram o convite de participar como membros da banca que avaliou este trabalho. A vocês os meus sinceros agradecimentos pelas dicas, sugestões, correções e pela amizade.

Ao amigo e incentivador, Dr. Afonso Celso Lacerda de Souza (Cataguases/MG), que entre um café e outro insistia veementemente para o meu ingresso em uma carreira universitária.

Ao Dr. Aurélio Augusto de Sousa Filho (IBAMA/JF), pela amizade, incentivo, apoio e ensinamentos.

A minha mãe, Maria da Glória, que me amparou de todas as formas possíveis, e não mediu sacrifícios ao longo de toda essa caminhada.

A minha irmã, Flávia, pelas orações, pela confiança e pelo constante incentivo.

Ao meu sobrinho, Daniel, pelas brincadeiras, pela descontração, e por me proporcionar horas de imensa alegria ao seu lado.

Ao Robinson, pelo otimismo, pelo espírito empreendedor, e por estar presente e sempre disposto a ajudar.

À Pricilla, pela dedicação, pelo esforço e pelas contribuições, que tornaram este trabalho possível.

Aos funcionários do DTA, do DEQ (Eduardo, do laboratório de cromatografia, e D. Onezina, do almoxarifado de reagentes analíticos) e amigos que trabalham no LPS (Laboratório de Processos de Separação), e a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

RONEY ALVES DA ROCHA, filho de Geraldo Sebastião da Rocha e Maria da Glória Alves Brandão, nasceu em Cataguases, Minas Gerais, no dia 09 do mês de julho de 1975.

Em março de 2001, iniciou o Curso de Engenharia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa, colando grau em outubro de 2006. No mesmo mês, ingressou no Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, em nível de Mestrado, na Universidade Federal de Viçosa.

Em julho de 2008, submeteu-se à defesa de dissertação.

## ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	.....	vii
LISTA DE FIGURAS	.....	viii
LISTA DE EQUAÇÕES	.....	x
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	.....	xi
RESUMO	.....	xiii
ABSTRACT	.....	xv
1.INTRODUÇÃO	.....	1
2.REVISÃO DE LITERATURA	.....	4
3.MATERIAIS E MÉTODOS	.....	21
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO	.....	32
CONCLUSÕES	.....	65
SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS	.....	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	.....	70

## LISTA DE TABELAS

Tab. 1 - Composição protéica do leite	.....	5
Tab. 2 - Variáveis de resposta do experimento	.....	23
Tab. 3 - Fatores e Níveis dos Fatores	.....	23
Tab. 4 - <i>Design</i> Experimental	.....	24
Tab. 5 - Gradiente de centrifugação	.....	26
Tab. 6 - Gradiente da fase móvel (HPLC)	.....	29
Tab. 7 - Resultado da análise cromatográfica do WPI	.....	32
Tab. 8 - Massa de $\alpha$ -La e $\beta$ -Lg obtidas como precipitado	.....	38
Tab. 9 - Recuperação de $\alpha$ -La e $\beta$ -Lg no precipitado	.....	40
Tab. 10 - ANOVA: Análise de $\alpha$ -La no precipitado	.....	41
Tab. 11 - ANOVA: Análise de $\beta$ -Lg no precipitado	.....	44
Tab. 12 - Resultado de otimização para o precipitado	.....	47
Tab. 13 - Pureza dos precipitados em relação a $\alpha$ -La	.....	48
Tab. 14 - Massas de $\alpha$ -La e $\beta$ -Lg presentes no sobrenadante	.....	51
Tab. 15 - Recuperação de $\alpha$ -La e $\beta$ -Lg no sobrenadante	.....	52
Tab. 16 - ANOVA: Análise de $\alpha$ -La no sobrenadante	.....	53
Tab. 17 - Resultado de otimização para o sobrenadante	.....	59
Tab. 18 - Pureza dos sobrenadantes em relação a $\beta$ -Lg	.....	60
Tab. 19 - Previsão de recuperação no ponto de ótimo global	.....	64

## LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 - Estrutura primária da $\alpha$ -La	...	8
Fig. 2 - Estrutura terciária da $\alpha$ -La	...	9
Fig. 3 - Estrutura terciária da $\beta$ -Lg	...	12
Fig. 4 - Solubilidade de proteína em função do pH	...	16
Fig. 5 - Ligações do átomo de cálcio no interior da $\alpha$ -La	...	19
Fig. 6 - Anova da curva de calibração da $\alpha$ -La	...	33
Fig. 7 - Anova da curva de calibração da $\beta$ -Lg	...	34
Fig. 8 - Perfil cromatográfico da dispersão do WPI em água	...	36
Fig. 9 - Cromatograma de análise do gradiente de centrifugação	...	37
Fig. 10 - Diagrama Pareto: $\alpha$ -La no precipitado	...	39
Fig. 11 - Fatores Principais: $\alpha$ -La no precipitado	...	42
Fig. 12 - Interação entre Fatores: $\alpha$ -La no precipitado	...	43
Fig. 13 - Fatores Principais: $\beta$ -Lg no precipitado	...	45
Fig. 14 - Resultado de otimização para o precipitado	...	46
Fig. 15 - Co-precipitação da $\beta$ -Lg no precipitado	...	49
Fig. 16 - Agrupamento dos tratamentos para o precipitado	...	49
Fig. 17 - Curvas de nível para a recuperação de $\alpha$ -La no precipitado	...	50
Fig. 18 - Diagrama Pareto: $\alpha$ -La no sobrenadante	...	53
Fig. 19 - Fatores Principais: $\alpha$ -La no sobrenadante	...	54

## LISTA DE FIGURAS

Fig. 20 - Teste-t: $\beta$ -Lg no sobrenadante	.....	55
Fig. 21 - Diagrama Pareto: $\beta$ -Lg no sobrenadante	.....	55
Fig. 22 - Fatores Principais: $\beta$ -Lg no sobrenadante	.....	56
Fig. 23 - Resultado de otimização para o sobrenadante	.....	58
Fig. 24 - Co-recuperação de $\alpha$ -La no sobrenadante	.....	60
Fig. 25 - Agrupamento dos tratamentos para o sobrenadante	.....	61
Fig. 26 - Recuperação Absoluta Média de $\beta$ -Lg no sobrenadante	.....	62
Fig. 27 - Otimização global do experimento	.....	63

## LISTA DE EQUAÇÕES

Eq. 1 - Solubilidade de Proteínas	.....	13
Eq. 2 - Hidrofobicidade Média de Aminoácidos	.....	14
Eq. 3 - Frequência de Carga	.....	14
Eq. 4 - Equação de Regressão para $\alpha$ -La	.....	35
Eq. 5 - Equação de Regressão para $\beta$ -Lg	.....	35

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

$g$	Aceleração da gravidade ( $\approx 9,80665 \text{ m s}^{-2}$ )
ASP	Aminoácido (ácido aspártico)
$R^2$	Coefficiente de determinação
CV	Coefficiente de variação
$\text{CaCl}_2$	Cloreto de cálcio
$\text{NaCl}$	Cloreto de sódio
WPC	Concentrado protéico do soro de leite
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
BOD	Estufa laboratorial
$\sigma$	Freqüência de carga
PVC	Filme polimérico (Policloreto de vinila)
$\Delta g$	Hidrofobicidade média dos resíduos de aminoácido
$\Delta g_{\text{Resíduo}}$	Hidrofobicidade da cadeia lateral do aminoácido
Ig	Imunoglobulinas
IFIS	<i>International Food Information Service</i>
WPI	Isolado Protéico do Soro de Leite
$\alpha\text{-La}$	$\alpha$ -lactoalbumina
$\beta\text{-Lg}$	$\beta$ -lactoglobulina
$n^-$	Número total de resíduos de aminoácido com carga negativa
$n^+$	Número total de resíduos de aminoácido com carga positiva
$n$	Número total de resíduos de aminoácidos na proteína
pI	Ponto isoelétrico

pH	Potencial hidrogeniônico
N	Teor de nitrogênio na amostra
Trat.	Tratamento
mM	Unidade de concentração: <i>mMol litro</i> <sup>-1</sup>
Da	Unidade de massa molecular (Dáltons)
μm	Unidade de medida: 10 <sup>-6</sup> metro

## RESUMO

ROCHA, Roney Alves da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2008.  
**Combinação das técnicas de precipitação ácida e complexação para obtenção de frações enriquecidas de  $\alpha$ -lactoalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina do isolado protéico de soro de leite.** Orientador: Luis Antônio Minim. Co-Orientadores: Luis Henrique Mendes da Silva e Valéria Paula Rodrigues Minim.

Neste trabalho foram estudados os efeitos da combinação de duas técnicas de recuperação de proteínas, com o objetivo de se obter uma fração enriquecida em  $\alpha$ -lactoalbumina e uma enriquecida em  $\beta$ -lactoglobulina, a partir de isolado protéico de soro de leite comercial (WPI). As técnicas empregadas foram a *precipitação ácida* e a *complexação do íon cálcio*, presente no interior da  $\alpha$ -La. A matéria-prima utilizada foi o WPI da marca **BiPRO**<sup>®</sup>, produzido e comercializado pela Davisco Food International Inc., USA. No soro reconstituído foram investigados cinco fatores: pH, tempo de agitação, temperatura de processo, tipo de complexante, e a concentração do WPI. Após a adição do ácido láctico ou cítrico e centrifugação, foram obtidas duas frações, uma *sobrenadante* e uma *precipitado*, que foram submetidos, individualmente, e para cada tratamento, a análises cromatográficas (HPLC), para avaliar as quantidades de  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg presentes em cada uma. Para o precipitado, rico em  $\alpha$ -La, verificou-se que as melhores condições de recuperação dessa proteína, com a restrição imposta de se minimizar a co-precipitação de  $\beta$ -Lg, foram: tempo de agitação de 30 minutos,

temperatura de processo de 40 °C, pH 3,9, 12,0 % (m/m) para a concentração de WPI, e a utilização de ácido cítrico como complexante. Para o sobrenadante, rico em  $\beta$ -Lg, verificou-se que as melhores condições de recuperação dessa proteína, com a restrição imposta de se minimizar a co-recuperação de  $\alpha$ -La, foram: tempo de agitação de 30 minutos, temperatura de processo de 30 °C, pH 3,9, 9 % (m/m) de WPI, e ácido láctico como acidificante, podendo, em sua substituição, ser utilizado um outro acidificante de menor custo. Em adição às análises realizadas para o precipitado e para o sobrenadante, estabeleceu-se uma *função-objetivo* que permitiu estimar, dentro das condições experimentais realizadas, um ponto de otimização. Este ponto refere-se aos valores dos níveis dos fatores em estudo cuja recuperação de  $\alpha$ -La no precipitado e a recuperação de  $\beta$ -Lg no sobrenadante são simultaneamente maximizadas, enquanto que a co-recuperação de  $\alpha$ -La no sobrenadante e a co-precipitação de  $\beta$ -Lg no precipitado são minimizadas. Nestas condições os valores encontrados foram: tempo de agitação 30 minutos, temperatura de processo 40 °C, pH ajustado para 3,9 com ácido cítrico, concentração de WPI igual a 9 % (m/m), e adição de citrato de sódio tribásico como agente complexante.

## ABSTRACT

ROCHA, Roney Alves da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July of 2008.  
**Combination of the techniques of acid precipitation and complexing for obtaining of enriched fractions of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin from whey protein isolate of milk.** Adviser: Luis Antônio Minim.  
Co-Advisers: Luis Henrique Mendes da Silva and Valéria Paula Rodrigues Minim.

In this work it was studied the effects of the combination of two techniques for proteins recovering, in order to obtain an enriched fraction in  $\alpha$ -lactalbumin and an enriched one in  $\beta$ -lactoglobulin, from commercial whey protein isolate (WPI) of cheese. The employed techniques were the acid precipitation and the complexation of calcium ion, present inside  $\alpha$ -La. The used raw material was WPI of BiPRO<sup>®</sup> mark, produced and marketed by Davisco Food International Inc., USA. In the reconstituted whey five factors were investigated: pH, time of agitation, temperature of process, complexing type, and concentration of WPI. After addition of acid and centrifugation, were obtained two fractions: one fraction *supernatant* and a fraction of *precipitate*, that were submitted, individually, and for each treatment, to chromatographic analyses (HPLC), to evaluate the amount of  $\alpha$ -La and  $\beta$ -Lg present in each one. For the precipitate, enriched in  $\alpha$ -La, it was detected that the best conditions of protein recovering, with the imposed restriction of minimizing the co-precipitation of  $\beta$ -Lg, were: time of agitation of 30 minutes, process temperature of 40 °C, pH 3.9, 12.0 % (w/w)

for WPI concentration, and the use of citric acid as complexing. For the supernatant, enriched in  $\beta$ -Lg, it was detected that the best conditions of protein recovery, with the imposed restriction of minimizing co-recovering of  $\alpha$ -La, were: agitation time of 30 minutes, process temperature of 30 °C, pH 3.9, 9 % (w/w) of WPI, and the use of lactic acid as acidifier, being able to, in its substitution, another acidifier of smaller cost to be used. In addition to the analyses accomplished for the precipitate and for supernatant, was settled down a *objective function* that allowed to esteem, over the experimental conditions accomplished, a point of optimization. This point refers to values of levels of the factors in study whose recovery of  $\alpha$ -La in the precipitate and the recovery of  $\beta$ -Lg in the supernatant are simultaneously maximized, while the co-recovery of  $\alpha$ -La in the supernatant and the co-precipitation of  $\beta$ -Lg in precipitate are minimized. In these conditions the found values were: agitation time: 30 minutes, process temperature: 40 °C, pH adjusted for 3.9 with citric acid, concentration of WPI of 9 % (w/w), and addition of tribasic sodium citrate as the complexing agent.

# 1. INTRODUÇÃO

O soro é o componente líquido do leite, e industrialmente é obtido durante o processo de fabricação do queijo, após a formação do coágulo, nas etapas de corte e mexedura da coalhada (HUI, 1993). Nesse processo, a separação do soro ocorre principalmente devido à ação mecânica de agitação e, ao seu término, obtém-se uma fração sólida, a *massa*, composta em sua maior parte por gordura, água e proteína, e que dará origem ao queijo nas etapas subsequentes do processamento, e uma fração líquida, que é designado *soro de leite* (PIETER et al., 2006).

O soro, portanto, é uma solução de nutrientes diluída, e entre esses estão proteínas, lactose, sais e gordura residual (CHAO, 2001).

Historicamente, o soro era considerado como um resíduo industrial e o seu descarte no ambiente era feito de forma que apresentasse o menor custo possível (CHATTERTON et al., 2006), implicando em impactos ambientais, ou então, destinado ao uso como ingrediente em formulações para alimentação animal (MEADE e STRINGHAM, 1949). Este cenário ainda é o que prevalece em muitas das regiões do país. Porém, com a crescente demanda por alimentos de maior aporte nutricional, economicamente atrativos, e pela insígnia exercida pela legislação ambiental para que se reduza a elevada carga de efluentes poluidores, a indústria de processamento de lácteos, amparada pelo apoio tecnológico de universidades e instituições de pesquisa, seguida pelas indústrias farmacêutica e química, vêm avançando nas investigações e nos estudos visando expandir a utilização do soro como ingrediente em uma gama ainda maior de formulações. Entre essas pode-se citar: sorvetes, alimentos para crianças e atletas, sopas desidratadas, cosméticos, medicamentos e muitos outros (CHAO, 2001).

Algumas empresas do setor alimentício já recuperam, processam e comerci-

alizam o soro de leite para essas finalidades, e o disponibilizam sob a forma de soro em pó.

O *concentrado protéico do soro de leite* (WPC – *Whey Protein Concentrate*) e o *isolado protéico do soro de leite* (WPI – *Whey Protein Isolate*) são outros produtos obtidos a partir do processamento do soro de leite e, de modo semelhante ao soro, também são comercializados sob a forma de pó, sendo que o conteúdo total de proteínas no soro é menor do que o conteúdo de proteínas no WPC, e este, por sua vez, possui menor quantidade de proteínas do que o WPI (LUCENA et al., 2007).

Para estudo, as proteínas do soro de leite podem ser classificadas em dois grupos principais: 1) uma fração de *globulinas*, contendo principalmente a  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) e as imunoglobulinas (Ig); e 2) uma fração de *albuminas*, que incluem a  $\alpha$ -lactoalbumina ( $\alpha$ -La) e as albuminas do soro (DeWIT e BRONTS, 1995; CHAO, 2001).

A  $\alpha$ -La e a  $\beta$ -Lg são duas pequenas proteínas globulares, e são, em termos nutricionais e funcionais, as mais importantes proteínas do soro de leite, e encontram-se naturalmente presentes no leite bovino (KUHLMAN et al., 2003). No leite humano, porém, apenas a  $\alpha$ -La está presente e tipicamente encontra-se em uma quantidade correspondente a 40 %, em peso, do seu total de proteínas, enquanto que no leite bovino, este valor é muito menor, variando entre 4 % e 5 %, respectivamente (CHAO, 2001).

Algumas pesquisas têm relatado que a  $\beta$ -Lg, presente em alimentos cuja formulação contenha leite ou soro de leite de origem bovina, tem sido a principal causa de alergia em crianças, sendo, dessa maneira, desejável que as formulações lácteas infantis tenham baixa concentração de  $\beta$ -Lg ou contenham uma concentração relativamente alta de  $\alpha$ -La, para torná-las mais similar ao leite humano (CHAO, 2001 e LUCENA et al., 2007).

Assim, torna-se de interesse para a indústria de alimentos a obtenção dessas proteínas, principalmente a  $\alpha$ -La, em sua forma pura ou quase pura, para aplicação nas formulações enriquecidas em proteínas em que se espera um reduzido potencial alergênico.

Entre as técnicas apresentadas na literatura para o fracionamento dessas proteínas, a *precipitação ácida* e a *complexação de íons metálicos* têm se mostrado bastante atrativas, principalmente por fazerem uso de reagentes químicos que apresentam baixo custo.

Este trabalho teve como objetivo estudar o processo de precipitação ácida e a complexação do cálcio no sentido de se obter frações enriquecidas tanto de  $\alpha$ -La quanto de  $\beta$ -Lg. Foram avaliadas as principais variáveis do processo em termos de sua influência no rendimento e na pureza das frações protéicas.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. O SORO DE LEITE.

Os queijos estão entre os gêneros alimentícios mais antigos que se têm conhecimento. A data de sua primeira utilização como alimento ainda é incerta e, possivelmente, seu surgimento tenha ocorrido de modo acidental e espontâneo, consequência da fermentação natural do leite, realizada por microrganismos presentes no ambiente (HUI, 1993).

As técnicas e os procedimentos empregados na fabricação dos queijos variam geográfica e culturalmente. Porém, nos diferentes modos de processamento do leite para se produzir queijo, nota-se que o princípio básico da técnica é o de promover a concentração da caseína e da gordura, em aproximadamente dez vezes, formando a *massa* que dará origem ao queijo, ao passo que as proteínas do soro, os sais solúveis e a lactose são, em sua maior parte, removidos juntamente com o soro, quando este é separado da massa (FOX e McSWEENEY, 1998).

O soro é, portanto, um co-produto da fabricação do queijo, e a sua composição varia em função do tipo de queijo produzido, da composição inicial e do pré-tratamento térmico dado ao leite, entre outros. Com relação à composição, o soro de leite bovino contém cerca de  $65 \text{ g kg}^{-1}$  de sólidos totais, dos quais  $50 \text{ g kg}^{-1}$  são lactose,  $6 \text{ g kg}^{-1}$  são proteínas,  $6 \text{ g kg}^{-1}$  são cinzas, contendo  $2 \text{ g kg}^{-1}$  de nitrogênio não protéico, e  $0,5 \text{ g kg}^{-1}$  de gordura (BRITZ e ROBINSON, 2008).

A Tabela 1 apresenta valores médios referentes à composição protéica do leite (PIETER et al., 2006). Nessa Tabela pode-se observar que o soro de leite encerra um número significativo de proteínas, e que, segundo CHATTERTON et al. (2006), são proteínas de alto valor biológico e nutricional.

ARVANITTOYANNIS (2008), enfatiza a indústria de laticínios como sendo

Tabela 1: Composição protéica média do leite (Adaptado de PIETER et al., 2006)

<b>Proteína</b>	$g\text{ kg leite}^{-1}$	$g\text{ 100g Proteína}^{-1}$	Massa Molecular (Da)
<b>Caseína</b>	26	78,1	
$\alpha_{S1}$ -Caseína	10,7	32	$\approx 23.600$
$\alpha_{S2}$ -Caseína	2,8	8,4	$\approx 25.200$
$\beta$ -Caseína	8,6	26	23.983
$\kappa$ -Caseína	3,1	9,3	$\approx 19.550$
$\gamma$ -Caseína	0,8	2,4	$\approx 20.500$
<b>Proteínas do Soro</b>	6,4	19,5	
$\beta$ -Lactoglobulina	3,2	9,8	18.283
$\alpha$ -Lactoalbumina	1,2	3,7	14.176
Albumina do soro	0,4	1,2	66.267
Proteose-Peptona	0,8	2,4	4.000-40.000
Imunoglobulinas	0,8	2,4	-
<b>Outras Proteínas</b>	0,81	2,32	-
Lactoferrina	0,1	0,3	86.000
Transferrina	0,01	0,02	76.000
Prot. de Membrana	0,7	2	-
Enzimas	-	-	-

uma das maiores fontes geradoras de efluentes industriais poluidores na Europa, onde ressalta o papel do soro de leite como causador de grande impacto ambiental e sugere metodologias para o seu tratamento e correta disposição. A lista dos maiores consumidores mundiais de queijo, conforme dados de 2004 apresentados por esse mesmo autor, mostra que o Brasil ocupa a nona posição geral, correspondendo a um consumo médio de  $2,6 \text{ kg (habitante x ano)}^{-1}$ , o que gera uma quantia de um bilhão e centro e oitenta e quatro milhões de litros de soro de leite por ano.

Porém, com a crescente demanda por alimentos cada vez mais nutritivos, acessíveis e com menor custo de produção (MAROULIS e SARAVACOS, 2008), o soro de leite, que até então era considerado apenas como um agente poluidor, se desponta como uma importante fonte de nutrientes nobres, passíveis de serem recuperados e utilizados na elaboração de uma grande quantidade de produtos alimentícios. Como exemplo, uso em formulações infantis, alimentos para pessoas doentes, em produtos de panificação, entre outros (LIU, 2007).

Dentre os nutrientes presentes no soro de leite, duas proteínas se destacam pelo seu elevado valor nutricional e funcional, a  $\alpha$ -lactoalbumina e a  $\beta$ -lactoglobulina, consideradas quantitativamente as duas mais importantes proteínas do soro (CHATTERTON et al., 2006). Atualmente, existem tecnologias e métodos que permitem recuperá-las, em escala industrial, sem perdas significativas em suas funcionalidades, o que representa uma grande vantagem, pois, nesta forma, essas proteínas apresentam-se solúveis em água (LUCENA et al., 2007), facilitando sua adição em formulações alimentícias.

## **2.2. $\alpha$ -LACTOALBUMINA E $\beta$ -LACTOGLOBULINA.**

Segundo DeWIT e BRONTS (1995) e CHAO (2001), as proteínas do soro de leite podem ser classificadas em dois grupos principais:

- 1) uma fração de *globulinas*, contendo principalmente  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) e imunoglobulinas (Ig); e
- 2) uma fração de *albuminas*, que inclui a  $\alpha$ -lactoalbumina ( $\alpha$ -La) e as albuminas do soro.

### 2.2.1 $\alpha$ -LACTOALBUMINA.

A  $\alpha$ -La é uma proteína cujo percentual corresponde a aproximadamente 20 % (m/m) da quantidade de proteínas presentes no soro de leite bovino ( $\approx$  3,5 % (m/m) do total de proteínas do leite). É a principal proteína do leite humano e desenvolve um importante papel na síntese da lactose. É uma proteína pequena, cuja massa molar é de 14.176 Dáltons. Quanto à sua composição, a  $\alpha$ -La é uma proteína relativamente rica em triptofano (quatro resíduos por molécula). Também é rica em enxofre (1,9 %), presente na cistina (quatro ligações intramoleculares dissulfeto por mol), e rica em metionina. A  $\alpha$ -La não contém cisteína (grupos sulfidril livres). O seu ponto isoelétrico é 4,8 e a solubilidade mínima, quando em solução de NaCl 0,5 M, ocorre também em pH 4,8 (FOX e McSWEENEY, 1998).

O leite obtido de gados ocidentais, em geral, apresenta apenas uma variante genética da  $\alpha$ -La ( $\alpha$ -La **B**), mas nos gados oriundos de outras partes do mundo, como o Zebu, originário da Índia, o leite pode apresentar duas variantes da  $\alpha$ -La, **A** e **B**, respectivamente (FOX e McSWEENEY, 1998). A  $\alpha$ -La possui, em sua estrutura primária, 123 resíduos de aminoácidos, conforme representado pela Figura 1, e tem sido observada uma certa similaridade entre a estrutura primária da  $\alpha$ -La bovina e a estrutura primária da lisozima de diferentes espécies animais. A lisozima, presente na clara do ovo de galinha, apresenta-se idêntica à  $\alpha$ -La bovina nos seus primeiros 54 resíduos de aminoácidos, e os próximos 23

resíduos apresentam similaridades estruturais, como Ser/Thr e Asp/Glu (QASBA e KUMAR, 1997).

Quanto à estrutura secundária e terciária, a  $\alpha$ -La é uma metaloproteína globular compacta ligada ao átomo de cálcio, e se apresenta em solução como um elipsóide alongado na direção de seu eixo maior, com dimensões de (2,5 x 3,7 x 3,2) nm. Ela consiste em 26 % de  $\alpha$ -hélice, 14 % de estruturas- $\beta$ , e 60 % de estrutura não ordenada (FOX e McSWEENEY, 1998).

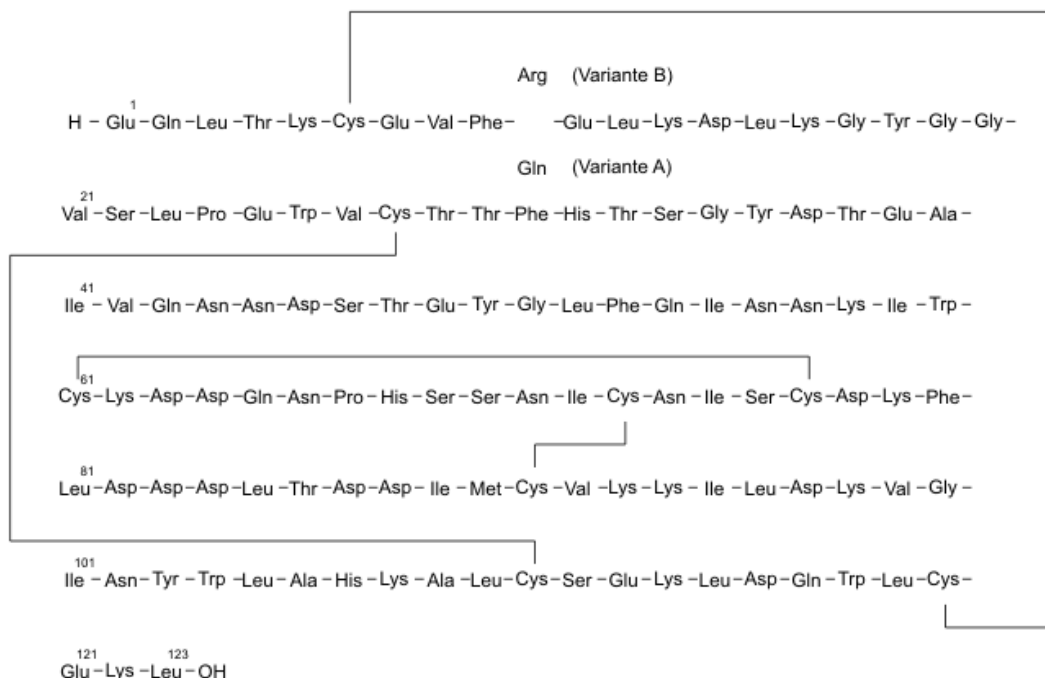


Figura 1: Estrutura primária da  $\alpha$ -lactoalbumina, mostrando ligações dissulfeto (linhas) e a substituição de aminoácidos para diferentes variantes genéticas (adaptado de FOX e McSWEENEY, 1998).

A Figura 2 representa um modelo de fitas da  $\alpha$ -La bovina, mostrando, no centro da imagem, o átomo de cálcio. A  $\alpha$ -La apresenta forte habilidade de ligação ao íon cálcio. À temperatura ambiente e na ausência de cálcio, a es-

estrutura terciária da  $\alpha$ -La está parcialmente desdobrada, e grupos hidrofóbicos do interior da proteína se tornam acessíveis ao seu meio externo. Na presença de cálcio, o estado nativo da proteína é recuperado e o interior hidrofóbico se torna novamente inacessível (NOPPE et al., 1999). Muitas são as propriedades funcionais associadas a  $\alpha$ -La, e entre elas, CHATTERTON et al. (2006) e MEZZARROBA et al. (2006) citam as seguintes:

- Propriedades anti-carcinogênicas e antimicrobianas,
- Redução do estado de estresse e efeito hipocolesterolêmico,
- Efeito contraceptivo (aplicação farmacológica) (SHUR, 1985)
- Importantes funções metabólicas e fisiológicas.

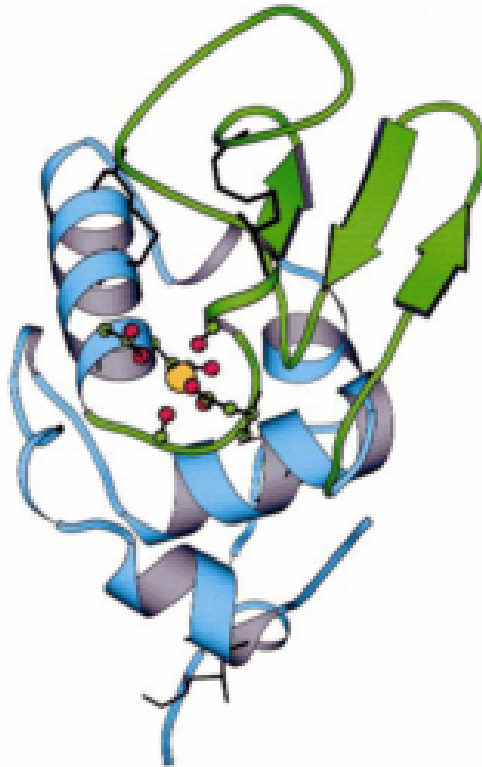


Figura 2: Estrutura terciária da  $\alpha$ -lactalbumina bovina gerada a partir da análise por dispersão de Raios-X, mostrando, em azul os domínios- $\alpha$ , em verde os domínios- $\beta$ , em laranja o íon  $Ca^{++}$  e, em preto, as ligações dissulfeto. (TROULLIER et al., 2000).

### 2.2.2 $\beta$ -LACTOGLOBULINA.

A  $\beta$ -Lg é a proteína presente em maior quantidade no soro de leite, representando cerca de 50 % (m/m) do total das proteínas do soro e até 12 % (m/m) das proteínas presentes no leite (FOX e McSWEENEY, 1998). Assim, suas propriedades tendem a dominar as propriedades das formulações alimentícias elaboradas a partir do soro de leite (PIETER et al., 2006).

A  $\beta$ -Lg é uma proteína globular típica. Tem sido estudada extensivamente e é muito bem caracterizada. Sua solubilidade depende fortemente do pH e da força iônica do meio, e suas estruturas secundárias e terciárias (Figura 3) são bem conhecidas (PIETER et al., 2006).

A  $\beta$ -Lg é a principal proteína do soro no leite em bovinos, ovinos, caprinos e bubalinos, embora apresente pequenas diferenças quando se compara a  $\beta$ -Lg de diferentes espécies. Há alguns anos, acreditava-se que a  $\beta$ -Lg estivesse presente apenas no leite de ruminantes, mas agora já se sabe que sua presença ocorre também no leite de suínos, égua, canguru, golfinho e manati <sup>1</sup>, entre outros. A  $\beta$ -Lg, contudo, não ocorre no leite de humanos, ratos, camundongos ou porco da guiné. Nestes, a  $\alpha$ -La é, portanto, a principal proteína do soro (PIETER et al., 2006).

Quatro variantes genéticas da  $\beta$ -Lg têm sido identificadas no leite bovino. São as variantes **A**, **B**, **C** e **D**, respectivamente. A quinta variante, que contém carboidrato, foi identificada em bovinos oriundos da Austrália (PIETER et al., 2006).

A  $\beta$ -Lg é rica em aminoácidos sulfurados, o que a confere um elevado valor biológico (Valor Biológico de 110). Ela contém cistina e cisteína, e o seu ponto

---

<sup>1</sup>Animal mamífero (*Trichechus mamatus*), com cor e aspecto geral do peixe-boi, presente nas Antilhas, costa da Venezuela e Guianas, até o litoral do PA. (Fonte: *Dicionário Aurélio da Língua Portuguesa, 2004*)

isoelétrico é 5,2. A cisteína é importante porque ela reage e forma ligações dissulfeto com a  $\kappa$ -caseína, afetando a coagulação do leite na formação do queijo. Também é reconhecida por conferir ao leite o aroma característico de "leite pasteurizado", após o seu processo de pasteurização (PIETER et al., 2006).

A estrutura primária da  $\beta$ -Lg consiste de 162 resíduos de aminoácidos por monômero, e sua estrutura secundária, quando estudada na faixa de pH de 2 a 6, apresenta 10–15 % de  $\alpha$ -hélice, 43 % de folha- $\beta$  e 47 % de estrutura não ordenada. A estrutura terciária da  $\beta$ -Lg foi estudada por cristalografia (Raios-X), e se mostra como uma proteína globular muito compacta (PIETER et al., 2006).

CHATTERTON et al. (2006), atribuem à  $\beta$ -Lg algumas propriedades funcionais, entre as quais pode-se destacar:

- Excelentes características de formação de gel e espuma para aplicações na indústria alimentícia e farmacêutica,
- Atividade antimicrobiana, antiviral e anticarcinogênica,
- Inibição nos processos de adesão microbiana, prevenindo a colonização de patógenos quando nos estágios iniciais da infecção,
- Efeito hipocolesterolêmico,
- Atua de modo a promover o transporte de substratos hidrofóbicos, como o retinol, em nível intestinal, facilitando o seu metabolismo, entre outras.

A  $\beta$ -Lg, porém, devido ao fato de não estar presente no leite humano, é apontada como potencial fonte de alergias em crianças, e isso ocorre quando se faz o consumo de alimentos elaborados com leite, soro ou algum de seus derivados contendo essa molécula, (GARCÍA et al., 1998 e WOOD, 2007).

A Figura 3 é uma representação esquemática da estrutura terciária da  $\beta$ -Lg.

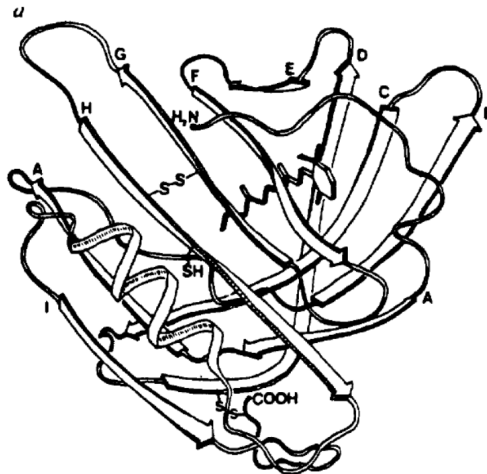


Figura 3: Representação esquemática da estrutura terciária da  $\beta$ -lactoglobulina.  
(Fonte: FOX e McSWEENEY, 1998)

### 2.3. PROPRIEDADES E FRACIONAMENTO DAS PROTEÍNAS.

Muitas são as técnicas que podem ser empregadas para recuperar e purificar as proteínas presentes no soro de leite e em outros materiais. Nos últimos anos, um grande número de métodos utilizados para purificar substâncias de origem biológica têm se tornado disponíveis. Os mais importantes métodos e tecnologias utilizados para grandes moléculas, polipeptídeos e particularmente proteínas, compreendem (ARMAREGO e CHAI, 2003):

- Centrifugação,
- Complexação (DeWIT e BRONTS, 1995),
- Cromatografia de afinidade,
- Cromatografias utilizando matrizes de troca iônica e hidroxilapatita,
- Cristalização, entre outras. - Diálise,
- Filtração em gel de agarose e em gel de poliacrilamida,

- Precipitação,
- Ultrafiltração,

Estes métodos e tecnologias podem ser utilizados isoladamente ou em conjunto, e estão devidamente descritos e exemplificados em literaturas técnicas, como em DEUTSCHER (1990).

### 2.3.1. PRECIPITAÇÃO E SOLUBILIDADE DAS PROTEÍNAS.

As propriedades funcionais das proteínas são freqüentemente influenciadas pela sua solubilidade, tais como a viscosidade, capacidade de formação de espuma, capacidade de emulsificação, e formação de gel, entre outras. Proteínas insolúveis têm aplicação muito limitada para uso no preparo de alimentos.

Segundo FENNEMA (1996), a solubilidade de uma proteína é a manifestação termodinâmica do equilíbrio das interações entre proteína-proteína, proteína-solvente e solvente-solvente, conforme representado pela Equação 1.



As principais interações que influenciam as características de solubilidade de proteínas são de natureza hidrofóbica e eletrostática. Interações hidrofóbicas promovem interações proteína-proteína e resultam na redução da solubilidade, enquanto que interações eletrostáticas promovem interações entre a proteína e a água, resultando no aumento da solubilidade. A exemplo, resíduos iônicos introduzem dois tipos de forças repulsivas entre as moléculas da proteína em solução, favorecendo a solubilização das mesmas. A primeira envolve repulsão eletrostática entre as moléculas de proteína, pela presença de carga líquida positiva ou negativa em qualquer pH diferente daquele no ponto isoelétrico. A segunda envolve a repulsão entre as camadas de hidratação ao redor dos grupos

iônicos.

BIGELOW (1967), citado por FENNEMA (1996), propôs que a solubilidade de uma proteína está fundamentalmente relacionada com a hidrofobicidade média dos resíduos de aminoácidos e a frequência de carga. A hidrofobicidade média (Equação 2) é definida como:

$$\Delta g = \Sigma \left( \frac{\Delta g_{\text{resíduo}}}{n} \right) \quad (2)$$

onde  $\Delta g_{\text{resíduo}}$  é a hidrofobicidade de cada cadeia lateral de resíduos de aminoácidos, e  $n$  é o número total de resíduos na proteína. A frequência de carga (Equação 3) é definida como:

$$\sigma = \frac{(n^+ + n^-)}{n} \quad (3)$$

onde  $n^+$  e  $n^-$  são o número total de resíduos carregados positiva e negativamente, respectivamente, e  $n$  é o número total de resíduos. De acordo com BIGELOW (1967), quanto menor a hidrofobicidade média e quanto maior a frequência de carga, maior será a solubilidade da proteína em solução.

Embora esta correlação empírica seja verdadeira para muitas das proteínas, ela não é absoluta. A abordagem de BIGELOW (1967) é incompleta visto que a solubilidade de uma proteína é ditada pelos caracteres hidrofílico e hidrofóbico da superfície da proteína que está em contato com a água presente na vizinhança, ao invés de ser a hidrofobicidade média e a frequência de carga da molécula, como um todo.

Segundo FENNEMA (1996), baseado nas características de solubilidade, as proteínas são classificadas em quatro categorias:

- *Albuminas*: proteínas que são solúveis em água, em pH 6,6 (ex: albuminas do soro, ovoalbumina e  $\alpha$ -lactoalbumina);
- *Globulinas*: proteínas solúveis em soluções diluídas de sal, no pH 7,0 (ex:

glicinina, faseolina e  $\beta$ -lactoglobulina);

- *Glutelinas*: são aquelas solúveis apenas em soluções ácidas (pH 2,0) e alcalinas (pH 12), (ex: glutelinas do trigo);

- *Prolaminas*: são aquelas solúveis em etanol 70 % (ex: gliadinas).

Tanto as prolaminas quanto as glutelinas são proteínas altamente hidrofóbicas.

Em adição a essas propriedades físico-químicas intrínsecas, a solubilidade é influenciada por diversas condições da solução, como pH, força iônica, temperatura e a presença de solventes orgânicos.

### 2.3.2. pH, TEMPERATURA E SOLUBILIDADE DAS PROTEÍNAS.

Em valores de pH abaixo e acima do pH isoelétrico as proteínas mantêm uma carga líquida positiva ou negativa, respectivamente. A repulsão eletrostática e a hidratação dos resíduos carregados promovem a solubilização da proteína. Quando, em um gráfico, a solubilidade é plotada em função do pH (Figura 4), muitas proteínas exibem uma curva em forma de "U". A solubilidade mínima ocorre em torno do pH isoelétrico das proteínas. A maioria das proteínas encontradas em alimentos exibem uma solubilidade mínima na faixa de pH que vai de 4 a 5 (pH isoelétrico), e solubilidade máxima em pH alcalino (FENNEMA, 1996).

A ocorrência de solubilidade mínima no ponto isoelétrico se deve primariamente à falta de repulsão eletrostática líquida, que promove agregação e precipitação via interações hidrofóbicas. Algumas proteínas alimentícias, como a  $\beta$ -Lg (pI 5,2) e BSA (pI 5,3) são altamente solúveis em seu pH isoelétrico. Isso ocorre porque essas proteínas apresentam uma grande proporção de resíduos hidrofílicos em sua superfície em relação aos resíduos hidrofóbicos ali presentes (FENNEMA, 1996). Deve-se lembrar, porém, que muito embora uma proteína esteja com carga líquida igual a zero em seu ponto isoelétrico, ela ainda possui cargas, mas a quantidade de cargas negativas e positivas em sua superfície são, em módulo,

iguais. Se a hidroflicidade e as forças de repulsão na camada de hidratação, que podem surgir a partir desses resíduos carregados, forem maiores do que as interações hidrofóbicas proteína-proteína, então a proteína permanecerá solúvel em seu ponto isoeletrico.

Visto que muitas proteínas são altamente solúveis em pH alcalino (pH 8 a 9), a extração de proteínas de origem vegetal, tais como aquelas presentes no farelo de soja (ARAÚJO, 2004), é feita nessa faixa de pH, e a proteína será recuperada promovendo sua precipitação exatamente em seu ponto isoeletrico.

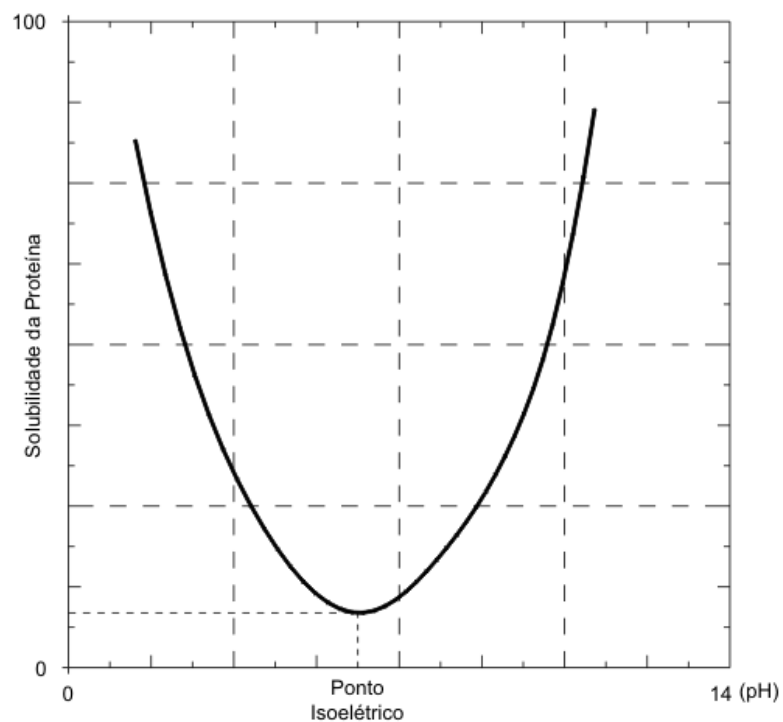


Figura 4: Solubilidade da proteína em função do pH (adaptado de ARAÚJO, 2004)

Em pH e força iônica constantes, a solubilidade da maioria das proteínas geralmente aumenta com a temperatura entre (0 e 40) °C. Exceções ocorrem com proteínas altamente hidrofóbicas, tais como a  $\beta$ -caseína e algumas proteínas de cereais, que exibem uma correlação negativa com a temperatura.

### 2.3.3. COMPLEXAÇÃO DE ÍONS COM AGENTES QUELANTES.

Segundo o *Dicionário de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, do International Food Information Service (IFIS, 2005), um agente quelante é uma substância que forma uma união estável com íons metálicos livres presentes em um meio, e que pode ser utilizado em alimentos para ajudar a controlar reações que ocorrem entre traços de metais e outros componentes desse alimento.

Nestes casos, os agentes quelantes seqüestram íons metálicos (e por isso são também denominados "seqüestrantes") prevenindo, por exemplo, a oxidação lipídica catalisada por eles. Atuam reprimindo a cristalização indesejada e a perda de qualidade nutricional, em uma variedade de alimentos.

Entre os agentes químicos quelantes citados neste dicionário para uso em alimentos estão:

- Ácido Tartárico;
- Citrato de Sódio e Ácido Cítrico;
- Dextrinas e ciclodextrinas; - EDTA (ácido etilenodiaminotetracético);
- Glucona- $\delta$ -lactona;
- Tartarato de sódio e cálcio;

O ácido láctico, embora seja considerado por alguns autores como complexante (LUCENA et al., 2006 e 2007), não aparece citado em outras literaturas consultadas com essa função. Algumas das funções atribuídas ao ácido láctico, citadas por outros autores, estão apresentadas a seguir:

- Acidulante e conservante (IFIS, 2005);
- Agente realçador de *flavour*, humectante, agente de controle de pH, acidificante (Committee on Food Chemicals Codex, 2004);
- Acidulante e agente realçador de *flavour* (SMITH e HONG-SHUM, 2003).

#### 2.4. COMBINAÇÃO DE TÉCNICAS PARA RECUPERAR PROTEÍNAS.

Estudos têm mostrado que a combinação de diferentes metodologias de recuperação de proteínas pode ser a chave para se obter bons resultados no fracionamento das proteínas do soro (LUCENA et al., 2007).

Neste trabalho procedeu-se à combinação de duas das técnicas utilizadas na recuperação de proteínas: o abaixamento do pH, para promover o enfraquecimento das ligações entre o cálcio e a  $\alpha$ -La, e a complexação desse íon com um complexante.

A  $\alpha$ -La é uma metaloproteína, e ela se liga ao átomo de cálcio (Figura 5) na proporção de um íon  $Ca^{2+}$  para cada molécula de proteína (FOX e McSWEENEY, 1998). O íon cálcio permanece, então, no interior de uma estrutura tridimensional empacotada, ligado a quatro resíduos de Aspartato (*Asp* - aminoácido com grupo lateral carregado negativamente). Esses resíduos são altamente conservados em todas as moléculas de  $\alpha$ -La e lisozima. A  $\alpha$ -La, quando associada ao cálcio, é bastante estável termicamente (das proteínas do soro, é a mais termoestável), porém, quando o pH é reduzido para valores inferiores a cinco ( $pH < 5$ ), os resíduos de Asp se tornam protonados, e perdem sua capacidade de se ligar ao  $Ca^{2+}$  (FOX e McSWEENEY, 1998).



Em um trabalho desenvolvido por FOX e McSWEENEY (1998), o precipitado (fração rica em  $\alpha$ -La) obtido pela complexação dos íons cálcio e em condições de baixo pH, foi submetido à centrifugação, ocorrendo a separação do sobrenadante, rico em  $\beta$ -Lg.

A  $\alpha$ -La e a  $\beta$ -Lg apresentam, portanto, características físico-químicas diferentes, o que permite sua separação combinando a adição de ácido e a remoção do íon cálcio, presente na  $\alpha$ -La, pela adição de um agente complexante.

Neste trabalho o objetivo principal foi o de avaliar a combinação dos tratamentos que permitisse obter de forma otimizada duas frações, uma rica em  $\alpha$ -La e uma rica em  $\beta$ -Lg, a partir do WPI, sob a forma de precipitado e sobrenadante, respectivamente.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Processos de Separação (LPS) do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, MG.

#### 3.1. AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS NA MATÉRIA-PRIMA.

Neste trabalho foi utilizado como matéria-prima o isolado protéico de soro de leite (WPI), produzido pela Davisco Foods International Inc.(USA), da marca *BiPRO*<sup>®</sup>. Este produto foi adquirido em um pacote de 15 kg, sob a forma de pó. Da embalagem foi coletada, em um béquer, uma amostra de aproximadamente 900 g, que permaneceu em estufa a 45 °C, por cerca de uma semana, até peso constante. Essa quantidade recebeu o nome de *estoque de WPI*. Do *estoque de WPI*, foram coletadas três amostras individuais, sendo que cada amostra foi retirada de uma zona ou ponto diferente no interior do béquer.

Cada uma das amostras foi submetida à análise da concentração de proteína pelo método de *Kjeldahl*, conforme descrito pelo *Committee on Food Chemicals Codex*, 2004, com  $N \times 6,38$ .

Em um béquer de vidro de capacidade de 100 ml, aproximadamente 15 g de WPI foram pesados acuradamente em uma balança analítica (*Denver Instruments, USA*) e aproximadamente 80 ml de água (Sistema MilliQ<sup>®</sup>, MilliPore) foi adicionado ao béquer, e este deixado em repouso para a solubilização das proteínas. Decorrido um período de 6 horas, o WPI, que se encontrava completamente solubilizado, foi transferido quantitativamente para um balão volumétrico de 250 ml. O volume do balão foi completado com água MilliQ<sup>®</sup>, em seguida o balão foi tampado e agitado suavemente (evitando a formação de bolhas). Esse balão foi identificado como *Balão 1*.

Do *Balão 1* foi coletada uma alíquota de 25 ml, em pipeta volumétrica, a qual foi transferida para um outro balão de 250 ml, identificado como *Balão 2*. Este último balão teve seu volume completado com água MilliQ<sup>®</sup>, foi tampado, e agitado suavemente. Uma amostra de aproximadamente 1 ml do *Balão 2* foi filtrada em membrana, de diâmetro de poro de 0,45  $\mu m$  e submetida a análise em HPLC (Shimadzu, Japão) para quantificação das proteínas. As análises foram feitas em quatro repetições e a separação foi feita por fase reversa.

### 3.2. DESIGN EXPERIMENTAL.

Antes que o experimento fosse efetivamente inicializado, foram feitas várias simulações e cenários computacionais utilizando-se o pacote estatístico SAS<sup>®</sup>.

O módulo utilizado para as simulações do experimento foi o SAS/ADX<sup>®</sup> (*Interface for Design of Experiments*), que permitiu propor um *design* experimental capaz de testar as interações principais e analisar graficamente as possíveis interações secundárias entre os fatores em estudo.

Uma das vantagens desse módulo (ADX) é que ele permitiu estabelecer uma *função-objetivo* que foi utilizada para promover otimização nos resultados finais, apontando a melhor combinação de tratamentos, de modo a maximizar a recuperação da  $\alpha$ -La e minimizar a presença da  $\beta$ -Lg no precipitado, e, de modo análogo, para o sobrenadante, permitiu maximizar a recuperação de  $\beta$ -Lg e minimizar a recuperação de  $\alpha$ -La, tudo isso levando em consideração que o *design* deveria apresentar o número mínimo (porém, necessário) de experimentos, de modo a se obter resultados corretos, e reduzir o tempo de análise, bem como o tempo de ocupação dos equipamentos e, conseqüentemente, os custos envolvidos nas análises.

As variáveis de resposta deste experimento estão apresentadas na Tabela 2.

Os Fatores e seus Níveis, testados neste experimento com o objetivo de obter

Tabela 2: Variáveis de Resposta do Experimento

Variável de Resposta	Descrição
REC_ALFA	Percentual de Recuperação da $\alpha$ -La
REC_BETA	Percentual de Recuperação da $\beta$ -Lg

as condições que otimizam a recuperação da  $\alpha$ -La no precipitado, e a recuperação de  $\beta$ -Lg no sobrenadante dos tratamentos, estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Fatores e Níveis avaliados no experimento

Fator	Descrição	Baixo	Central	Alto
TEMPO	Tempo de Agitação (min)	30	45	60
TEMPER	Temperatura (°C).	25	35	45
pH	Valor de pH ajustado com ácido.	3,9	4,2	4,5
CONCWPI	Concentração % (m/m) de WPI.	9	10,5	12
COMPLEX	Tipo de Complexante.	Citrato*	—	Lactato**

\* Citrato de sódio tribásico \*\* Lactato de sódio

As variáveis de resposta foram avaliadas tanto para o precipitado quanto para o sobrenadante.

O *design* experimental gerado pelo SAS<sup>®</sup>, e adotado neste trabalho, é um experimento fatorial 1/4 fracionado, de dois níveis, resolução igual a três, e está reproduzido na Tabela 4. Essa classe de experimento tem seu uso recomendado para investigações exploratórias, quando se deseja avaliar apenas as interações principais entre os fatores em estudo. É apropriado para quando há um número grande de fatores e quando é desejável que se tenha um número mínimo de experimentos.

Tabela 4: Design Experimental - Fatorial Fracionado 1/4

Trat.	Rep.	TEMPO	TEMPER	PH	CONCWPI*	COMPLEX**
1	1	30	25	3,9	12	Lactato
1	2	30	25	3,9	12	Lactato
2	1	60	25	3,9	9	Citrato
2	2	60	25	3,9	9	Citrato
3	1	30	45	3,9	9	Lactato
3	2	30	45	3,9	9	Lactato
4	1	60	45	3,9	12	Citrato
4	2	60	45	3,9	12	Citrato
5	1	30	25	4,5	12	Citrato
5	2	30	25	4,5	12	Citrato
6	1	60	25	4,5	9	Lactato
6	2	60	25	4,5	9	Lactato
7	1	30	45	4,5	9	Citrato
7	2	30	45	4,5	9	Citrato
8	1	60	45	4,5	12	Lactato
8	2	60	45	4,5	12	Lactato

\* Em % (m/m) \*\* Lactato de sódio e Citrato de sódio tribásico

### 3.3. DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL.

O citrato de sódio tribásico e o lactato de sódio foram utilizados com a finalidade de complexar o cálcio presente no interior da molécula de  $\alpha$ -La. A pesagem do WPI e do complexante, para cada tratamento, foi feita, a partir do *estoque de WPI*, em béquer de vidro com capacidade para 80 ml. Ambos foram pesados no mesmo béquer.

A quantidade de complexante a ser pesada foi definida com base na sugestão

de ALOMIRAH e ALLI (2004) e foi de 0,15 moles  $L^{-1}$  para todos os tratamentos. Portanto, a massa de complexante foi de  $(1,9355 \pm 0,0005)$  g para os tratamentos utilizando o citrato de sódio tribásico, e de  $(1,6809 \pm 0,0005)$  g, para os tratamentos utilizando o lactato de sódio. Após a pesagem, aproximadamente 40ml de água MilliQ<sup>®</sup> foram adicionados ao béquer contendo o WPI e o complexante. O béquer foi coberto com filme de PVC e deixado em repouso, por cerca de 2 a 4 horas, em temperatura de aproximadamente 5 °C, para haver a hidratação das proteínas presentes, solubilização parcial do WPI e evitar a formação de bolhas. A temperatura de geladeira foi utilizada para retardar a ação deterioradora de microrganismos.

Após a solubilização do WPI, o sistema foi deixado sob agitação suave em agitador magnético. O conteúdo do béquer foi acidificado com solução de ácido cítrico ou láctico, na concentração de 3 moles  $L^{-1}$  (de acordo com o tratamento), com o uso de pipeta de Pasteur. O valor do pH foi constantemente monitorado com o pHmetro (MB-10, Marte Ind. e Com. Ltda), até alcançar o valor de pH estabelecido para o tratamento, quando a agitação foi desligada e o conteúdo do béquer ( $\approx 45$  ml) foi transferido quantitativa e cuidadosamente para um balão volumétrico de 50 ml, o volume foi completado com solução ácida, feita com o mesmo ácido utilizado no referido tratamento, e no mesmo valor de pH do tratamento.

Em seguida foram coletadas duas alíquotas de 2 ml cada, utilizando uma pipeta volumétrica devidamente calibrada com água MilliQ<sup>®</sup>, e as alíquotas foram transferidas para um microtubo (tubo Eppendorf<sup>®</sup>) com capacidade para 2 ml.

Os dois tubos foram fechados, identificados ( $R_1$ , Repetição 1 e  $R_2$ , Repetição 2), e agitados em um agitador de tubos montado no interior de uma estufa BOD, na temperatura do tratamento, denominada *temperatura de processo*. O tempo de agitação e a temperatura da estufa foram continuamente monitorados.

Transcorrido o tempo de agitação, os tubos foram transferidos para uma microcentrífuga (Force7<sup>®</sup>, LabNet) e submetidos a um gradiente de centrifugação crescente (Tabela 5).

Tabela 5: Gradiente de Centrifugação

Equivalente em <i>g</i>	Tempo (min.)
300	2
600	2
1.800	4
7.200	12

Segundo LUCENA et al. (2006), após a acidificação, parte da  $\beta$ -Lg é co-precipitada com a  $\alpha$ -La. Alguns autores, como DeWIT e BRONTS (1995), sugerem que, após a adição do agente seqüestrante do íon cálcio e a acidificação, o sistema deve permanecer em repouso, para que a  $\alpha$ -La se sedimente lentamente, deixando a  $\beta$ -Lg em solução, e, assim, arraste consigo uma quantidade mínima dessa proteína, considerada contaminante. Por esse motivo foi proposto e utilizado neste experimento um gradiente de centrifugação que teve como objetivo reduzir, ao mínimo, a co-precipitação da  $\beta$ -Lg.

O sobrenadante (supostamente rico em  $\beta$ -Lg) foi transferido para um tubo graduado de centrífuga com capacidade para 15 ml, e o seu volume completado até a marca de 10 ml com solução de NaCl 7 %. O tubo de centrífuga foi fechado, agitado em um agitador elétrico para tubos, e centrifugado a 4.500 x *g*, por 15 minutos, com o objetivo de lavar o sobrenadante com solução salina, visto que a  $\beta$ -Lg é solúvel em solução de cloreto de sódio em baixas e moderadas concentrações, e outras proteínas presentes no sobrenadante seriam eliminadas sob a forma de precipitado.

Após a centrifugação, transferiu-se o sobrenadante para um balão volumétrico

de 50 ml cujo menisco foi ajustado com água acidificada, no mesmo pH de trabalho. Após completar o volume, a solução foi homogeneizada, uma alíquota de 2 ml retirada, filtrada em membrana MilliPore<sup>®</sup> de 0,45  $\mu m$ , e a concentração das proteínas  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg foi analisada por cromatografia de fase reversa, em coluna C18, em HPLC.

O precipitado (supostamente rico em  $\alpha$ -La) foi triturado mecanicamente com o auxílio de uma haste de aço, transferido quantitativamente para um tubo graduado de centrífuga, com capacidade para 15 ml, e o seu volume foi completado até a marca de 10 ml com solução de NaCl 7 %. Ao ser transferido do tubo Eppendorf<sup>®</sup> para o tubo de centrífuga, o tubo Eppendorf<sup>®</sup> foi exaustivamente lavado com solução de NaCl para garantir a total transferência do precipitado, e as águas da lavagem foram juntadas ao precipitado que já havia sido transferido para o tubo de centrífuga.

O tubo de centrífuga foi fechado, agitado em um agitador elétrico para tubos, e submetido à centrifugação de  $4.500 \times g$  por 15 minutos.

Esse procedimento teve como objetivo promover uma lavagem do precipitado, removendo proteínas solúveis em solução salina. O precipitado era supostamente constituído por  $\alpha$ -La, visto que ela não é solúvel em NaCl 7 %

Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, e o precipitado ressuspenso em solução de  $CaCl_2$  na concentração de 0,1 molar, previamente preparada, filtrada e mantida sob refrigeração. O processo de ressuspensão do precipitado foi realizado em um béquer de vidro, com capacidade para 50 ml, e feito sob agitação, usando um pequeno agitador magnético ( $\approx 1$  cm de comprimento). Durante a ressuspensão, o pH foi monitorado por um pHmetro de bancada (MB-10, Marte Ind. Com. Ltda.) e o seu valor final corrigido para 7,5 com NaOH 0,1 *moles Litro*<sup>-1</sup>. O volume final presente no béquer, após o ajuste do pH era de aproximadamente 45 ml.

O precipitado, ressuspendido em solução de  $\text{CaCl}_2$  e com o pH corrigido para 7,5, foi transferido para um tubo de centrífuga com capacidade para 50 ml. Em seguida, esse tubo foi submetido à centrifugação de  $4.500 \times g$  por 15 minutos.

Decorridos os 15 minutos de centrifugação, o tubo foi retirado da centrífuga e o precipitado descartado.

Transferiu-se o sobrenadante para um balão volumétrico de 50 ml cujo menisco era ajustado com água MilliQ<sup>®</sup>. O pH final esperado para a solução contida no balão, estava entre 7,0 e 7,5, valor verificado com o pHmetro em cada repetição e em todos os tratamentos.

Após completar o volume, tampou-se o balão com filme de PVC, homogeneizou-se o seu conteúdo, e retirou-se uma alíquota de 2 ml, a qual era filtrada em membrana MilliPore<sup>®</sup> de  $0,45 \mu\text{m}$ , e a concentração de  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg analisada em um HPLC, por cromatografia líquida de fase reversa em coluna C18.

### 3.4. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA.

A análise das proteínas  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg foi realizada por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), utilizando-se um cromatógrafo Shimadzu<sup>®</sup> (modelo LC-10VP), composto por duas bombas dosadoras analíticas (modelo LC-10ADVP), autoinjeter para 150 amostras (modelo SIL-10ADVP), detector de feixe de diodos UV-Visível (modelo SPD-M10AVP), forno com controle de temperatura da coluna (modelo CTO-10AVP), unidade de controle (modelo SCL-10AV), coluna C18 (Shim-Pack VP-ODS 150Lx4.6, Shimadzu), coluna de guarda (modelo CLCG-ODS, 10mm x 4mm) e o software Class-VP versão 5.6.

As condições analíticas foram (FERREIRA, 2001):

- Fase móvel **A**: Solução de NaCl 0,15 Molar, em pH 2,5 (acidificado com HCL, devidamente filtrada e degaseificada);

- Fase móvel **B**: Acetonitrila (100 %), devidamente filtrada e degaseificada;
- Vazão da fase móvel:  $1\text{ml min}^{-1}$ ;
- Temperatura da coluna: 40 °C;
- Comprimento de onda para detecção: 205 nm;
- Volume de injeção da amostra: 20  $\mu\text{L}$ ;

O gradiente foi programado conforme apresentado na Tabela 6:

Tabela 6: Gradiente descontínuo da Fase Móvel - RP-C18-HPLC

Concentrações Iniciais	Concentrações Finais	Tempo de Duração (min.)
100 % de <b>A</b> , 0 % de <b>B</b>	64 % de <b>A</b> , 36 % de <b>B</b>	3
64 % de <b>A</b> , 36 % de <b>B</b>	45 % de <b>A</b> , 55 % de <b>B</b>	18
45 % de <b>A</b> , 55 % de <b>B</b>	45 % de <b>A</b> , 55 % de <b>B</b>	2
45 % de <b>A</b> , 55 % de <b>B</b>	100 % de <b>A</b> , 0 % de <b>B</b>	10

### 3.5. CURVAS DE CALIBRAÇÃO.

As curvas de calibração para a  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg foram construídas a partir de soluções feitas com padrão, grau HPLC, dessas proteínas, respectivamente, em concentrações na faixa de (0,33 a 3,51)  $\text{mg ml}^{-1}$  para a  $\alpha$ -La, e 0,294 a 3,508  $\text{mg ml}^{-1}$  para  $\beta$ -Lg.

A relação entre as áreas dos picos dos cromatogramas e a concentração das proteínas foi expressa por uma equação linear de primeiro grau, ajustada aos dados experimentais. O ajuste das curvas foi feito utilizando-se o pacote estatístico SAS<sup>®</sup>, através do *Proc GLM* e *Proc Reg*.

O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e a dispersão gráfica dos resíduos estudados foram critérios utilizados para avaliar a qualidade das curvas de calibração.

### 3.6. REAGENTES E EQUIPAMENTOS.

#### 3.6.1 REAGENTES E MEMBRANAS.

- Acetonitrila grau HPLC (99,99 % pureza)
- Ácido cítrico P.A. (99,8 % pureza)
- Ácido Clorídrico Fumegante P.A. (99,9 % pureza)
- Ácido láctico P.A. (85 % pureza)
- Água MilliQ<sup>®</sup>
- Citrato de Sódio Anidro Tribásico P.A. (99,5 % pureza)
- Cloreto de Cálcio P.A. (99,9 % pureza)
- Cloreto de Sódio P.A. (99,6 % pureza)
- Isolado Protéico de Soro de Leite (WPI) (Davisco Food Ingredients, Inc., marca **BiPRO**<sup>®</sup>)
- Lactato de Sódio P.A. (50 % pureza)
- Membrana de acetato de celulose com 0,22  $\mu m$  de diâmetro de poro
- NaOH 0,1 Normal (0,1 *moles Litro*<sup>-1</sup>)
- Padrões analíticos, grau HPLC, de  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg, adquiridos da Davisco Food Ingredients, Inc.
- Soluções-Tampão para calibração de pHmetro

Os reagentes analíticos utilizados foram de diferentes marcas, todas de alta qualidade.

### 3.6.2. EQUIPAMENTOS.

- Agitador de tubos tipo Vortex
- Agitador magnético (110 volts)
- Balança analítica (Denver Instruments, USA)
- Banho de ultra-som (desgaseificador)
- Centrífuga para tubos de 15 ml e de 50 ml - Cromatógrafo HPLC (Shimadzu®) completo
- Equipamento de purificação de água MilliQ® (MilliPore®)
- Estufa BOD. (EletroLab)
- Microcentrífuga (Force7®, LabNet) (Eppendorf®)
- pHmetro de bancada
- Pipeta automática 1,0 ml
- Sistema de filtração a vácuo + bomba de vácuo (Supelco®)
- Tubos Eppendorf® de 2 ml

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.

### 4.1. PRECIPITAÇÃO ÁCIDA.

O experimento envolvendo a *precipitação ácida e a complexação do cálcio* foi realizado em etapas. Na primeira etapa buscou-se avaliar o teor de proteína e a quantidade de  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg presente na matéria-prima, o WPI. Em seguida foram feitos os tratamentos, seguindo o *design* experimental, descrito na seção 3.2., em que precipitado e sobrenadante foram analisados separadamente. Os resultados serão apresentados a seguir, seguindo esta ordem.

#### 4.1.1. CONCENTRAÇÕES DE PROTEÍNA TOTAL, DE $\alpha$ -LA E $\beta$ -LG NO WPI.

Feito em três repetições, o teor de proteínas totais encontrado no WPI foi de  $(86,15 \pm 0,08)$  %. A quantificação de  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg no WPI, foi feita em quatro repetições, como descrito na seção 3.1. A massa de WPI e as áreas dos cromatogramas, obtidas por integração dos picos feita pelo software do cromatógrafo, são apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7: Resultado da análise cromatográfica do WPI

Repetição	Massa de WPI (g)	Área da $\alpha$ -La	Área da $\beta$ -Lg
1	15,0002	21979044	67627720
2	14,9999	18190040	56797821
3	14,9999	22155367	65386592
4	14,9997	23900588	70239572

#### 4.1.1.1. CURVAS DE CALIBRAÇÃO DA $\alpha$ -LA E $\beta$ -LG.

A ANOVA e os parâmetros intercepto e coeficiente angular da equação de regressão, bem como os intervalos de confiança desses parâmetros para a  $\alpha$ -La, obtidos como relatório de saída do SAS<sup>®</sup>, estão apresentados a seguir:

```

-----
                                Analysis of Variance
-----

```

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	5.012398E15	5.012398E15	612.23	<.0001
Error	10	8.187179E13	8.187179E12		
Corrected Total	11	5.09427E15			

```

-----
Root MSE          2861325  R-Square    0.9839
Dependent Mean   39244463  Adj R-Sq   0.9823
Coeff Var        7.29103
-----

```

Parameter Estimates					
Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr >  t
Intercept	1	4634021	1624460	2.85	0.0172
Conc	1	18789599	759385	24.74	<.0001

```

-----
                                Parameter Estimates
-----

```

Variable	DF	95% Confidence Limits	
Intercept	1	1014499	8253543
Conc	1	17097585	20481614

```

-----

```

Figura 6: Anova da curva de calibração da  $\alpha$ -La

A ANOVA e os parâmetros intercepto e coeficiente angular da equação de regressão, bem como os intervalos de confiança desses parâmetros para a  $\beta$ -Lg, obtidos como relatório de saída do SAS<sup>®</sup>, estão apresentados a seguir:

```

-----
                        Analysis of Variance
-----

```

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	6.423398E15	6.423398E15	5689.72	<.0001
Error	14	1.580528E13	1.128949E12		
Corrected Total	15	6.439203E15			

```

-----
Root MSE          1062520  R-Square    0.9975
Dependent Mean    33429709  Adj R-Sq    0.9974
Coeff Var         3.17837
-----

```

Parameter Estimates					
Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr >  t
Intercept	1	678074	509006	1.33	0.2041
Conc	1	17773238	235625	75.43	<.0001

```

-----

```

Parameter Estimates			
Variable	DF	95% Confidence Limits	
Intercept	1	-413635	1769783
Conc	1	17267873	18278604

```

-----

```

Figura 7: Anova da curva de calibração da  $\beta$ -Lg

A equação de regressão (Equação 4) para a  $\alpha$ -La, fornecida pelo SAS<sup>®</sup> é:

$$A = 4634021 + 18789599 C \quad (4)$$

onde  $A$  é a área do pico da  $\alpha$ -La, obtida a partir da integração numérica a 205 nm, e  $C$  é a respectiva concentração, em  $mg\ ml^{-1}$

Nos cálculos feitos com os valores de área apresentados na Tabela 7, considerou-se o intervalo de confiança dos parâmetros da Equação 4 (a 95 % de probabilidade), e o fator de diluição das amostras (1:2500), verificou-se que o WPI contém  $(15, 17 \pm 3, 55)$  % de  $\alpha$ -La.

A equação de regressão (Equação 5) para a  $\beta$ -Lg, fornecida pelo SAS<sup>®</sup> é:

$$A = 678074 + 17773238 C \quad (5)$$

Nesta equação,  $A$  é a área do pico da  $\beta$ -Lg, obtida a partir da integração numérica a 205 nm, e  $C$  é a respectiva concentração, em  $mg\ ml^{-1}$

De modo análogo ao que foi feito para a  $\alpha$ -La, foram considerados os dados da Tabela 7, o intervalo de confiança dos parâmetros da equação (a 95 % de probabilidade), e o fator de diluição das amostras (1:2500), onde verificou-se que o WPI contém  $(60, 42 \pm 5, 79)$  % de  $\beta$ -Lg.

Na Figura 8 pode-se ver o cromatograma da primeira repetição, obtido ao se analisar o WPI para determinar os seus teores de  $\alpha$ -La e de  $\beta$ -Lg, respectivamente.

O primeiro pico, no centro da imagem e à esquerda ( $T_R = 14,981$  min.), corresponde ao sinal registrado pelo detector para a  $\alpha$ -La, e o segundo pico, à sua direita, ( $T_R = 16,840$  min.) corresponde ao sinal registrado pelo detector para a  $\beta$ -Lg em função do tempo.

O pico da  $\beta$ -Lg apresenta um duplo ápice característico, representando, da esquerda para a direita, as suas variantes genéticas **A** e **B**, respectivamente (FERREIRA, 2001).

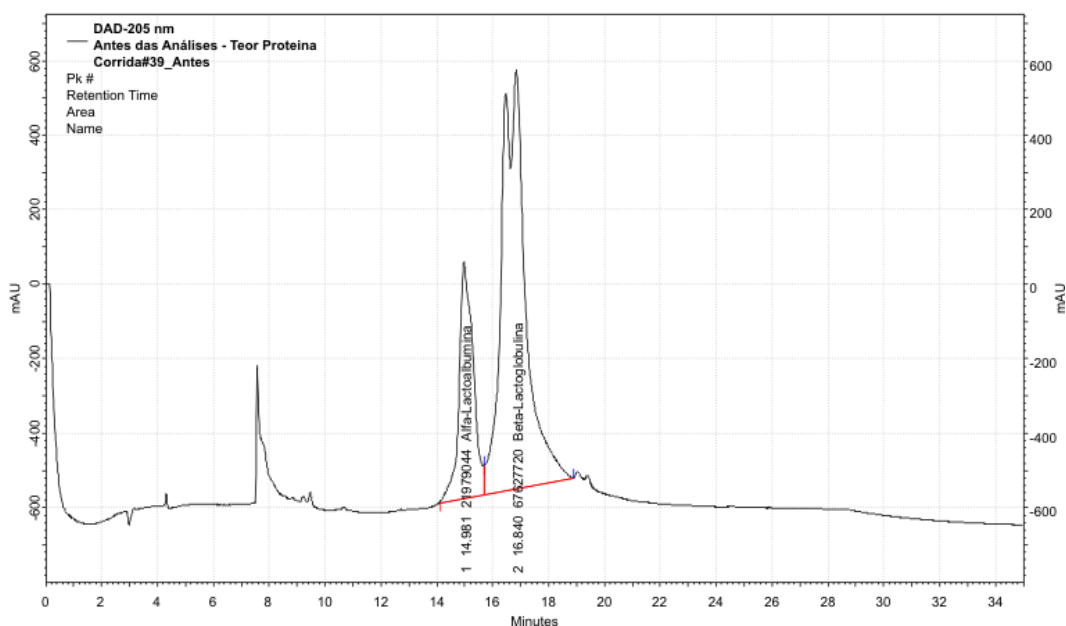


Figura 8: Perfil cromatográfico de fase reversa em coluna C18-HPLC da dispersão do WPI em Água. Diluição: 1:2500

#### 4.1.2 AVALIAÇÃO DO GRADIENTE DE CENTRIFUGAÇÃO UTILIZADO.

Foi utilizado um gradiente de centrifugação, conforme descrito na seção 3.3., com a finalidade de simular uma sedimentação suave (por repouso) da  $\alpha$ -La, reduzindo, assim, a incidência de co-precipitação de  $\beta$ -Lg no precipitado.

Para avaliar o efeito do gradiente de centrifugação, foi escolhido, ao acaso, um dos tratamentos (Trat. 5, Rep. 1), que foi repetido e analisado duas vezes. Para a primeira análise, o tratamento foi realizado utilizando o gradiente de centrifugação proposto (Tabela 5) e, para a segunda análise, utilizando apenas

uma centrifugação de  $7.200 \times g$ , por 15 minutos (Figura 9).

Da análise da Figura 9 pode-se então inferir que o gradiente de centrifugação proposto parece não exercer nenhum efeito para evitar, ou mesmo reduzir, a co-precipitação da  $\beta$ -Lg junto ao precipitado. Embora o gradiente de centrifugação tenha sido utilizado em todos os tratamentos, a análise da Figura 9 permite sugerir a utilização da centrifugação de  $7.200 \times g$ , por 15 minutos, ao invés do gradiente de centrifugação. Esta última pode ser realizada em um menor tempo, implicando em menor custo, desgaste da centrífuga, menor possibilidade de desnaturação das proteínas decorrente de aquecimento e promovendo os mesmos resultados.

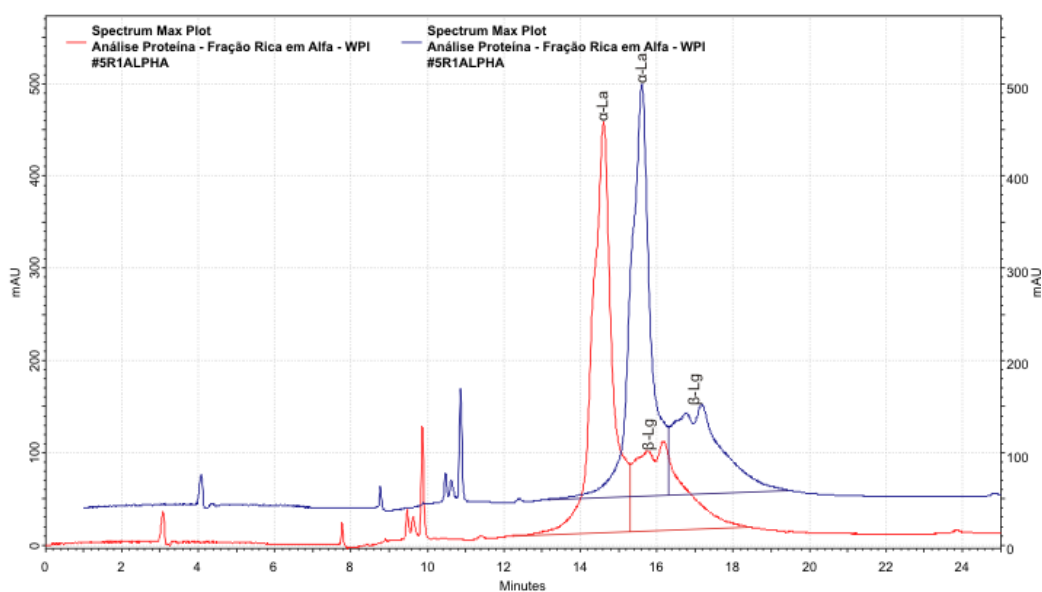


Figura 9: Cromatogramas comparativos de co-precipitação de  $\beta$ -Lg, com a utilização de gradiente de centrifugação (curva em vermelho), e sem o gradiente de centrifugação (curva em azul)

#### 4.1.3. ANÁLISE DO PRECIPITADO.

A partir das áreas dos picos apresentadas pelos cromatogramas, foram calculadas, por meio das curvas de calibração (Equações (4) e (5), respectivamente), as massas de  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg obtidas sob a forma de precipitado, para cada repetição, de cada tratamento, como apresentado na Tabela 8.

Tabela 8: Massas de  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg obtidas sob a forma de precipitado, e os respectivos valores percentuais de recuperação

Trat.	Massa de WPI (g)	Massa de Precipitado (g)		Recuperação (%)	
		Alfa	Beta	Alfa	Beta
1	6,0006	1,034 $\pm$ 0,174	0,595 $\pm$ 0,094	17,240 $\pm$ 2,894	9,915 $\pm$ 1,567
2	4,5007	0,758 $\pm$ 0,081	0,337 $\pm$ 0,003	16,844 $\pm$ 1,799	7,486 $\pm$ 0,066
3	4,5007	0,198 $\pm$ 0,026	0,330 $\pm$ 0,233	4,409 $\pm$ 0,584	7,339 $\pm$ 5,178
4	5,9997	0,958 $\pm$ 0,019	0,449 $\pm$ 0,021	15,962 $\pm$ 0,319	7,477 $\pm$ 0,352
5	6,0003	1,012 $\pm$ 0,044	0,748 $\pm$ 0,058	16,859 $\pm$ 0,740	12,458 $\pm$ 0,960
6	4,5004	0,042 $\pm$ 0,059	0,249 $\pm$ 0,119	0,933 $\pm$ 1,320	5,535 $\pm$ 2,644
7	4,5006	0,341 $\pm$ 0,019	0,194 $\pm$ 0,030	7,584 $\pm$ 0,415	4,308 $\pm$ 0,677
8	5,9999	0,203 $\pm$ 0,031	0,210 $\pm$ 0,034	3,389 $\pm$ 0,515	3,493 $\pm$ 0,558

Em seguida foram calculados os valores de *Recuperação Absoluta Média* para a  $\alpha$ -La e para a  $\beta$ -Lg, presentes no precipitado. A *Recuperação Absoluta Média* foi calculada fazendo-se a razão entre o percentual médio de recuperação de  $\alpha$ -La (ou  $\beta$ -Lg) dos tratamentos (Tabela 8) e o percentual médio de  $\alpha$ -lactoalbumina (ou  $\beta$ -Lg) originalmente presentes no WPI: (15,17 $\pm$ 3,55) % para a  $\alpha$ -La e (60,42 $\pm$ 5,79) % para a  $\beta$ -Lg, conforme apresentado na página 35. Os resultados foram expressos em termos percentuais e estão apresentados na Tabela 9, e como pode ser observado, em nenhum dos tratamentos, o precipitado obtido está isento da presença da  $\beta$ -Lg.

A Análise de Variância dos dados referentes à *Recuperação Absoluta Média* de  $\alpha$ -La no precipitado está apresentada na Tabela 10.

Os valores de probabilidade apresentados na Tabela 10 indicam que todos os efeitos principais são significativos ao nível de 5 % de probabilidade, ou seja, todos os fatores em estudo interferem, de alguma forma, na recuperação da  $\alpha$ -La.

Para avaliar a ordem de importância dos fatores em estudo, foi feito, com base nas suas respectivas Somas de Quadrados, apresentadas pela Análise de Variância, um diagrama de Pareto (Figura 10).

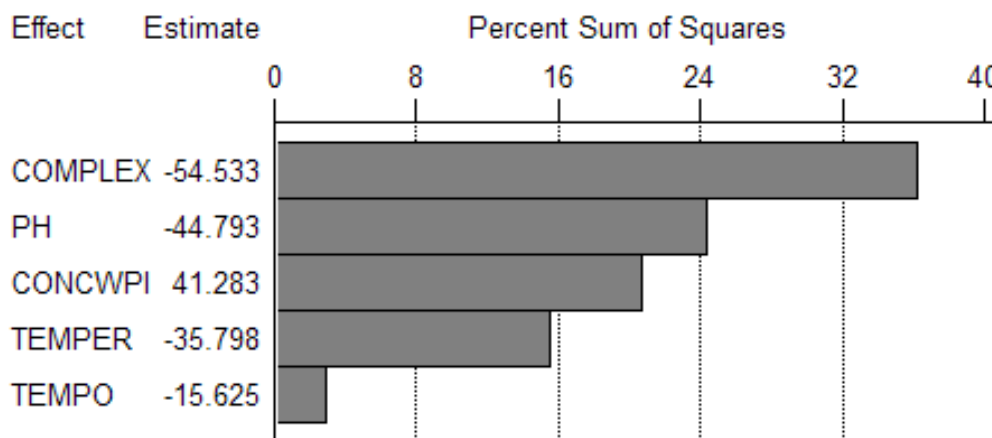


Figura 10: Diagrama de Pareto para a Soma de Quadrado dos fatores em estudo para a  $\alpha$ -La no precipitado

O diagrama de Pareto mostra que o fator em estudo mais importante na recuperação da  $\alpha$ -La é o tipo de complexante utilizado. Esse fator responde por aproximadamente 36,22 % da Soma de Quadrados do modelo, ou seja, 36,22 % da *Recuperação Absoluta Média* da  $\alpha$ -La ocorrida no precipitado é devido ao efeito do tipo de complexante utilizado, o que pode ser claramente observado ao avaliar-se visualmente os resultados das Tabelas 8 e 9.

Os demais fatores em estudo seguem uma ordem de importância decrescente, onde o mais importante é o tipo de complexante utilizado no estudo (36,22 % da soma de quadrados total), seguido pelo pH (24,44 %), pela concentração de WPI utilizada (20,76 %), pela temperatura do processo (15,61 %), e o fator que parece exercer o menor efeito, e por isso considerado como o menos importante, o tempo de agitação, que respondeu por apenas 2,97 % da soma de quadrados total.

Ainda foi possível avaliar o comportamento dos níveis dos fatores em estudo e o modo como cada um deles parece exercer efeito sobre a variável de resposta, que neste caso, é a *Recuperação Absoluta Média* da  $\alpha$ -La no precipitado. Essa avaliação foi feita tomando como base a Figura 11.

A Figura 11 sugere que o tempo de agitação apresenta uma correlação negativa com a variável de resposta, ou seja, um tratamento com tempo de agitação de 30 min. pode implicar em recuperação sensivelmente maior de  $\alpha$ -La do que para um tempo de agitação de 60 min.

Tabela 9: Resultados de Recuperação Absoluta Média (%) de  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg no precipitado enriquecido por  $\alpha$ -La

Tratamento	Recuperação Absoluta Média (%)	
	$\alpha$ -lactoalbumina	$\beta$ -lactoglobulina
1	113,644	16,409
2	111,037	12,390
3	29,067	12,146
4	105,220	12,374
5	111,134	20,620
6	6,153	9,161
7	49,991	7,130
8	22,337	5,780

Tabela 10: ANOVA para dados de recuperação absoluta média de  $\alpha$ -La no precipitado (CV=15,70 % e  $R^2=96,20$  %)

F.V.	GL	SQ	QM	F	Pr > F
TEMPO	1	976.5625	976.5625	7.52873	0.0207
TEMPER	1	5125.844	5125.844	39.51728	0.0001
pH	1	8025.472	8025.472	61.87173	0.0001
CONCWPI	1	6816.979	6816.979	52.55495	0.0001
COMPLEX	1	11895.17	11895.17	91.70488	0.0001
Modelo	5	32840.03	6568.006	51.63551	0.0001
Erro	10	1297.115	129.7115		
(Falta de Ajust.)	2	578.0185	289.0092	3.21525	0.0945
(Erro Puro)	8	719.0961	89.88701		
Total Corrigido	15	34137.15			

A Figura 11 também sugere a temperatura e o pH do processo de precipitação apresentam correlações negativas com a Recuperação Absoluta Média de  $\alpha$ -La no precipitado.

Essa figura ainda permite verificar que a concentração do WPI utilizada no experimento apresenta uma correlação positiva com a variável de resposta.

Assim, dentro da faixa de concentrações analisadas, espera-se que o uso de maiores percentuais de WPI esteja associado a uma maior recuperação de  $\alpha$ -La.

Uma outra observação a ser feita é que entre os complexantes utilizados, o citrato de sódio é o que está correlacionado a um maior rendimento em recuperação da  $\alpha$ -La, enquanto que para o lactato de sódio, a recuperação esperada seria distintamente menor.

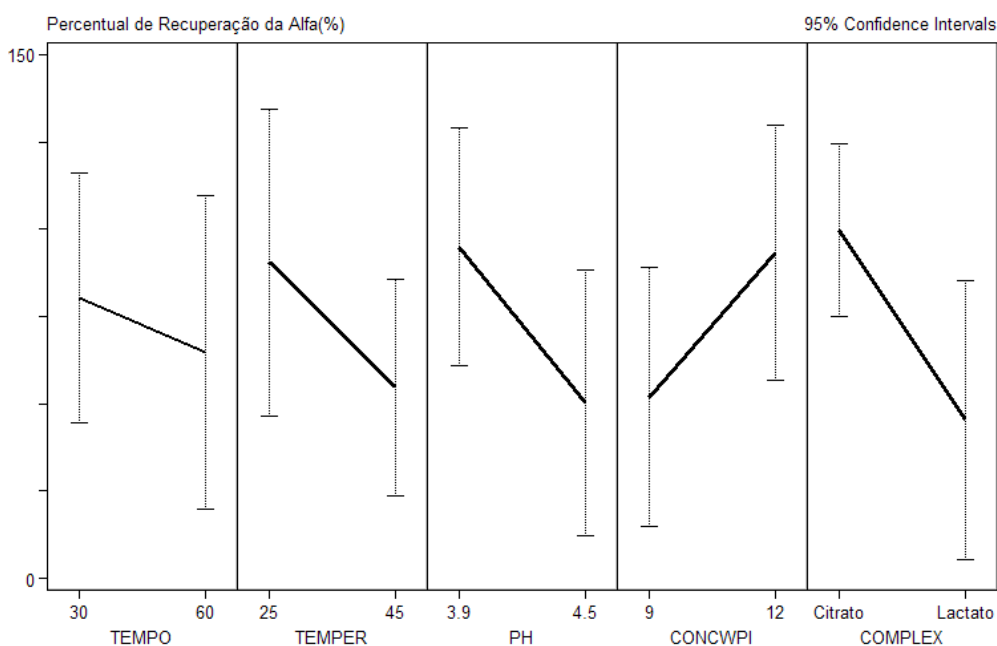


Figura 11: Comportamento dos níveis dos fatores principais em relação à Recuperação Absoluta Média da  $\alpha$ -La no precipitado

A disposição gráfica do comportamento geral da interação dois a dois entre todos os fatores em estudo, para o precipitado, está apresentada na Figura 12.

Essa figura dispõe tais informações sob a forma de uma matriz quadrada, de ordem 5, na qual a diagonal principal representa os fatores principais.

Assim, como exemplo, se tomarmos a célula que está na quinta linha e primeira coluna, poderemos inferir que para um tempo de agitação fixado em 60 minutos, e todas as demais variáveis do modelo mantidas fixas, então, para o

citrato de sódio (azul claro) é esperado um *Rendimento Absoluto Médio* em recuperação de  $\alpha$ -La superior ao que teríamos, caso fosse utilizado o lactato de sódio (azul escuro).

Foi observado que a  $\beta$ -Lg também está presente no precipitado. Embora, para alguns tratamentos, em pequena quantidade, sua presença não é desejada visto que um dos motivos em se obter uma fração rica em  $\alpha$ -La, neste caso, o precipitado, é, entre outros, o preparo de formulações alimentícias para crianças e esta deve apresentar reduzido potencial alergênico, conforme discutido anteriormente neste trabalho.

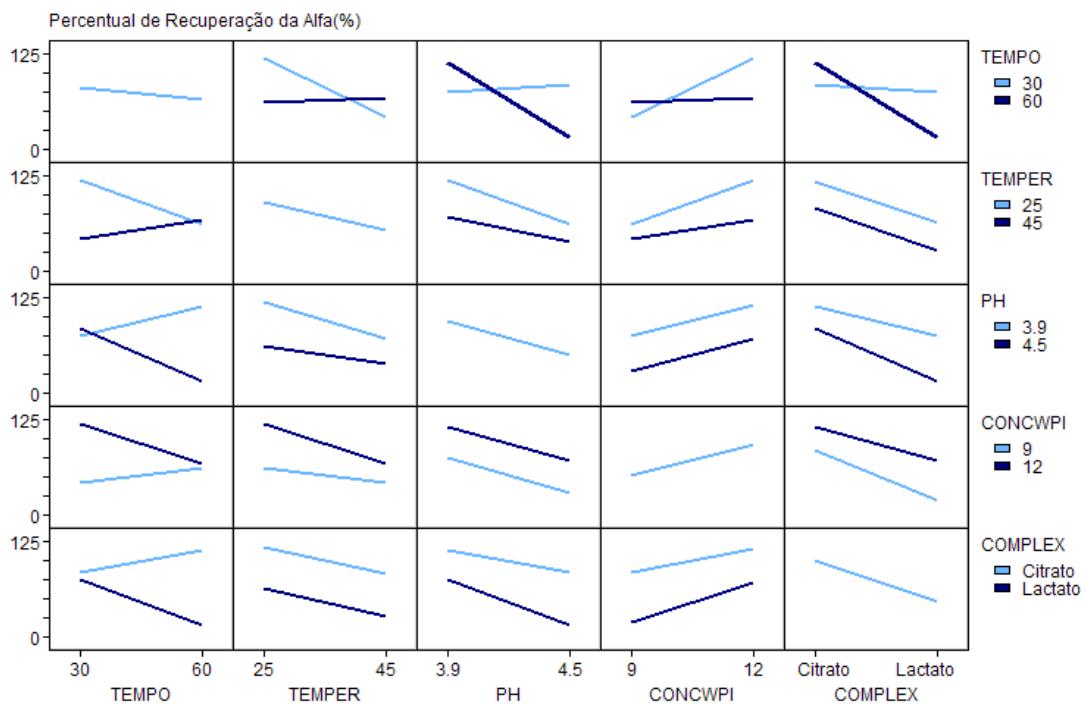


Figura 12: Comportamento geral dos fatores em estudo para a Recuperação Absoluta Média da  $\alpha$ -La no precipitado

A inspeção dos valores de probabilidade na análise de variância para recuperação absoluta média da  $\beta$ -Lg no precipitado (Tabela 11), indicam que apenas a temperatura na qual o tratamento é realizado parece estar exercendo influência na co-precipitação da  $\beta$ -Lg.

Tabela 11: ANOVA para dados de recuperação absoluta média de  $\beta$ -Lg no precipitado (CV=32,54 % e  $R^2=64,81$  %)

F.V.	GL	SQ	QM	F	Pr > F
TEMPO	1	70.18251	70.18251	4.519062	0.0594
TEMPER	1	113.9023	113.9023	7.334183	0.0220
pH	1	28.75641	28.75641	1.851629	0.2035
CONCWPI	1	52.45381	52.45381	3.377508	0.0959
COMPLEX	1	20.77081	20.77081	1.337435	0.2744
Modelo	5	286.0658	57.21316	3.683964	0.0377
Erro	10	155.3033	15.53033		
(Falta de Ajust.)	2	49.07151	24.53576	1.847715	0.2189
(Erro Puro)	8	106.2318	13.27897		
Total Corrigido	15	441.369			

A representação gráfica dos efeitos principais, para a Recuperação Absoluta Média da  $\beta$ -Lg no precipitado, Figura 13, sugere que se o tratamento for realizado a uma temperatura maior, próxima aos 45 °C, então pode-se esperar uma co-precipitação menor de  $\beta$ -Lg no precipitado.

Para a presente situação, não foi necessário avaliar os demais fatores visto que estes não são significativos ao nível de 5 % de probabilidade, conforme mostrado na análise de variância da Tabela 11.

Um aumento deliberado na temperatura de processo com o objetivo de se reduzir a co-precipitação da  $\beta$ -Lg não é recomendado. Quando a  $\alpha$ -La está sem a presença do íon cálcio em sua estrutura, esta apresenta-se com baixa estabilidade térmica e, conforme relatado por CHATTERTON et al. (2006), estudos de calorimetria diferencial de varredura mostraram que sem o cálcio sua desnaturação pode ocorrer em temperaturas tão baixas quanto 43 °C, contrastando com a temperatura de 68 °C, quando está ligada ao cálcio.

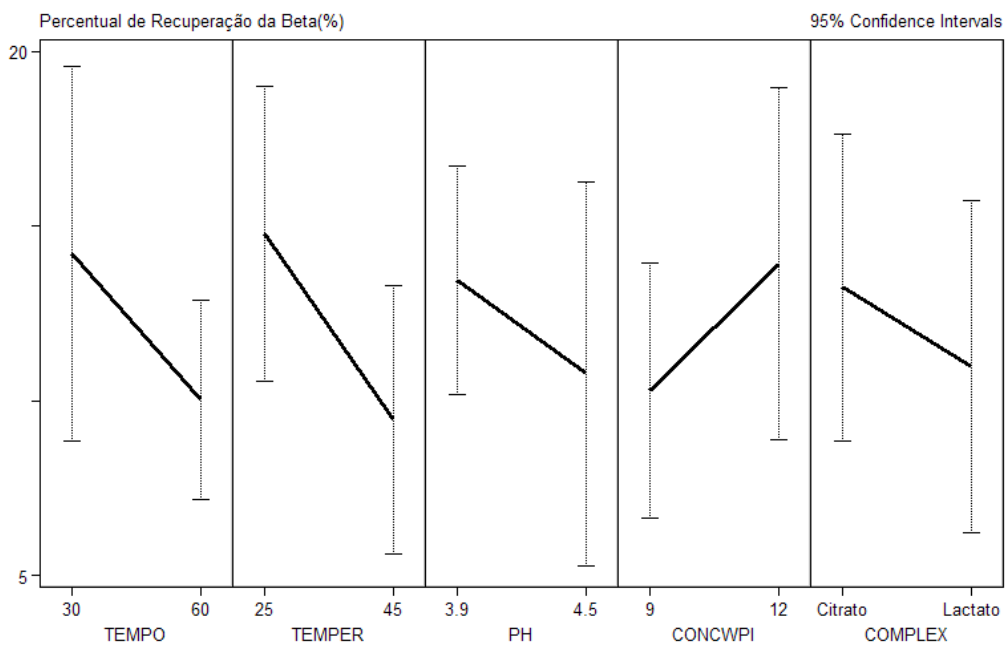


Figura 13: Comportamento dos níveis dos fatores principais em relação à Recuperação Absoluta Média da  $\beta$ -Lg no precipitado

#### 4.1.3.1. OTIMIZAÇÃO DA RECUPERAÇÃO DE $\alpha$ -LA NO PRECIPITADO

Foi estabelecida uma *função-objetivo* que permitiu, dentro da faixa das condições experimentais estudadas, determinar um ponto de otimização, considerando tanto a precipitação da  $\alpha$ -La quanto a co-precipitação da  $\beta$ -Lg.

A função-objetivo, construída com o auxílio do SAS/ADX<sup>®</sup>, foi estabelecida, interativamente, em termos de se *maximizar* a *Recuperação Absoluta Média* da  $\alpha$ -La e *minimizar* a *Recuperação Absoluta Média* da  $\beta$ -Lg, ou seja, minimizar sua co-precipitação.

O resultado gráfico obtido a partir dos cálculos de otimização está apresentado na Figura 14.

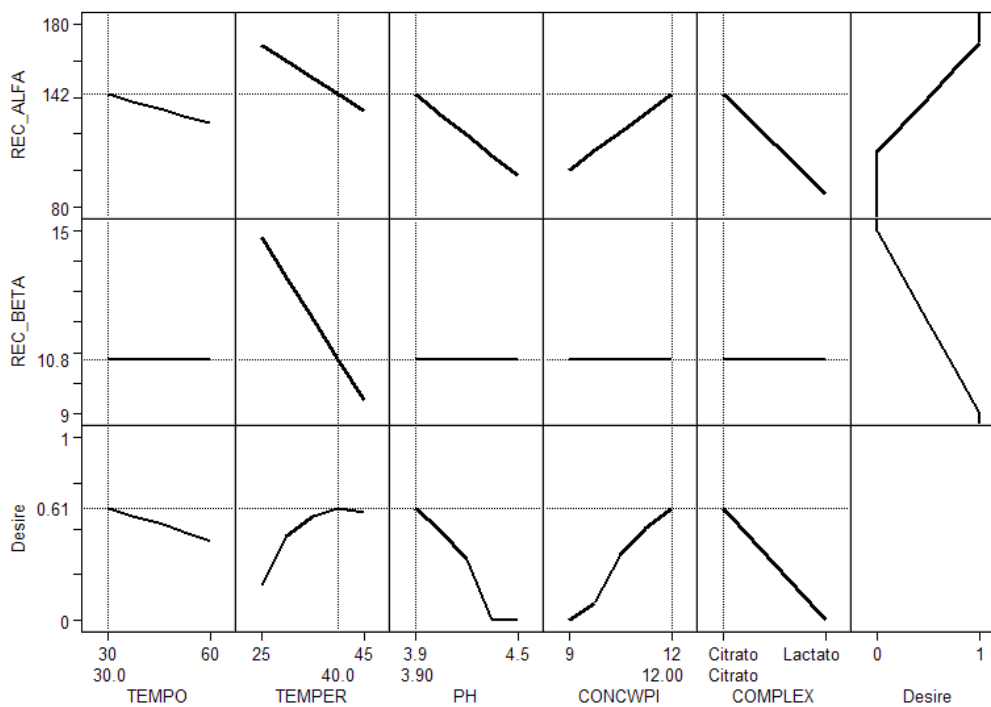


Figura 14: Valores ótimos dos parâmetros, obtidos pela *função-objetivo*, estabelecida para maximizar a Recuperação Absoluta Média da  $\alpha$ -La e de minimizar a Recuperação Absoluta Média da  $\beta$ -Lg (co-precipitação) no precipitado

Na Figura 14 os dados estão dispostos sob a forma de uma matriz de três linhas e seis colunas. Nas duas primeiras linhas dessa matriz estão as variáveis de resposta, Recuperação Absoluta Média da  $\alpha$ -La e da  $\beta$ -Lg, e nas colunas, cada um dos fatores em estudo. O algoritmo de otimização executado pelo software para os dados experimentais é o mesmo descrito por DERRINGER e SUICH (1980). O resultado da otimização que maximiza a Recuperação Absoluta Média de  $\alpha$ -La e minimiza a co-precipitação da  $\beta$ -Lg, informado pela função-objetivo na Figura 14, é apresentado na Tabela 12.

Tabela 12: Resultados de otimização, obtidos pela *função-objetivo*, para maximizar a Recuperação Absoluta Média de  $\alpha$ -La e minimizar a Recuperação Absoluta Média de  $\beta$ -Lg no precipitado

Variável (Fator)	Descrição	Valores de Otimização
TEMPO	Tempo de agitação (min.)	30 minutos
TEMPER	Temperatura (°C)	40 °C
pH	Valor de pH ajustado com ácido.	3,90
CONCWPI	Concentração % (m/m) de WPI	12,0 %
COMPLEX	Tipo de Complexante.	Citrato*

\* Citrato de sódio tribásico

#### 4.1.3.2. ESTUDO COMPARATIVO DA CO-PRECIPITAÇÃO DE $\beta$ -Lg NO PRECIPITADO.

Embora os tratamentos tivessem sido submetidos a um gradiente de centrifugação, com a intenção de reduzir o efeito de co-precipitação da  $\beta$ -Lg, verificou-se que este não apresentou nenhum efeito, conforme apresentado na seção 4.1.2, e que a presença de  $\beta$ -Lg foi confirmada no precipitado de todos os tratamentos. A relação  $\alpha$ -La/ $(\alpha$ -La+ $\beta$ -Lg), a partir dos dados da Tabela 9 (página 40) representa, em termos percentuais, o *grau de pureza* do precipitado em relação à  $\alpha$ -La, para cada tratamento, e é apresentada na Tabela 13.

Conforme pode ser observado, nenhum dos tratamentos foi capaz de recuperar a  $\alpha$ -La com menos de 10 % de contaminação com  $\beta$ -Lg.

A Figura 15 é um gráfico que informa, em termos comparativos, para cada um dos tratamentos, a *Recuperação Absoluta Média* de  $\alpha$ -La (em barras na cor azul escuro) e de  $\beta$ -Lg (barras na cor azul claro), no precipitado.

A Figura 16 é um dendrograma que mostra a possibilidade de se acomodar os tratamentos em dois grupos distintos. Um grupo (na cor azul), são os tratamentos que apresentam alta *Recuperação Absoluta Média* de  $\alpha$ -La e relativamente baixa co-precipitação de  $\beta$ -Lg. O outro grupo (cor vermelha) acomodaria os tratamentos com menor capacidade de *Recuperação Absoluta Média* de  $\alpha$ -La e maior percentual relativo de co-precipitação de  $\beta$ -Lg.

Tabela 13: Pureza dos precipitados dos tratamentos em relação a  $\alpha$ -La

	Tratamentos							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Pureza em $\alpha$ -La % (m/m)	87,38	89,96	70,53	89,48	84,35	40,18	87,52	79,44

A formação dos grupos permite verificar a influência do fator *tipo de complexante*: no primeiro grupo predominam os tratamentos nos quais o complexante foi o citrato de sódio tribásico, e no segundo grupo, os tratamentos que tiveram o lactato de sódio como complexante.

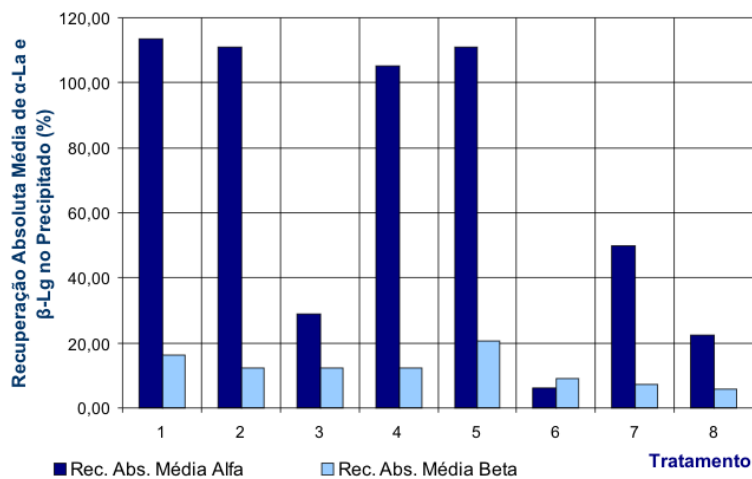


Figura 15: Comparativo da co-precipitação de  $\beta$ -Lg entre diferentes tratamentos

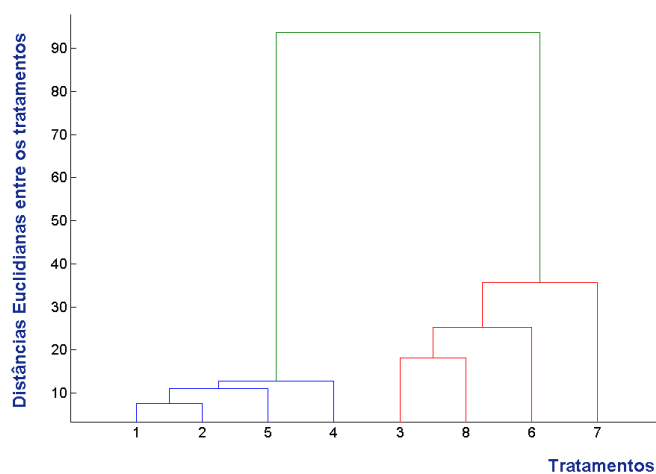


Figura 16: Análise de agrupamento dos tratamentos: recuperação de  $\alpha$ -La no precipitado

Considerando apenas os fatores mais relevantes na recuperação da  $\alpha$ -La no precipitado (tipo de complexante, pH e concentração de WPI), pode-se traçar as curvas de nível para a variável de resposta (Recuperação Absoluta Média de  $\alpha$ -La no Precipitado), obtendo, assim, um gráfico como o que está representado pela Figura 17. Nesta figura, as curvas de nível sugerem que é possível aumentar a recuperação de  $\alpha$ -La sob a forma de precipitado à medida em que o pH é ajustado para valores próximos a 3,9 e à medida em que a concentração do WPI utilizada é ajustada para valores que se aproximam de 12 %

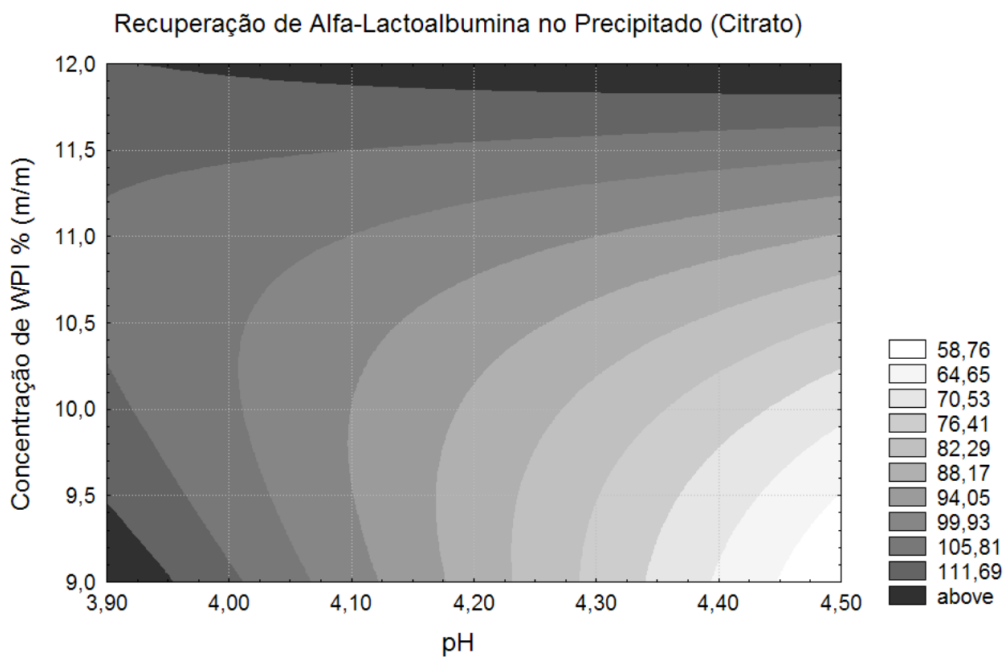


Figura 17: Curvas de nível para a Recuperação Absoluta Média de  $\alpha$ -La no precipitado, considerando os três fatores mais importantes: pH, Concentração de WPI e Tipo de Complexante (Citrato)

#### 4.1.4. ANÁLISE DO SOBRENADANTE.

A  $\beta$ -Lg, embora citada como potencial fonte de alergia em crianças, tem amplas aplicações industriais. Por isso pode haver interesse em recuperá-la a partir do WPI, o que justifica uma análise do sobrenadante dos tratamentos.

As descrições dos resultados gráficos são análogas às que foram apresentadas para a análise do precipitado, seção 4.1.3, e por isso não serão repetidas aqui, apenas serão acrescentados alguns comentários que foram julgados necessários.

A Tabela 14 apresenta os resultados (média das repetições) obtidos para o sobrenadante de cada um dos tratamentos.

Tabela 14: Massas de  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg obtidas no sobrenadante, e os respectivos valores percentuais de recuperação

Trat.	Massa de WPI (g)	Massa de Precipitado (g)		Recuperação (%)	
		Alfa	Beta	Alfa	Beta
1	6,0006	0,000 $\pm$ 0,000	3,778 $\pm$ 0,027	0,000 $\pm$ 0,000	62,954 $\pm$ 0,443
2	4,5007	0,000 $\pm$ 0,000	3,036 $\pm$ 0,040	0,000 $\pm$ 0,000	67,464 $\pm$ 0,881
3	4,5007	0,000 $\pm$ 0,000	2,946 $\pm$ 0,017	0,000 $\pm$ 0,000	65,465 $\pm$ 0,372
4	5,9997	0,000 $\pm$ 0,000	3,519 $\pm$ 0,058	0,000 $\pm$ 0,000	58,659 $\pm$ 0,961
5	6,0003	0,482 $\pm$ 0,011	3,880 $\pm$ 0,043	8,035 $\pm$ 0,176	64,665 $\pm$ 0,719
6	4,5004	0,703 $\pm$ 0,018	3,464 $\pm$ 0,010	15,619 $\pm$ 0,395	76,977 $\pm$ 0,211
7	4,5006	0,000 $\pm$ 0,000	2,642 $\pm$ 0,009	0,000 $\pm$ 0,000	58,704 $\pm$ 0,197
8	5,9999	0,223 $\pm$ 0,008	3,534 $\pm$ 0,055	3,720 $\pm$ 0,141	58,896 $\pm$ 0,909

A Tabela 15 apresenta os valores de *Recuperação Absoluta Média* de  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg no sobrenadante dos tratamentos.

Tabela 15: Recuperação Absoluta Média (%) de  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg no sobrenadante

Tratamento	Recuperação Absoluta Média (%)	
	$\alpha$ -lactoalbumina	$\beta$ -lactoglobulina
1	0,000	104,194
2	0,000	111,659
3	0,000	108,350
4	0,000	97,085
5	52,965	107,026
6	102,962	127,403
7	0,000	97,160
8	24,520	97,478

As Tabelas 14 e 15 mostram que para alguns tratamentos (1,2,3,4 e 7) a  $\alpha$ -La no sobrenadante se encontra ausente ou presente em quantidade não detectável nas condições da análise, e que a recuperação da  $\beta$ -Lg assume elevados valores percentuais de *Recuperação Absoluta Média (%)*.

A Análise de Variância dos dados referentes à *Recuperação Absoluta Média* de  $\alpha$ -La no sobrenadante está apresentada na Tabela 16.

Conforme pode ser observado pelos valores de probabilidade, a *Recuperação Absoluta Média* de  $\alpha$ -La no sobrenadante é influenciada apenas pela temperatura do processo e pelo pH. Os demais fatores não são significativos ao nível de 5 % de probabilidade. O diagrama de Pareto apresentado pela Figura 18 mostra que, para a recuperação de  $\alpha$ -La no sobrenadante, mais de 50 % da soma de quadrados do modelo é devido ao fator pH, seguido pelo segundo fator mais importante, a temperatura de processo, que responde por quase 30 % da soma de quadrados total.

Nesse diagrama, as barras em cinza escuro correspondem aos fatores significativos, e barras cinza claro correspondem aos fatores não significativos, ao nível de 5 % de significância, respectivamente

Tabela 16: ANOVA para dados de recuperação absoluta média de  $\alpha$ -La no sobrenadante (CV=93,92 % e  $R^2=77,43$  %)

F.V.	GL	SQ	QM	F	Pr > F
TEMPO	1	1553.72	1553.72	3.093037	0.109133
TEMPER	1	4831.605	4831.605	9.618423	0.011225
pH	1	9110.75	9110.75	18.13705	0.001666
CONCWPI	1	181.6228	181.6228	0.361562	0.561023
COMPLEX	1	1553.72	1553.72	3.093037	0.109133
Modelo	5	17231.42	3446.284	6.860621	0.005031
Erro	10	5023.282	502.3282		
(Falta de Ajust.)	2	5013.228	2506.614	1994.525	0.0001
(Erro Puro)	8	10.05398	1.256748		
Total Corrigido	15	22254.7			

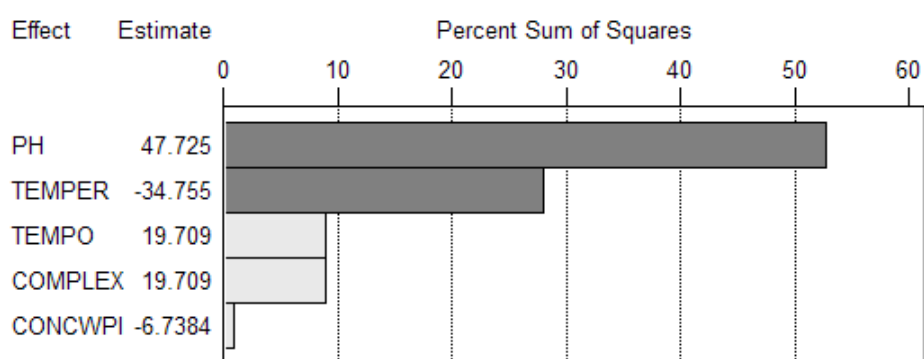


Figura 18: Diagrama de Pareto para a Soma de Quadrados dos fatores em estudo para a  $\alpha$ -La no sobrenadante

O gráfico da Figura 19 sugere que, em menores valores de pH, a *Recuperação Absoluta Média* de  $\alpha$ -La é menor, o que é muito interessante para o caso de se desejar recuperar a  $\beta$ -Lg, a partir do sobrenadante, com baixa contaminação de  $\alpha$ -La, e o mesmo raciocínio vale para o fator temperatura de processo: maior temperatura pode resultar em menor contaminação pela  $\alpha$ -La.

Foi verificado que a *Recuperação Absoluta Média* de  $\beta$ -Lg no sobrenadante é influenciada por três fatores (Figura 20, linhas hachuradas em cinza escuro) que são a temperatura de processo, a concentração de WPI, e o tipo de complexante utilizado. Em escala industrial o controle conjunto desses fatores pode implicar em maior recuperação de  $\beta$ -Lg a partir do WPI.

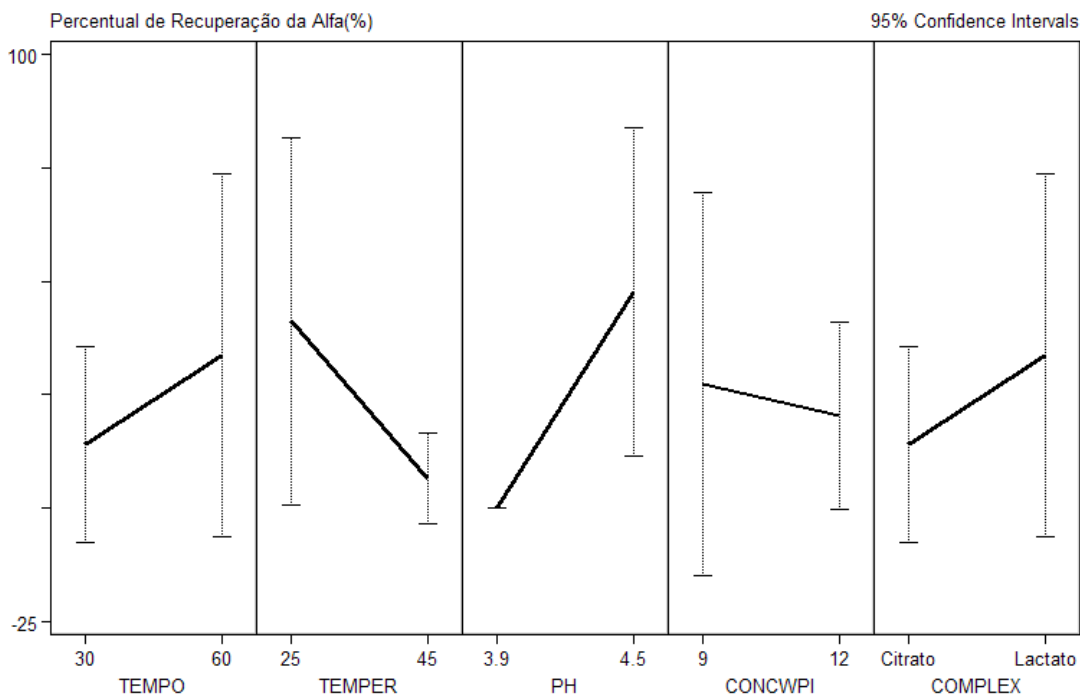


Figura 19: Comportamento dos níveis dos fatores principais em relação a *Recuperação Absoluta Média* de  $\alpha$ -La no sobrenadante

Effect	Estimate	Std Error	t Ratio	P Value
TEMPO	4.2626	2.3969	1.7784	0.1057
TEMPER	-12.669	2.3969	-5.2855	0.0004
PH	1.9629	2.3969	0.81893	0.4319
CONCWPI	-9.7874	2.3969	-4.0834	0.0022
COMPLEX	6.1801	2.3969	2.5784	0.0275

Figura 20: Valores de probabilidade (*P-Value*), obtidos pelo uso do teste-t, usados para avaliar a significância dos fatores na *Recuperação Absoluta Média* de  $\beta$ -Lg no sobrenadante

Na Figura 21 é apresentado um diagrama de Pareto, mostrando que, entre os fatores significativos, a temperatura de processo é o de maior importância. Este fator responde por mais da metade da soma de quadrados, seguido pela concentração utilizada de WPI, que responde por aproximadamente 30 % da soma de quadrados do modelo. Juntos, esses dois fatores respondem por, aproximadamente, 80 % da soma de quadrados total.

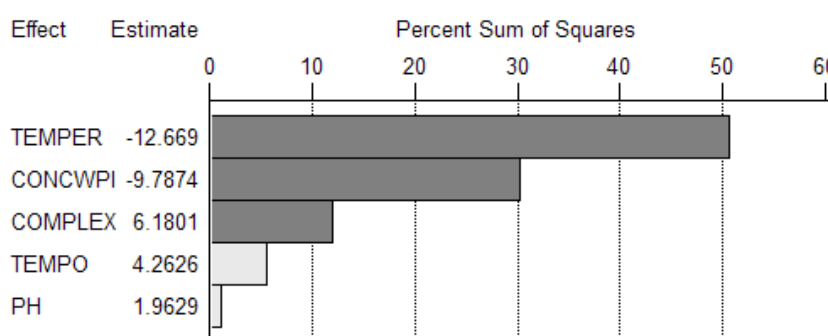


Figura 21: Diagrama de Pareto para a Soma de Quadrados dos fatores em estudo para  $\beta$ -Lg no sobrenadante

O fator significativo de menor relevância para a *Recuperação Absoluta Média* de  $\beta$ -Lg no sobrenadante é o tipo de complexante, e os outros dois fatores avaliados não apresentaram-se como significativos ao nível de 5 % de probabilidade. Para complementar os resultados apresentados na Figura 20 a Figura 22 evidencia que menores temperaturas de processo poderão resultar em maior recuperação de  $\beta$ -Lg a partir do sobrenadante dos tratamentos. Maiores recuperações de  $\beta$ -Lg também serão esperadas se forem utilizadas menores concentrações de WPI e, de modo contrário, aos resultados obtidos quando o objetivo era o de se recuperar a  $\alpha$ -La por precipitação, a utilização do ácido láctico, ao invés de se utilizar o ácido cítrico, poderá fornecer melhores resultados em termos de recuperação de  $\beta$ -Lg.

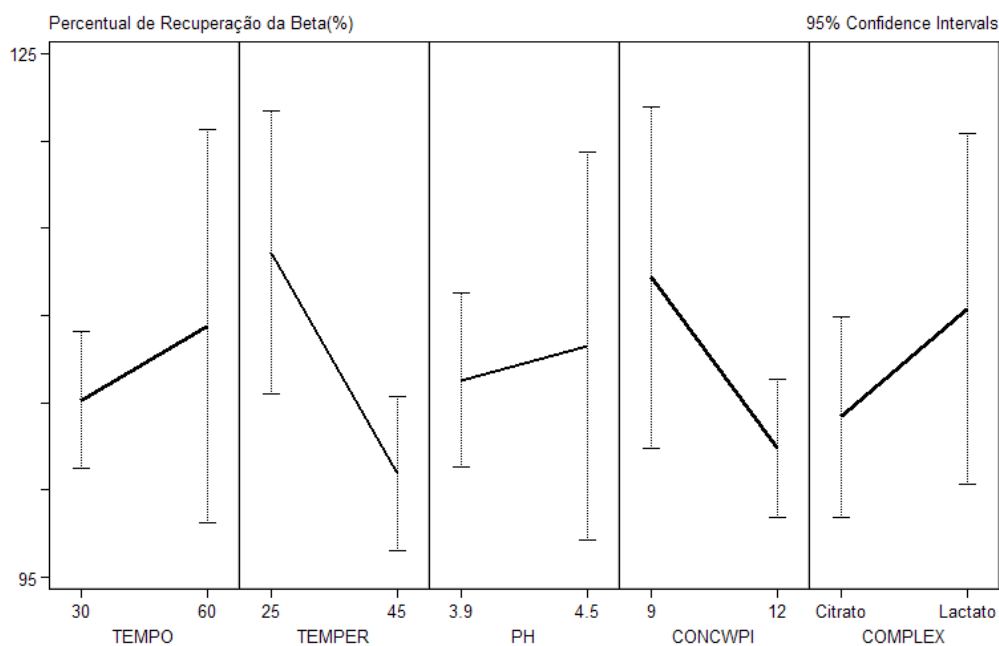


Figura 22: Comportamento dos níveis dos fatores principais em relação à *Recuperação Absoluta Média* de  $\beta$ -Lg no sobrenadante

Assim, a recuperação da  $\beta$ -Lg a partir do sobrenadante, diferente do que ocorre com a  $\alpha$ -La, se deve a precipitação pelo abaixamento do pH, e não por efeito de complexação, visto que a  $\beta$ -Lg não é uma metaloproteína, e outros acidificantes, de menor custo, como o HCL, poderiam ser utilizados em substituição ao ácido láctico, não sendo, portanto, necessária a adição de nenhum sal complexante.

#### 4.1.4.1. OTIMIZAÇÃO DA RECUPERAÇÃO DE $\beta$ -LG. NO SOBRENADANTE

De modo análogo ao que foi feito na seção 4.1.3.1., estabeleceu-se uma *função-objetivo* para fazer a otimização de recuperação da  $\beta$ -Lg no sobrenadante, dentro da faixa de valores estudados neste experimento. Na construção desta *função-objetivo* foram impostas duas restrições: maximizar a *Recuperação Absoluta Média* de  $\beta$ -Lg no sobrenadante e minimizar a *Recuperação Absoluta Média* de  $\alpha$ -La, considerada, para este processo, como um contaminante indesejável.

Após a execução do algoritmo de otimização, chegou-se ao resultado gráfico apresentado pela Figura 23.

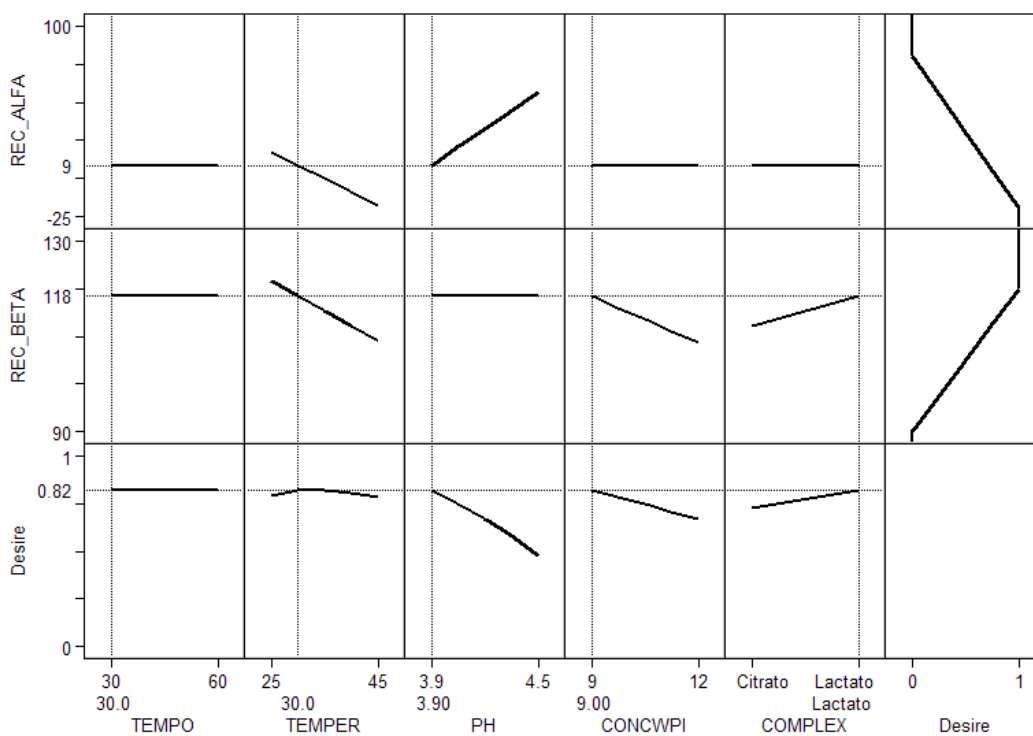


Figura 23: Resultado de otimização, feito pela *função-objetivo*, estabelecida para maximizar a *Recuperação Absoluta Média* de  $\beta$ -Lg no sobrenadante, e minimizar a co-recuperação com  $\alpha$ -La

É importante ressaltar, que para o caso de se recuperar a  $\beta$ -Lg a partir do sobrenadante dos tratamentos, uma pequena contaminação com  $\alpha$ -La não acarretaria problemas, do ponto de vista em se causar alergia no consumidor, visto que a  $\alpha$ -La é uma proteína que se encontra naturalmente presente no leite humano.

Os resultados ótimos que maximizam a *Recuperação Absoluta Média* de  $\beta$ -Lg no sobrenadante e minimizam a co-recuperação de  $\alpha$ -La, estão apresentados na Tabela 17, cujas informações foram obtidas da Figura 23.

Tabela 17: Resultados de otimização para maximizar a Recuperação Absoluta Média de  $\beta$ -Lg e minimizar a Recuperação Absoluta Média de  $\alpha$ -La no sobrenadante

Variável (Fator)	Descrição	Valores de Otimização
TEMPO	Tempo de Agitação (min)	30 minutos
TEMPER.	Temperatura (°C)	30 °C
pH	Valor de pH ajustado com ácido.	3,90
CONCWPI	Concentração % (m/m) de WPI.	9,0 %
COMPLEX	Tipo de Complexante.	Lactato

A relação  $\beta\text{-Lg}/(\alpha\text{-La}+\beta\text{-Lg})$ , a partir dos dados da Tabela 15 (página 52) representa, em termos percentuais, o *grau de pureza* do sobrenadante em relação  $\beta$ -Lg, para cada tratamento, e é apresentada na Tabela 18.

Diferentemente do que foi observado para a recuperação de  $\alpha$ -La no precipitado, que apresentou contaminação por co-precipitação de  $\beta$ -Lg em todos os tratamentos, a Figura 24 mostra que, para o caso da recuperação de  $\beta$ -Lg a partir do sobrenadante, apenas os tratamentos 5, 6 e 8 apresentaram quantidades detectáveis de  $\alpha$ -La.

Tabela 18: Pureza dos sobrenadantes dos tratamentos em relação a  $\beta$ -Lg

	Tratamentos							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Pureza em $\beta$ -Lg % (m/m)	100,00	100,00	100,00	100,00	66,90	55,30	100,00	79,90

A Figura 25 é um dendrograma que mostra uma maior similaridade entre os tratamentos 1,2,3,4 e 7 (cor azul). Estes tratamentos formam o grupo dos tratamentos capazes de recuperar a  $\beta$ -Lg, cuja co-recuperação de  $\alpha$ -La não é observada.

Os tratamentos 5,6 e 8 (cor vermelha) são os que apresentam maior dissimilaridade e correspondem aos tratamentos que recuperam a  $\beta$ -Lg, porém com significativa co-precipitação de  $\alpha$ -La.

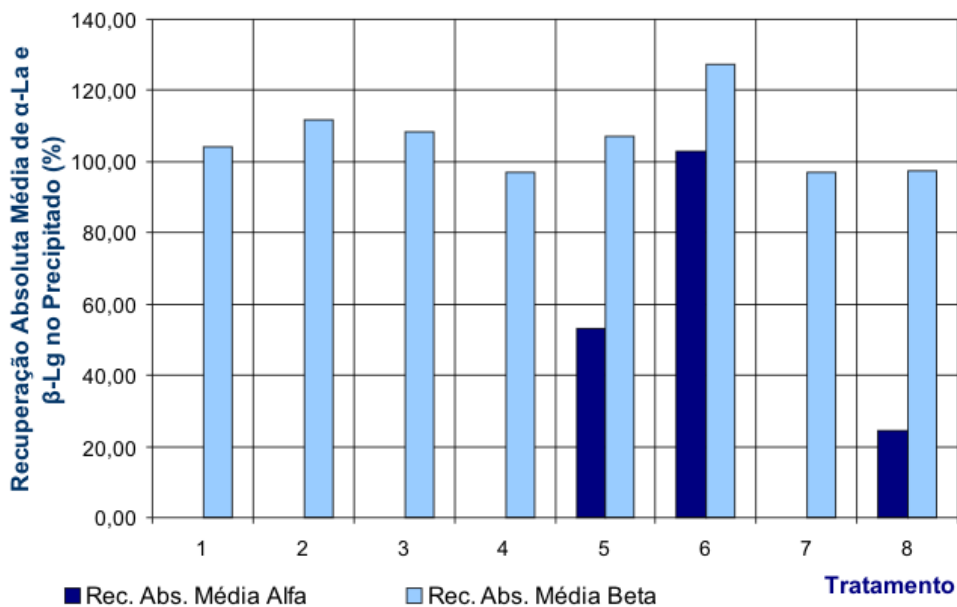


Figura 24: Comparativo da co-recuperação de  $\alpha$ -La entre diferentes tratamentos

A formação dos grupos permitiu verificar que os tratamentos cuja co-precipitação de  $\alpha$ -La foi detectada (tratamentos 5, 6 e 8) foram aqueles que tiveram o valor de pH ajustado para 4,5.

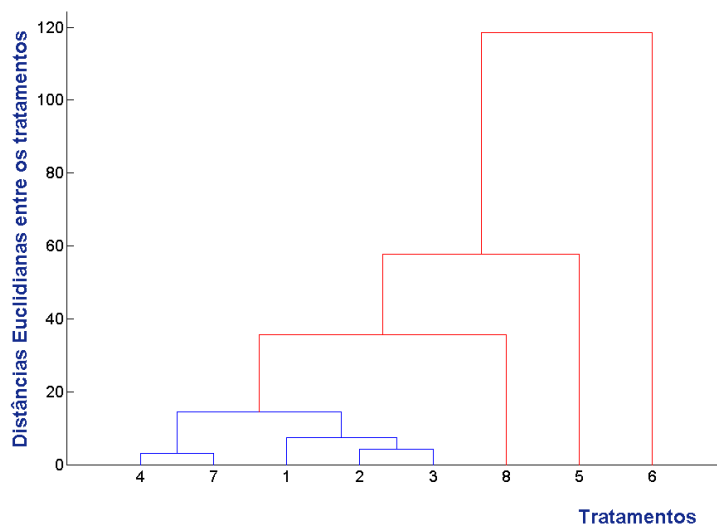


Figura 25: Análise de agrupamento dos tratamentos: recuperação de  $\beta$ -Lg no sobrenadante

Avaliou-se o comportamento da variável de resposta considerando-se o tipo de complexante como um fator fixo e avaliando-se o efeito dos outros dois fatores significativos, conforme apresentado no resultado gráfico da Figura 26.

Pode-se observar que valores de temperatura de processo que se aproximam dos 25 °C e valores de concentração que se aproximam dos 9 % estão associados a correspondentes aumentos em recuperação de  $\beta$ -Lg a partir do sobrenadante.

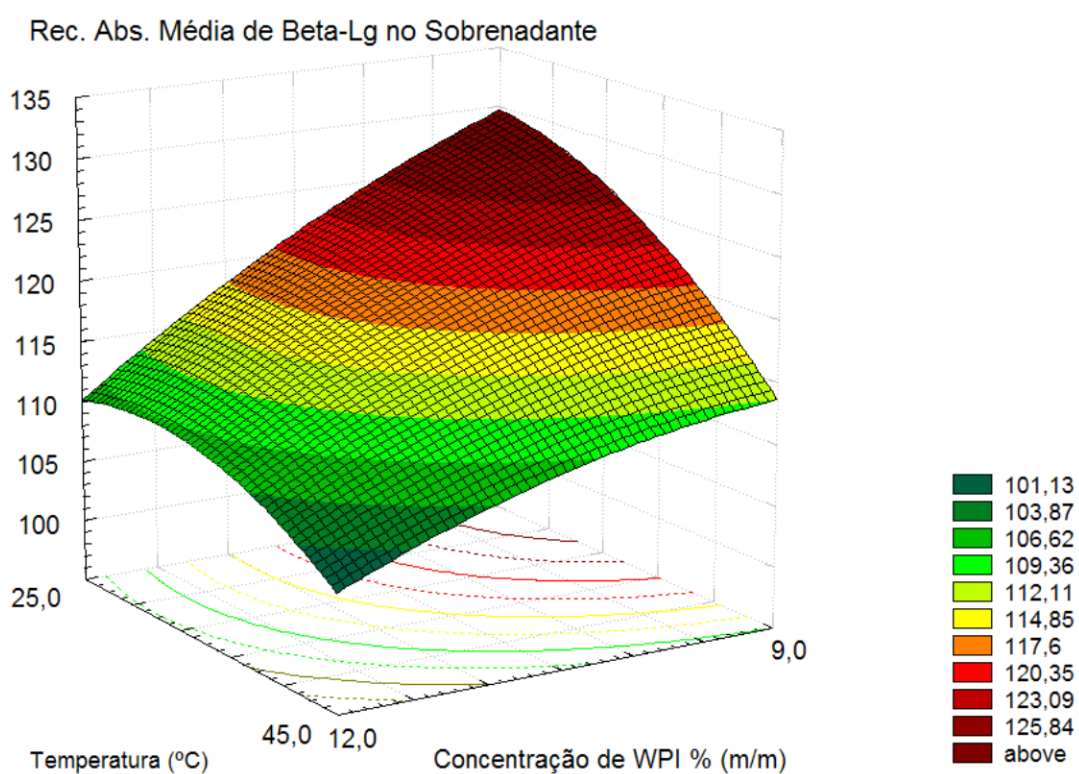


Figura 26: Recuperação Absoluta Média de  $\beta$ -Lg no sobrenadante em função dos fatores temperatura e concentração de WPI (acidificante=ácido láctico)

#### 4.1.5. OTIMIZAÇÃO GLOBAL PARA O PRECIPITADO E O SOBRENADANTE.

Foi possível avaliar uma condição global de otimização para o experimento de precipitação com o objetivo de recuperar, dentro da faixa de valores experimentados, a maior quantidade de  $\alpha$ -La, sob a forma de *precipitado*, e a maior quantidade de  $\beta$ -Lg, sob a forma de *sobrenadante*, considerando valores mínimos de co-recuperação em ambas as frações. Assim, foi estabelecida uma nova *função-objetivo*, associada a quatro restrições simultâneas:

- maximizar a recuperação de  $\alpha$ -La no precipitado;
- maximizar a recuperação de  $\beta$ -Lg no sobrenadante;
- minimizar a co-precipitação de  $\beta$ -Lg no precipitado, e
- minimizar a co-recuperação de  $\alpha$ -La no sobrenadante.

O resultado da otimização está apresentado graficamente pela Figura 27.

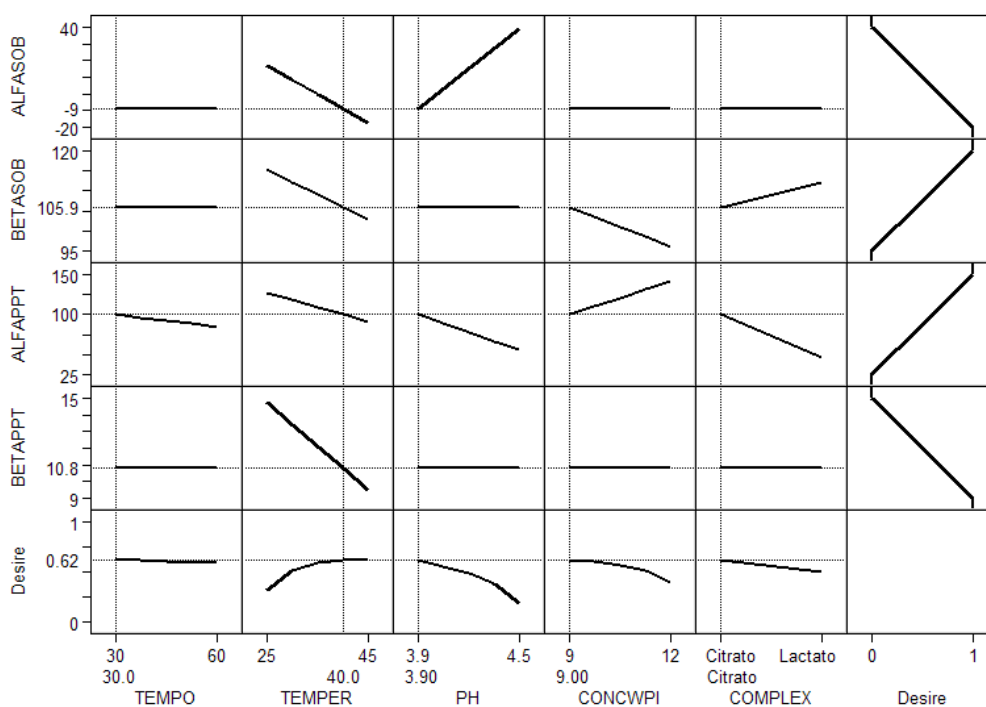


Figura 27: Otimização global do experimento para precipitado e sobrenadante

Os resultados de otimização apresentados pela Figura 27 sugerem que as condições: tempo de processo igual a 30 minutos, temperatura de processo igual a 40 °C, pH ajustado para 3,9 com ácido cítrico e uma concentração de WPI de 9 %, possam ser, dentro da faixa de valores experimentados, as condições que otimizam a *função-objetivo*, considerando as quatro restrições apresentadas.

Nestas condições, os valores preditos pelo modelo estatístico para a recuperação de  $\alpha$ -La e de  $\beta$ -Lg, no precipitado e no sobrenadante, são (Tabela 19):

Tabela 19: Previsão de recuperação de  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg, no precipitado e no sobrenadante, nas condições de otimização global

	Estimativas para a <i>Recuperação Absoluta Média</i> (%).	
	$\alpha$ -lactoalbumina	$\beta$ -lactoglobulina
Precipitado	100,40 $\pm$ 6,52	10,78 $\pm$ 1,35
Sobrenadante	-8,69 $\pm$ 9,48	105,90 $\pm$ 2,32

## CONCLUSÕES

---

O experimento envolvendo a precipitação por adição de ácido e a complexação do íon cálcio presente no interior da  $\alpha$ -La foi feito com dois objetivos. O primeiro, e foco deste trabalho, recuperar uma fração enriquecida em  $\alpha$ -La (um precipitado) a partir do isolado protéico de soro de leite comercial, a qual pode ser utilizada em formulações infantis com reduzido potencial alergênico. O segundo objetivo é o de se recuperar uma fração enriquecida em  $\beta$ -Lg (sobrenadante), visto que esta proteína, embora apontada como causadora de alergia em crianças, encontra amplas aplicações na indústria de alimentos.

Foram estudados, separadamente, o precipitado e o sobrenadante dos tratamentos, os quais foram analisados por cromatografia líquida RP-C18-HPLC e os resultados submetidos a análises estatísticas utilizando-se o pacote estatístico SAS<sup>®</sup>. Foram estudados simultaneamente cinco fatores: tempo e temperatura de incubação, pH, tipo de agente complexante e concentração de WPI.

Para a recuperação de  $\alpha$ -La a partir do precipitado, verificou-se que as melhores condições experimentais foram:

- pH 3,9;
- tempo de incubação igual a 30 minutos;
- temperatura de incubação de 40 °C;
- concentração de WPI igual a 12 % e
- a utilização do citrato de sódio anidro tribásico, como complexante.

Nestas condições foi verificado, através do estabelecimento de uma *função-objetivo*, a maximização de recuperação de  $\alpha$ -La e minimização da recuperação de  $\beta$ -Lg no precipitado, respectivamente.

Verificou-se que, em nenhum dos tratamentos, o precipitado estava isento da presença de  $\beta$ -Lg.

A presença de  $\beta$ -Lg no precipitado corresponde à sua *co-precipitação de  $\beta$ -Lg*, e os tratamentos 1,2,4, e 5, definidos na seção 3.2, Tabela 4, foram os que apresentaram o menor percentual relativo de co-precipitação e maior rendimento em recuperação, sendo, portanto, entre os tratamentos avaliados, os melhores para recuperar a  $\alpha$ -La pela combinação das técnicas de precipitação ácida e complexação do cálcio.

Para o caso de o interesse estar focado em se recuperar a  $\beta$ -Lg a partir do sobrenadante, foi verificado, pelo estabelecimento de uma *função-objetivo*, que as condições que otimizam a recuperação são:

- pH 3,9;
- tempo de incubação igual a 30 minutos;
- temperatura de incubação de 30 °C;
- concentração de WPI igual a 9 %, e
- utilização ácido láctico como acidificante, sendo desnecessária a utilização do lactato de sódio como complexante do cálcio, visto que a  $\beta$ -Lg não é uma metaloproteína, e, conforme discutido na seção 4.1.4., um outro acidificante, de menor custo, podendo ser utilizado em substituição ao ácido láctico.

Foi verificado que, em alguns tratamentos, a  $\beta$ -Lg pode ser obtida do sobrenadante com quantidades não detectáveis de  $\alpha$ -La, conforme apresentado na Tabela 18, para os tratamentos 1,2,3,4 e 7, indicando elevada pureza em  $\beta$ -Lg.

Para a recuperação de  $\beta$ -Lg a partir do sobrenadante, ao contrário do observado para a recuperação de  $\alpha$ -La a partir do precipitado, nem todos os fatores estudados foram considerados significativos.

Conforme apresentado na Figura 21, os fatores que mais influenciam na recuperação de  $\beta$ -Lg a partir do sobrenadante são a temperatura de incubação e a concentração de WPI, que juntos, respondem por aproximadamente 80% da variação observada.

Para avaliar as condições que otimizam, simultaneamente, a recuperação de  $\alpha$ -La a partir do precipitado e a recuperação de  $\beta$ -Lg a partir do sobrenadante, foi estabelecido uma *função-objetivo* sujeita a quatro restrições, conforme apresentado na seção 4.1.5.

Os resultados apresentados pelo gráfico da Figura 27 mostram que: tempo de processo igual a 30 minutos, temperatura de processo igual a 40°C, pH ajustado para 3,9 com ácido cítrico e uma concentração de WPI de 9%, são as condições que, dentro da faixa de valores experimentados, atendem os propósitos da *função-objetivo* e das restrições impostas. As estimativas de recuperação das proteínas, tanto para o precipitado quanto para o sobrenadante, estão apresentadas na Tabela 19.

Os resultados obtidos permitem concluir que o isolado protéico de soro de leite é uma excelente fonte de proteínas. Essas proteínas são importantes na alimentação humana e encontram potencial uso em aplicações industriais. Entre as aplicações possíveis uma é a de produzir alimentos lácteos destinados ao consumo infantil, caracterizados pela necessidade de reduzido potencial alergênico.

Outras fontes de proteínas, ainda consideradas como rejeitos pelas indústrias de laticínios, devem ser investigadas com os mesmos objetivos deste trabalho. Entre elas pode-se citar o soro de leite, obtido durante o processamento do queijo, e o leitelho, gerado no processo de fabricação da manteiga.

Neste trabalho a combinação de técnicas para recuperação de proteínas empregou reagentes de baixo custo e de fácil aquisição, e a execução do experimento foi realizada de forma bastante simples. Os reagentes utilizados (ácido cítrico, ácido láctico, lactato de sódio e citrato de sódio tribásico) têm o seu uso permitido e regulamentado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (*ANVISA*) e são amplamente utilizados em muitos processos, em diferentes indústrias alimentícias.

As frações protéicas recuperadas poderão ser submetidas a etapas posteriores de purificação (refinamento), empregando tanto técnicas individuais como, por exemplo, ultrafiltração ou diálise, quanto uma combinação criteriosa de técnicas que, em conjunto, poderão recuperar  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg com elevado grau de pureza, direcionando sua utilização para aplicações farmacológicas e biotecnológicas, entre outras.

## SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

Após a conclusão deste trabalho é sugerido que sejam feitos novos estudos envolvendo a recuperação de  $\alpha$ -La a partir do soro de leite, ou mesmo a partir do WPC ou do WPI, utilizando-se, como complexante, o ácido fítico e ou seu sal, o fitato.

Esses compostos ocorrem naturalmente em alguns tecidos vegetais, com destaque para tecidos presentes nas sementes, e é apontado por alguns autores (REDDY, 2002) como um importante fator antinutricional na alimentação, tanto humana quanto animal, devido ao fato de se complexarem fortemente com minerais (cálcio, zinco, magnésio e ferro, principalmente), reduzindo sua biodisponibilidade.

O ácido fítico, disponível no comércio especializado de insumos para laboratórios, pode ser adicionado a um meio contendo a  $\alpha$ -La e, uma vez complexado o cálcio, é esperado a formação de um precipitado insolúvel e estável, que muito provavelmente possa ser separado da fração enriquecida em  $\alpha$ -La assim obtida, fazendo-se pequenos ajustes nas condições do meio, como, por exemplo, elevando-se o seu pH para valores acima daqueles observados para o ponto isoelétrico da  $\alpha$ -La, de modo que esta se mantenha solúvel e possa ser separada do precipitado por centrifugação.

Para o caso da ocorrência de um complexo *fitato-metal-proteína*, metodologias tradicionais envolvendo a recuperação de proteínas também poderão ser utilizadas e, na necessidade requerida por algum processo em se desfazer a interação *fitato-metal-proteína*, pode-se avaliar a possibilidade do uso de *fitase*, uma enzima capaz de dissolver esse complexo, liberando o metal do fitato.

As características do fitato e o seu mecanismo de complexação com metais são bem descritos nas literaturas envolvendo nutrição mineral, humana e animal.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMSON, A.W. **Physical Chemistry os Surfaces**, New York: John Wiley & Sons, 1990, 537p.

ALOMIRAH, H.F.; ALLI, I.; Separation and Characterization of  $\beta$ -Lactoglobulin and  $\alpha$ -Lactalbumin from Whey and Whey Protein Preparations, *International Dairy Journal*, **14**:411–419, 2004.

ARAÚJO, J.M.A. **Química de Alimentos - Teoria e Prática**. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, 2004, 475p.

ARMAREGO, W.L.F.; CHAI, C.L.L.; **Purification of Laboratory Chemicals**, Butterworth Heinemann - Elsevier Science, USA, 5th. ed., 2003, 609p.

ARVANITTOYANNIS, I.S.; **Waste Management For The Food Industries**, New York: Elsevier Academic Press, 2008, 1071p.

BIGELOW, C.C.; On The Average Hydrophobicity of Proteins and The Relation Between It and Protein Structure, *J. Theor. Biol.*, **16**:187-211, 1967.

BRAMAUD, C.; AIMAR, P.; DAUFIN, G.; Optimisation of a Whey Protein Fractionation Process Based on the Selective Precipitation of  $\alpha$ -Lactalbumin. *Lait* **77**:411–423, 1997.

BRITZ, T.J.; ROBINSON, R.K; **Advanced Dairy Science and Technology**, US: Blackwell Publishing Ltd., 2008, 300p.

CHAO WU, AMES, IA(US). **Whey Treatment Process for Achieving High Concentration of  $\alpha$ -Lactalbumin**. US Patent 6,312,755 B1.; 2001.

CHATTERTON, D.E.W; SMITHERS, G.; ROUPAS, P.; BRODKORB,A., Bio-activity of  $\beta$ -Lactoglobulin and  $\alpha$ -Lactalbumin – Technological Implications for Processing, *International Dairy Journal*, **16**:1229–1240, 2006.

Committee on Food Chemicals Codex; **Food Chemicals Codex, Food and Nutrition Board, Institute of Medicine**, Washington, D.C.: The National Academies Press, 5th. ed., 2004, 998p.

DERRINGER, G.; SUICH, R.; Simultaneous Optimization of Several Response Variables, *Journal of Quality Technology*, **12**:214–219, 1980.

DEUTSCHER, M.P.; **Methods in Enzymology - Volume 182 - Guide to Protein Purification**, Academic Press, Inc., USA, 1990, 894p.

DeWIT, J.N.; BRONTS, H.; **Process for the Recovery of  $\alpha$ -Lactalbumin and  $\beta$ -Lactoglobulin from a Whey Protein Product**. US Patent 5,420,249; 1995.

FENNEMA, O.R; **Food Chemistry**, New York: Marcel Dekker Inc., 3rd. Ed., 1996, 1069p.

FERREIRA, R.C.; **Separação de  $\alpha$ -Lactoalbumina e  $\beta$ -Lactoglobulina de Proteínas do Soro de Queijo por Adsorção em Colunas de Leito Fixo**, Viçosa, MG: UFV, 2001. Tese (Mestrado), Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, 2001, 81p.

FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H; **Dairy Chemistry and Biochemistry**, Ireland: Blackie Academic & Professional, 1998, 478p.

GARCÍA, M.C.; MARINA, M.L; TORRE, M.; Ultrarapid Detection of Bovine Whey Proteins in Powdered Soybean Milk by Perfusion Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography, *Journal of Chromatography*, **A 822**, 225–232, 1988.

GIRSH, L.S.; **Hypoallergenic Milk Products and Process of Making**, US Patent 4,954,361, 1990.

HUI, Y.H. (Editor) **Dairy Science and Technology Handbook: Product Manufacturing**, California: John Wiley & Sons – VCH, 1993, vol.2., 440p.

IFIS - International Food Information Service; **Dictionary of Food Science and Technology**, Iowa: Blackwell Publishing Ltd., 2005, 413p.

KANEKO, T.; KOJIMA, T.; KUWATA, T.; YAMAMOTO, Y.; **Selective Enzymatic Degradation of  $\beta$ -Lactoglobulina Contained in Cow's Milk-Serum Protein**, US Patent 5,135,869, 1992.

KONRAD, G.; KLEINSCHMIDT, T.; A New Method for Isolation of Native  $\alpha$ -Lactalbumin From Sweet Whey, *International Dairy Journal*, **18**:47-54, 2008.

KUHLMAN, C.F.; LIEN, E.L.; WEABER, J.R.; O'CALLAGHAN, D.M.; **Infant Formula Compositions Comprising Increased Amounts of  $\alpha$ -Lactalbumin**. *World Intellectual Property Organization*, Patent WO 03/055322 A1, 2003.

LIU, S.X.; **Food and Agricultural Wasterwater Utilization and Treatment**, Iowa: Blackwell Publishing Ltd., 2007, 277p.

LUCENA, M.E.; ALVAREZ, S.; MENÉNDEZ, C.; RIEIRA, F. A.; ALVAREZ, R., Beta-Lactoglobulin Removal from Whey Protein Concentrates - Production of Milk Derivatives as a Base for Infant Formulas. *Journal of Separation and Purification Technology*, **52**:310–316, 2006.

LUCENA, M.E.; ALVAREZ, S.; MENÉNDEZ, C.; RIEIRA, F. A.; ALVAREZ, R.,  $\alpha$ -Lactalbumin Precipitation From Commercial Whey Protein Concentrates. *Journal of Separation and Purification Technology*, **52**:446–453, 2007.

MAROULIS, Z.B.; SARAVACOS, G.D; **Food Plant Economics**, New York: CRC Press - Taylor & Francis Group, 2008, 352p.

MEADE, R.E.; STRINGHAM, J.M., **Process of Making Whey Food Products**. US Patent 2,465,905, 1949.

MEZZAROBA, L.F.H; CARVALHO, J.E.; PONEZI, A.N.; ANTÔNIO, M.A.; MONTEIRO, K.M.; POSSENTI, A.; SGARBIERI, V.C.; Antiulcerative Properties of Bovine  $\alpha$ -Lactalbumin, *International Dairy Journal*, **16**:1005-1012, 2006.

MULLER, A.; DAUFIN, G.; CHAUFER, B.; Ultrafiltration Modes of Operation for the Separation of  $\alpha$ -Lactalbumin from Acid Casein Whey, *Journal of Membrane Science*, **153**:9-21, 1999.

NELSON, D.L.; COX, M.M.; **Lehninger Principles of Biochemistry**, W.H. Freeman and Company, New York, 4th. ed., 2005, 1120p.

NOPPE, W.; HAEZEBROUCK, P.; HANSSENS, I.; CUYPER, M.D.; A Simplified Purification Procedure of  $\alpha$ -Lactalbumin From Milk Using  $Ca^{2+}$ -dependent Adsorption in Hydrophobic Expanded Bed Chromatography, *Bioseparation* **8**:153–158, 1999.

PIETER, W.; WOUTERS, J.T.M.; GEURTS, T.J., **Dairy Science and Technology**, New York: Taylor & Francis Group, 2nd ed., 2006, 762p.

QASBA, P.K; KUMAR, S.; Molecular Divergence of Lysozymes and Alpha-Lactalbumin, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **32**:255–306, 1997.

REDDY, N.R.; SATHE, S.K.; **Food Phytates**, New York: CRC Press LLC., 2002, 251p.

REHM, H.; **Protein Biochemistry and Proteomics - The Experimenter Series**, USA: Elsevier - Academic Press, Inc., 2006, 236p.

REITH, A.D.;; **Methods in Molecular Biology - Volume 124 - Protein Kinase Protocols**, USA: Humana Press, Inc., 2004, 359p.

SAS Institute Inc. **Getting Started with the SAS® 9.1 ADX Interface for Design of Experiments**. Cary, NC: SAS Institute Inc., 2004.

SHUR, B.D.;  **$\alpha$ -Lactalbumin Contraceptive**, US Patent 4,511,558, 1985.

SMITH, J.; HONG-SHUM, L.; **Food Additives Data Book**, Blackwell Science Ltd., 2003, 1016p.

TROULLIER, A.; REINSTÄDLER, D.; DUPONT, Y.; NAUMANN, D.; FORGE, V.; Transient Non-Native Secondary Structures During The Refolding of  $\alpha$ -Lactalbumin Detected by Infrared Spectroscopy, *Nature Structural Biology*, **7**, Num. 1, 78–86, jan. 2000.

WOOD, R.A.; **Food Allergies for Dummies**, Indianapolis: Wiley Publishing, Inc., 358p., 2007.