

LÍGIA RAQUEL MARONA RODRIGUES

**VALORIZAÇÃO DA FRACÇÃO PROTEICA DO
SORO DE QUEIJO**

UNIVERSIDADE DO MINHO

ESCOLA DE ENGENHARIA

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA BIOLÓGICA

2001

LÍGIA RAQUEL MARONA RODRIGUES

**VALORIZAÇÃO DA FRACÇÃO PROTEICA DO
SORO DE QUEIJO**

Dissertação apresentada à Universidade do Minho para a obtenção de grau
de Mestre em Biotecnologia – Engenharia de Bioprocessos

Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia no âmbito do
Programa PRAXIS XXI

UNIVERSIDADE DO MINHO
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA BIOLÓGICA
2001

AGRADECIMENTOS

Para o desenvolvimento e concretização deste trabalho contribuíram várias pessoas a quem quero expressar o meu sincero agradecimento.

Ao Prof. José Teixeira pela oportunidade que me deu para a realização desta dissertação, pela sua orientação, optimismo e disponibilidade.

Ao Prof. Armando Venâncio pela ajuda e conselhos durante a realização do trabalho de partição bifásica aquosa.

À Cristina Coelho, da Quinta dos Ingleses, pelo apoio e disponibilidade.

Aos colegas do L.T.E.B. do Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho pela sua paciência para me aturar nos dias mais “cinzentos”, pela sua amizade e apoio.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia (F.C.T.) pelo apoio financeiro concedido através de uma bolsa de Mestrado, no âmbito do programa PRAXIS XXI (BM/20817/99).

Aos meus amigos, “gang do multibanco” e “clube das couves” pelo carinho e apoio nos momentos de maior desânimo.

Ao Fernando pela presença, carinho e sorriso nos bons e maus momentos.

Aos meus Pais pelo apoio que sempre me deram, pelo incentivo, pela ajuda, pelos conselhos, pelos meios que me proporcionaram, pelo carinho e inesgotável paciência.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, aqui fica o meu agradecimento.

RESUMO

Os sistemas bifásicos aquosos são utilizados em muitos processos biotecnológicos, sendo a purificação de proteínas uma das suas aplicações mais importantes.

O soro apesar de ser um subproduto da indústria de lacticínios, possui um elevado valor nutritivo uma vez que retém a maior parte dos componentes do leite.

Cerca de 80% da proteína no soro consiste em β -lactoglobulina (β lg) e α -lactalbumina (α la) e ambas são extremamente nutritivas.

O componente PP3 da fracção proteose peptonas do soro de queijo (10% da proteína do soro) é de grande interesse devido às suas propriedades funcionais, particularmente à sua capacidade emulsificante, grande afinidade para a interface óleo-água, fortes propriedades espumantes e papel bioquímico, nomeadamente de regulação espontânea da lipólise no leite.

As proteínas do soro puras e no seu estado nativo têm elevado valor funcional e nutricional não encontrado noutras proteínas vulgarmente utilizadas como aditivos na indústria alimentar, pelo que tem havido um crescente interesse no seu fraccionamento.

Numa primeira fase deste trabalho pretendeu-se seleccionar um sistema bifásico aquoso que permitisse a melhor separação das proteínas maioritárias do soro de queijo (β lg e α la), tendo sido testados os sistemas PEG-Reppal, PEG-Fosfato e PEG-Sulfato. Estes estudos foram efectuados inicialmente com proteínas puras e após optimizado o melhor sistema com concentrado proteico de soro fornecido pela Quinta dos Ingleses. A partição das proteínas foi caracterizada pela determinação dos coeficientes de partição, rendimentos ($Y_{\alpha la,S}$ e $Y_{\beta lg,I}$), graus de pureza e recuperações. Realizaram-se várias experiências de partição variando parâmetros como concentração e peso molecular de PEG, pH, adição de sais e força iónica.

Os resultados obtidos permitem concluir que os sistemas PEG-sais parecem mais adequados para separar as duas proteínas, uma vez que permitem concentrá-las em fases distintas. Ensaio efectuado com proteínas puras no sistema 14%p/p PEG900 + 14%p/p Fosfato, pH 7,0 permitem obter um $k_{\alpha la} = 4,39$ e um $k_{\beta lg} = 0,16$ com rendimentos de 75,9% ($Y_{\alpha la,S}$) e 93,2% ($Y_{\beta lg,I}$) respectivamente. O sistema 18%p/p PEG900 + 14%p/p Sulfato, pH 7,0 permitiu obter um $k_{\alpha la} = 12,80$ e um $k_{\beta lg} = 0,34$ com rendimentos de 96,7% ($Y_{\alpha la,S}$) e 83,8% ($Y_{\beta lg,I}$) respectivamente.

Numa segunda fase deste trabalho pretendeu-se por partição bifásica aquosa promover a purificação do componente PP3. O componente PP3 foi extraído do concentrado proteico de soro fornecido pela Quinta dos Ingleses. Foram testados os sistemas PEG-Reppal e PEG-Fosfato variando parâmetros como concentração e peso molecular de PEG, pH e força iónica.

Os resultados obtidos permitem concluir que num sistema 16%p/p PEG4000 + 16%p/p Reppal, pH 7,0, se consegue a partição do componente PP3 para a fase superior do sistema com $k_{PP3} = 12,30$ e um rendimento de 80-90%.

ABSTRACT

Aqueous two-phase systems are used in many biotechnological applications, being the protein purification one of its most important applications.

Cheese whey although being a sub product of the dairy industry, has a high nutritional value, once it retains almost all of the milk components.

About 80% of the whey protein consists in β -lactoglobulin (β lg) and α -lactalbumin (α la) and both are extremely nutritive.

The PP3 component of the proteose peptone fraction of cheese whey (10% of the whey protein) is of great interest because of its functional properties, particularly its emulsifying power, strong affinity for oil-water interface, strong foaming properties and biochemical role, such as spontaneous lipolysis regulation in milk.

The whey proteins when pure and in their native state have an high functional and nutritional value that is not found in other proteins usually used as food additives, for this reason there has been an increasing interest in their fractionation.

In a first stage of this work, the aim was the selection of an aqueous two-phase system that allowed the best separation of the major proteins in cheese whey (β lg e α la). For this purpose one tested the systems PEG-Reppal, PEG-Phosphate and PEG-Sulphate. Laboratory work was made using pure β lg and α la, and once the best system was optimised the assays were performed with whey protein concentrate from Quinta dos Ingleses. To describe the proteins partition in these aqueous two-phase systems, partition coefficients, as well as the percent yields ($Y_{\alpha la,S}$ and $Y_{\beta lg,I}$), purity degrees and percent recuperations were calculated. The influence of polyethylene glycol concentration and molecular mass, pH of the system, salts addition and ionic strength was investigated in systems composed by PEG-Reppal, PEG-Phosphate and PEG-Sulphate.

The results lead to the conclusion that the PEG-salt systems seem to be the most adequate to separate both proteins in distinct phases of the system. Assays performed with pure proteins in the system 14%p/p PEG900 + 14%p/p Phosphate, pH 7,0 allowed the following parameters: $k_{\alpha la} = 4,39$ and $k_{\beta lg} = 0,16$, with percent yields of 75,9% ($Y_{\alpha la,S}$) and 93,2% ($Y_{\beta lg,I}$) respectively. The system 18%p/p PEG900 + 14%p/p Sulphate, pH 7,0 allowed the following parameters: $k_{\alpha la} = 12,80$ and $k_{\beta lg} = 0,34$ with percent yields of 96,7% ($Y_{\alpha la,S}$) and 83,8% ($Y_{\beta lg,I}$) respectively.

In a second stage of this work, the aim was the purification of the PP3 component by using aqueous two-phase systems. The PP3 component was extracted from the cheese whey protein concentrate from Quinta dos Ingleses. The influence of polyethylene glycol concentration and molecular mass, pH of the system and ionic strength was investigated in systems composed by PEG-Reppal and PEG-Phosphate.

The results lead to the conclusion that with the system 16%p/p PEG4000 + 16%p/p Reppal, pH 7,0, the PP3 component is partitioned in the top phase of the system and it has a partition coefficient of 12,30 with a percent yield of 80-90%.

ÍNDICE

1. Revisão da Literatura	1
1.1 Processo Biotecnológico	1
1.2 Partição Bifásica Aquosa.....	6
1.2.1 Caracterização do sistema de duas fases aquosas.....	9
1.2.1.1 Definições fundamentais.....	9
1.2.1.2 Observações experimentais.....	11
1.2.1.3 Alteração da estrutura da água em soluções de polímeros e sais.....	14
1.2.1.4 Modelos teóricos.....	16
1.2.1.5 Partição em sistemas de duas fases aquosas.....	20
1.2.2 Aplicação de sistemas de duas fases aquosas à purificação de proteínas.....	29
1.2.3 Aplicação de sistemas de duas fases aquosas em grande escala.....	311.
2.4 Conclusões.....	32
1.3 Soro de Queijo.....	33
1.3.1 Considerações gerais.....	33
1.3.2 Utilização de soro.....	36
1.3.3 Proteínas do soro.....	49
1.3.3.1 Estrutura e propriedades físico-químicas das proteínas do soro.....	49
1.3.3.2 Propriedades funcionais das proteínas do soro.....	64
1.3.3.3 Propriedades biológicas e valor nutricional das proteínas maioritárias do soro.....	65
1.3.4 Processos de recuperação das proteínas do soro – obtenção de concentrados proteicos de soro.....	67

1.3.5 Fraccionamento das proteínas maioritárias do soro.....	73
1.3.6 Aspectos económicos do processamento de soro.....	76
1.3.7 Ambiente legal.....	79
1.3.8 Potencial poluente.....	80
1.3.9 Projecto PROLAC – valorização das proteínas e lactose do soro.....	82
1.3.10 Avaliação de mercado.....	84
2. Materiais e Métodos.....	86
2.1 Materiais.....	86
2.2 Preparação das soluções utilizadas.....	87
2.2.1 Preparação das soluções tampão.....	87
2.2.2 Solução-mãe de Reppal PES 100.....	87
2.2.3 Solução-mãe de polietileno glicol (PEG).....	87
2.2.4 Solução-mãe de fosfato de potássio.....	87
2.2.5 Solução-mãe de sulfato de amónio.....	88
2.3 Preparação dos sistemas bifásicos.....	88
2.4 Doseamentos – Doseamento de proteína total.....	89
2.4.1 Método de Bradford.....	89
2.4.2 Método de absorção de radiação ultravioleta.....	90
2.4.3 Fast Protein Liquid Chromatography – FPLC – Cromatografia de permuta iónica.....	90
2.4.4 Electroforese SDS PAGE.....	92
2.5 Determinação dos coeficientes de partição, rendimentos e recuperações para as proteínas maioritárias do soro de queijo - α -lactalbumina e β -lactoglobulina.....	97
2.6 Extracção da fracção PP do concentrado proteico de soro.....	98

2.7 Preparação do componente PP3 por cromatografia de interação hidrofóbica -FPLC.....	99
3. Resultados e discussão.....	101
3.1 Partição das proteínas comerciais puras: α -lactalbumina e β - lactoglobulina.....	102
3.1.1 Sistemas compostos por PEG e Reppal PES 100.....	102
3.1.2 Sistemas compostos por PEG e sais.....	118
3.1.2.1 Sistemas compostos por PEG e sais de fosfato de potássio...118	
3.1.2.2 Sistemas compostos por PEG e sulfato de amónio.....	125
3.1.3 Comparação dos sistemas PEG-Reppal e PEG-sais para a partição de α -lactalbumina e β -lactoglobulina.....	135
3.2 Separação das proteínas α -lactalbumina e β -lactoglobulina de um concentrado proteico de soro.....	137
3.2.1 Sistemas compostos por PEG e Reppal.....	137
3.2.2 Sistemas compostos por PEG e Sais.....	143
3.2.2.1 Sistemas compostos por PEG e Fosfato.....	143
3.2.2.2 Sistemas compostos por PEG e Sulfato.....	150
3.3 Partição do componente PP3 extraído do concentrado proteico de soro.....	164
4. Conclusões.....	173
5. Nomenclatura.....	179
6. Bibliografia.....	181

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Processo Biotecnológico

Um processo de purificação em grande escala de uma proteína, mantendo uma elevada eficiência e pureza, bem como um baixo custo implica que se considerem três etapas fundamentais. É importante definir as características do produto final, caracterizar o material de partida e finalmente a definir passos de separação e condições impostas relativamente ao produto, operações unitárias e condições de operação.

Na definição das características do produto final e as suas utilizações é necessário considerar as funções do produto, as doses e a frequência de utilização, a pureza requerida, os níveis aceitáveis de determinadas impurezas, bem como a estabilidade do produto final, uma vez que condiciona o tipo de operações que podem ser efectuadas, assim como as condições necessárias e o tempo de processamento.

A selecção de um processo de separação adequado implica a escolha de processos de separação baseados em diferentes propriedades químicas, físicas e bioquímicas; a remoção de impurezas presentes em maior quantidade e, finalmente a escolha de processos que tirem partido, de modo eficiente, das diferenças de propriedades entre o produto e as impurezas.

A purificação de proteínas revela-se de grande relevância para a biotecnologia.

Os métodos disponíveis para a separação e purificação de proteínas variam desde procedimentos de precipitação a técnicas sofisticadas de cromatografia de afinidade. Os métodos usados podem ser classificados com base nas proteínas a explorar; assim, podemos ter métodos baseados nas propriedades de superfície, no tamanho e forma das proteínas, na carga das proteínas e nas biopropriedades (Scopes, 1995).

Um processo de purificação de uma dada proteína é complexo e o resultado de uma série de etapas, desde a captação da proteína de interesse a partir da matéria-prima, por remoção de contaminantes maiores fazendo recurso a técnicas como cromatografia de adsorção, troca iónica ou interacção hidrofóbica; à separação da proteína alvo e possíveis contaminantes ainda em solução com estruturas e função semelhantes, cuja natureza depende do processo de captação anteriormente usado; ou ainda á remoção de variantes estruturais e funcionais da proteína alvo, sendo esta a etapa final de

purificação. As técnicas cromatográficas (cromatofocagem, filtração em gel e cromatografia de afinidade) usadas nesta etapa final de purificação exploram diferentes atributos físico-químicos da proteína alvo.

A cromatografia consiste num conjunto de técnicas pelas quais a passagem de solutos por colunas pode ser selectivamente restringida. Interações com a matriz determinam a distribuição de solutos entre as fases móvel e estacionária. As técnicas cromatográficas apresentam a vantagem de se desenrolarem em ambientes extremamente suaves, como seja a temperatura baixa e na ausência de tensões de corte, para produtos com actividade biológica. Os métodos cromatográficos são, normalmente, empregues nas últimas etapas de um processo de separação e existem fundamentalmente quatro tipos diferentes de cromatografia: cromatografia de exclusão molecular, cromatografia de troca iónica, cromatografia de interacção hidrofóbica e cromatografia de afinidade.

A **cromatografia de exclusão molecular** separa proteínas com diferentes tamanhos que são geralmente proporcionais ao peso molecular. A separação consegue-se usando uma matriz porosa na qual as moléculas, têm diferentes estados de acesso (moléculas pequenas têm maior acesso que as grandes). A amostra é eluída por ordem decrescente de tamanho. A filtração em gel pode ser facilmente aplicável em grande escala, mantendo a altura da matriz e aumentando o seu diâmetro.

A **cromatografia de troca iónica** permite separar proteínas com diferentes pontos isoeléctricos. Esta técnica explora a carga superficial, a densidade de carga e o tamanho molecular das proteínas, assim como o pH e a força iónica das soluções tampão, usadas para promover a separação. Grupos carregados na superfície da proteína interagem com grupos de carga oposta imobilizados no meio de troca iónica. Quando o pH do meio é superior ao ponto isoeléctrico da proteína, esta apresenta carga negativa e liga-se a um trocador aniónico, que se encontra carregado positivamente. O contrário verifica-se para um pH inferior ao ponto isoeléctrico da proteína. A separação é conseguida de acordo com o equilíbrio que se estabelece entre a fase móvel (tamponada) e a fase estacionária, que consiste numa matriz à qual estão ligados grupos inorgânicos carregados (Roe, 1989). Para que a fase estacionária consiga reter proteínas, a matriz é derivatizada com grupos com carga positiva para a adsorção de proteínas

aniónicas (trocadores aniónicos) e grupos com carga negativa para a adsorção de proteínas com carga positiva (trocadores catiónicos). O grau de interacção iónica com a proteína é controlado ajustando o pH do tampão para regular o grau dos grupos carregados quer da matriz quer da proteína. A força iónica do tampão é um parâmetro importante, pois permite controlar a distribuição da proteína entre a fase estacionária e a fase móvel. Este processo de separação engloba dois passos: (1) a aplicação da amostra, sendo retidos os componentes que se ligam ao suporte e (2) a eluição das proteínas, utilizando contra-íões como componentes do tampão (Roe, 1989).

A técnica de **cromatofocagem** pode ser considerada como uma extensão da cromatografia de troca iónica. A diferença essencial reside no gradiente de pH, que na técnica de cromatofocagem se cria na coluna, retendo as proteínas na zona de pH próximas do seu ponto isoeléctrico (p.i.e.). Com a técnica de cromatofocagem conseguem-se boas resoluções de misturas complexas de proteínas, desde que não tenham uma distribuição contínua de pontos isoeléctricos, neste caso, os picos adjacentes sobrepõem-se, com conseqüente perda de resolução. A presença de material não proteico carregado pode também reduzir a eficiência de separação. A limitação da cromatofocagem na purificação de proteínas consiste na utilização de tampões de eluição muito dispendiosos e difíceis de eliminar do produto final.

A **cromatografia de interacção hidrofóbica** é usada para separar proteínas com base em diferentes hidrofobicidades, ou seja baseia-se na força hidrofóbica das diferentes proteínas para a matriz contendo grupos hidrofóbicos imobilizados. A maioria das proteínas contém alguns aminoácidos hidrofóbicos (i.e., aqueles com grupos R não polares – alanina, fenilalanina, valina, triptofano, leucina, isoleucina, e metionina). Estes aminoácidos estão geralmente “enterrados” na estrutura da molécula proteica como resultado do ambiente aquoso envolvente da molécula. Contudo, alguns aminoácidos não polares podem ser encontrados à superfície da molécula como zonas hidrofóbicas distintas. A diversidade de condições de eluição possíveis permite a resolução de misturas complexas de proteínas, difíceis de purificar por outras técnicas cromatográficas. A presença de contaminantes hidrofóbicos na amostra diminui a eficiência do processo (Roe, 1989).

Os aminoácidos hidrofóbicos superficiais estão dispersos à superfície da molécula, intercalados com zonas hidrofílicas. O número, tamanho e distribuição destas

regiões não-iônicas são características de cada proteína e podem ser usados como base para a sua separação (Roe, 1989).

A cromatografia de interacção hidrofóbica é frequentemente usada nas etapas iniciais de uma estratégia de separação, especialmente após um passo de precipitação em presença de sal, uma vez que as condições de ligação usadas em cromatografia de interacção hidrofóbica envolvem elevadas concentrações de sal, pelo que geralmente o volume eluído é subsequentemente aplicado a uma coluna de troca iónica, onde a ligação ocorre a baixas concentrações de sal.

Em relação à **cromatografia de afinidade** esta baseia-se na interacção específica entre um determinado ligando e a proteína. A elevada especificidade e capacidade da cromatografia de afinidade permite o uso de elevadas velocidades de fase móvel em pequenos volumes de matriz, obtendo-se separações rápidas. Dos ligandos mais empregues em cromatografia de afinidade realçam-se os corantes de triazina que, pela sua selectividade, estabilidade e custo, têm sido considerados ideais para aplicações em grande escala. A aplicação de cromatografia de afinidade em grande escala constitui uma área de crescente importância em biotecnologia.

Outros métodos como a precipitação selectiva e a **extracção líquido-líquido** são também utilizados como passos iniciais ou intermédios entre os vários passos cromatográficos. De entre estes, os sistemas de duas fases aquosas, apesar de ainda pouco utilizados, parecem ser os mais promissores, possibilitando mesmo em alguns casos a obtenção de preparações de grande pureza apenas num único passo.

A utilização de sistemas de duas fases aquosas parece ser de grande utilidade devido ao seu baixo custo, simplicidade técnica e facilidade de aumento de escala e operação em contínuo, como será discutido no capítulo 1.2.

A **precipitação selectiva** de proteínas pode ser usada como um método para recuperar a maioria das proteínas de uma mistura, fraccionar um grupo de proteínas de uma solução proteica, ou recuperar uma única proteína de interesse num passo de purificação.

O desenvolvimento de um processo de precipitação selectiva para uma particular proteína requer a identificação de um agente de precipitação adequado (que permite

obter a proteína em melhor estado), e otimização do processo de precipitação (Scopes, 1995)

A maioria dos produtos obtidos pela via biotecnológica devem apresentar um grau de estabilidade que permita o seu armazenamento sem risco de deterioração. A secagem é o método mais usado para assegurar a estabilidade pretendida. Contudo, existem produtos que não são facilmente secos ou que são necessários em solução. Nestes casos, a forma final de comercialização deverá precaver a deterioração microbiológica, bem como a desnaturação proteica. Em alguns casos, a estabilização do produto pode ser melhorada pela presença de certos iões, soluções tamponadas, substratos, antioxidantes e outros compostos, e a eliminação de enzimas proteolíticas durante o processo de purificação prevenindo deste modo a desnaturação.

1.2 Partição Bifásica Aquosa

Cerca de 50-90% dos custos de produção para um produto biológico simples residem na estratégia de purificação. Existe uma grande necessidade de ter técnicas de bioseparação eficientes, efectivas e económicas em larga escala, que permitam atingir elevada pureza e rendimento de recuperação, mantendo a actividade biológica da molécula (Diamond e Hsu, 1992).

Os sistemas bifásicos aquosos são pela primeira vez descritos na literatura pelo microbiólogo holandês Beijerinck no fim do século passado. Este cientista observou que soluções aquosas de gelatina e agar (amido) se separavam em duas fases aquosas, sendo a fase inferior constituída principalmente por agar (ou amido) e a fase superior por gelatina (Diamond e Hsu, 1992).

Apenas meio século mais tarde, em 1947, Dobry e Boyer-Kawenoki realizaram um estudo sistemático sobre a miscibilidade de vários polímeros em solventes orgânicos e em água. Na grande maioria dos casos observou-se a formação de duas fases homogéneas e imiscíveis (Diamond e Hsu, 1992).

Contudo, não foi antes de 1955 que Albertsson ao tentar isolar pirenoídes de cloroplastos, descobriu acidentalmente que uma mistura de PEG e tampão fosfato de potássio formava duas fases imiscíveis, concentrando-se os cloroplastos na fase superior (Diamond e Hsu, 1992). Albertsson é considerado o pioneiro da utilização de sistemas de duas fases aquosas.

De forma a confirmar a selectividade com que os cloroplastos se distribuem preferencialmente na fase superior, foram efectuados estudos de partição com microrganismos, paredes celulares e vesículas de cloroplastos (Diamond e Hsu, 1992). Observou-se que dependendo das características das partículas, estas se acumulam preferencialmente numa das fases ou na interface. No entanto, estes sistemas apresentavam características pouco fisiológicas devido à elevada concentração de fosfato presente, pelo que se testou então a substituição do fosfato por polímeros hidrófilos (por exemplo, o dextrano, a metilcelulose e o álcool polivinílico), e verificou-se que a grande maioria dos sistemas formava duas fases aquosas.

As fases dos sistemas PEG/dextrano contêm entre 80-99% de água em peso, têm tensões interfaciais extremamente baixas (da ordem dos 10^{-7} N.cm⁻¹) e permitem um

ambiente protectorio para os materiais biológicos. Estes quando comparados com os sistemas que utilizam solventes orgânicos (aquoso-orgânico e orgânico-orgânico) são mais favoráveis, uma vez que tais sistemas têm uma tensão interfacial elevada (10^{-4} N.cm⁻¹) e as fases orgânicas contêm apenas 40-50% de água em peso. Estas condições originam problemas graves, incluindo a precipitação e desnaturação das proteínas, e concentração dos materiais biológicos exclusivamente na fase aquosa (Diamond e Hsu, 1992).

Albertsson e seus colaboradores realizaram extensivos estudos de partição, estes estudos foram principalmente realizados no âmbito da biologia celular com ribossomas, vírus e células inteiras (Albertsson, 1958; Albertsson e Frick, 1959; Albertsson et al, 1959; Frick e Albertsson, 1959). Alguns estudos com proteínas foram também realizados nessa altura (Albertsson, 1958; Albertsson e Nyns, 1959). Os ácidos nucleicos apenas merecem atenção anos mais tarde (Lif et al, 1961).

É nos princípios dos anos 70 que o estudo de partição e purificação de proteínas conhece um grande desenvolvimento. A influência de vários factores como o tipo e peso molecular de polímero e a influência de sais foi estudada para várias proteínas (Johansson, 1970 a.). Foram também introduzidos polímeros modificados que alteram a partição. Estas modificações permitiam a alteração das características electrostáticas do polímero (Johansson, 1970 b.), da sua hidrofobicidade ou a introdução de um ligando específico para uma determinada proteína (Takerkart et al, 1974) – processo denominado de “partição de afinidade” (Flanagan e Barondes, 1975). Neste processo pretende-se orientar a partição de um composto para uma das fases, por acumulação nessa fase, de um ligando específico para esse composto.

Os conhecimentos acumulados sobre a partição das proteínas e os exemplos bem sucedidos de purificação de proteínas a nível laboratorial, despertaram o interesse pela aplicação deste método em larga escala, na realidade vários estudos demonstraram a facilidade do aumento de escala de sistemas bifásicos aquosos sem perda apreciável do factor de purificação ou do rendimento (Hustedt et al, 1978; Kroner et al, 1978).

Outras aplicações de sistemas bifásicos aquosos foram entretanto desenvolvidas. A bioconversão extractiva é uma das mais interessantes e importantes pela sua possível aplicação a nível industrial. Esta técnica consiste na utilização de sistemas bifásicos aquosos em processos de biotransformação, usando enzimas ou células inteiras (Yamazaki e Suzuki, 1979; Kuhn, 1980). Nestes sistemas pretende-se que o

biocatalisador se distribua numa fase juntamente com os substratos, e o produto se acumule na outra. Desta forma facilmente se separa o produto dos substratos e é reduzida a inibição pelo produto, observada em algumas reacções.

A extracção em contínuo foi também desenvolvida, permitindo o tratamento de grandes volumes de amostra em pouco tempo e a um custo relativamente baixo (Veide et al, 1984). Além disso, usada em conjunto com a bioconversão extractiva constitui um processo altamente eficiente e económico de produção de compostos por via biológica.

O crescente interesse na utilização de sistemas bifásicos aquosos em larga escala para aplicações industriais levou à necessidade de desenvolver sistemas mais económicos. Com efeito, o dextrano tem um elevado custo pelo que em larga escala se prefere a utilização de sistemas PEG-sal. O hidroxipropilamido, um derivado de amido, demonstrou ser um bom substituto do dextrano devido ao baixo preço e facilidade de formação de sistemas bifásicos (Tjerneld et al, 1986). Polímeros não purificados e consequentemente de preço mais baixo, como os galactomananos foram também utilizados com sucesso em sistemas bifásicos aquosos (Venâncio et al, 1995, 1996). Os polímeros termoseparáveis podem também ser utilizados com vantagem em sistemas de duas fases aquosas. Existem soluções de polímeros que a uma determinada temperatura crítica se separam em duas fases, sendo uma constituída quase exclusivamente pelo polímero e outra por água. O PEG por exemplo, comporta-se deste modo mas a sua temperatura crítica é de 110°C numa solução 12% PEG20000 (Sjoberg et al, 1989). Soluções de outros polímeros, como os copolímeros de óxido de propileno, apresentam uma temperatura crítica significativamente mais baixa. A partição pode ainda ser manipulada pela adição de sais e tensioactivos. A utilização destes polímeros em sistemas bifásicos aquosos possibilita uma fácil separação do composto alvo extraído para a fase do polímero e a recuperação deste para nova utilização.

Os sistemas bifásicos aquosos podem ainda ser usados para extrair poluentes ambientais, uma vez que, sob determinadas condições num sistema PEG-sal, catiões de chumbo, cádmio e bismuto acumulam-se na fase rica em PEG. Moléculas orgânicas contendo anéis aromáticos foram também selectivamente extraídas para a fase de PEG no mesmo tipo de sistemas. Estes resultados indiciam a possibilidade de aplicação destes sistemas para reduzir a toxicidade dos efluentes industriais.

O grande potencial dos sistemas bifásicos aquosos para aplicações industriais foi recentemente evidenciado pela Genentech. Esta empresa, uma das maiores a nível mundial na área da biotecnologia, desenvolveu um sistema bifásico aquoso para a separação de IGF-I (Insulin – like - Growth Factor – I) produzido por *E.coli* recombinante. Em aplicações de larga escala com volumes da ordem dos 10000 litros foi possível obter 90% de rendimento com 97% de pureza da proteína (Hart et al, 1994).

Actualmente, a investigação em partição bifásica aquosa abarca vários domínios desenvolvendo-se desde os estudos fundamentais até às aplicações industriais.

1.2.1 Caracterização de Sistemas de Duas Fases Aquosas

1.2.1.1. Definições Fundamentais

Quando se misturam, em água, dois polímeros ou um polímero e um composto de baixo peso molecular, acima de determinadas concentrações limite, forma-se um sistema de duas fases aquosas (Diamond e Hsu, 1992). A composição destes sistemas pode ser representada por um diagrama de fases (Figura 1.1). Para estes sistemas é utilizada a forma rectangular sendo omitida a concentração do solvente, neste caso a água (Albertsson, 1985). Assim, representa-se no eixo das abcissas a concentração do componente que se acumula na fase inferior e no eixo das ordenadas a concentração do componente que se acumula na fase superior.

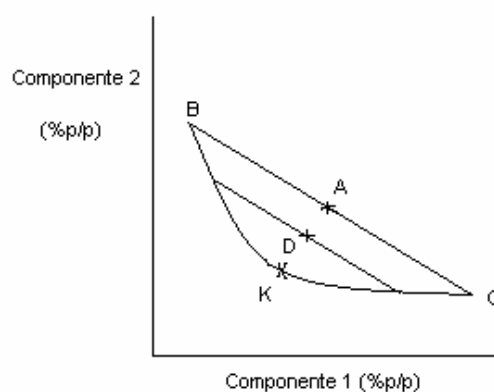


Figura 1.1 Diagrama de fases tipo.

A binodal (BKC) é a linha que define a separação entre a formação de uma ou duas fases homogéneas. Sistemas cuja composição fica abaixo da binodal formam uma fase homogénea enquanto que sistemas cuja composição se situa acima da binodal formam duas fases homogéneas. Para cada composição correspondente a sistemas de

duas fases aquosas, pode definir-se uma linha recta – “tie-line” – que intersecta a binodal em dois pontos (B, C) representativos das fases em equilíbrio. O ponto B dá-nos a composição da fase superior e o ponto C a da fase inferior.

Todos os pontos situados sobre a mesma “tie-line” correspondem a sistemas com a mesma composição de fase superior e inferior, mas diferentes razões de volume das fases.

A razão de massa entre as duas fases é dada por:

$$(V_s \times d_s)/(V_i \times d_i) = AC/AB \text{ ou seja } V_s/V_i = d_i/d_s \times AC/AB$$

V_s e V_i – volumes das fases superior e inferior respectivamente

d_s e d_i – densidades das fases superior e inferior respectivamente

As “tie-lines” são caracterizadas pelo seu comprimento (TLL) e declive (STL) (Zaslavsky, 1995). O seu comprimento é determinado considerando a “tie-line” a hipotenusa de um triângulo, em que os catetos são formados pela diferença de concentração dos componentes nas duas fases. Assim:

$$TLL = (\Delta C_1^2 + \Delta C_2^2)^{1/2}$$

em que, ΔC_1 e ΔC_2 representam a diferença de concentração dos componentes 1 e 2 entre as duas fases. O declive da “tie-line” é dado por:

$$STL = \Delta C_1/\Delta C_2$$

O ponto crítico (K) corresponde ao ponto em que as composições e os volumes das fases se tornam teoricamente iguais (Diamond e Hsu, 1992). Este ponto pode ser obtido pela intersecção de uma linha que passa pelo ponto médio de várias “tie-lines”, com a binodal. O ponto limite é o ponto onde a binodal é tangente à linha que une os segmentos iguais nos eixos do diagrama. A posição relativa do ponto limite e do ponto crítico define a simetria do diagrama de fases. Quando estes dois pontos coincidem o diagrama de fases considera-se simétrico.

1.2.1.2. Observações Experimentais

A mistura de duas soluções aquosas de polímeros pode originar três situações distintas:

- formação de uma fase homogénea – corresponde a uma situação em que os polímeros são compatíveis ou, sendo incompatíveis, não se atingiu a concentração crítica
- formação de duas fases, cada uma enriquecida num dos polímeros – esta é uma situação comum e corresponde a uma mistura de dois polímeros incompatíveis acima de uma concentração crítica
- formação de duas fases, uma delas rica em polímeros e a outra exclusivamente água – esta situação ocorre quando existe uma forte ligação entre os dois polímeros, geralmente de natureza electrostática. O caso mais comum é a mistura de polielectrólitos de cargas opostas. Devido à importância das forças electrostáticas, estes sistemas bifásicos são altamente dependentes da concentração de sal e pH. Outra situação deste género ocorre quando se misturam em água, um polímero e um componente de baixo peso molecular.

Na tabela 1.1 encontram-se resumidos numa lista extensiva alguns destes sistemas e sua composição. Esta tabela divide os sistemas bifásicos aquosos em quatro categorias de acordo com a natureza dos seus componentes: polímero não iónico - polímero não iónico, polielectrólito - polímero não iónico, polielectrólito - polielectrólito e polímero - componente de baixo peso molecular.

Tabela 1.1 Sistemas Bifásicos Aquosos e suas composições (adaptado de Diamond e Hsu, 1992; Zaslavsky, 1995)

Componente 1	Componente 2	Referência
Polímero não iônico - Polímero não iônico		
Polietileno glicol	Dextrano	1
	Hidroxipropilamido	2
	UCON-50	3
	Ficoll	1
Álcool polivinílico	Metilcelulose	1
	Hidroxipropildextrano	1
	Dextrano	1
Polivinilpirrolidona	Metilcelulose	1
	Maltodextrina	4
	Dextrano	1
Ficoll	Dextrano	1
Poliectrólito - Polímero não iônico		
Sulfato de dextrano (Na)	Polietilenoglicol + NaCl	1
	Metilcelulose + NaCl	1
	Dextrano + NaCl	1
Carboximetilcelulose (Na)	Polietilenoglicol + NaCl	1
	Polivinilálcool + NaCl	1
	Metilcelulose + NaCl	1
Caseína	Dextrano	5
	Pectina	5
	Ficoll	5
Poliectrólito - Poliectrólito		
Sulfato de dextrano (Na)	Carboximetildextrano (Na)	1
	Carboximetilcelulose (Na)	1
Carboximetil dextrano (Na)	Carboximetilcelulose (Na)	1
Caseína	Alginato de sódio+0,1M NaOH	5
	Ovalbumina	5
Polímero - Componente de baixo PM		
Polietileno glicol	Fosfato de sódio	1
	Sulfato de amônio	1
	Sulfato de magnésio	1
	Citrato de sódio	6
	Glucose	7
	Maltose	7
	Maltotriose	7
	β-ciclodextrina	7
	Polivinilpirrolidona	Fosfato de potássio
Dextrano	Álcool propílico	1
Sulfato de dextrano (Na)	Cloreto de sódio (0°C)	1

Referências: 1- Albertsson, 1985; 2- Tjerneld et al, 1986; 3- Harris et al, 1991; 4- Giuliano, 1991; 5- Tolstoguzov, 1988; 6- Vernau e Kula, 1990; 7- Sjoberg et al, 1989.

O diagrama de fases pode ser influenciado por uma série de factores incluindo a concentração e peso molecular do polímero, temperatura, adição de sais ao sistema e pH (Diamond e Hsu, 1992).

Geralmente, a baixas concentrações de polímero, os polímeros são miscíveis com a água e com os outros polímeros, à medida que se aumenta a concentração do polímero aumenta a probabilidade de ocorrer duas fases.

De um modo geral, os diagramas de fases para sistemas polímero-polímero e polímero-sal são tanto mais assimétricos quanto maior for a diferença de peso molecular entre os dois componentes (Albertsson, 1985). Além do aumento da assimetria verificado pelo aumento do peso molecular de um dos componentes também se verifica um aumento do declive da “tie-line” (STL). Por outro lado, quanto maior o peso molecular de um componente, menor é a concentração necessária para a formação de duas fases (Albertsson, 1985; Diamond e Hsu, 1992).

Em sistemas polímero-polímero um aumento da temperatura provoca um afastamento da binodal da origem, enquanto que em sistemas polímero-sal se verifica o contrário.

Em sistemas PEG-dextrano foi demonstrado que sais compostos por iões univalentes (por exemplo NaCl) têm coeficientes de partição próximos de 1.

Zaslavsky et al (1995) demonstraram que aumentando as concentrações de sais univalentes (acima de 0,1M) nos sistemas PEG-dextrano se verifica uma alteração na composição das fases sem contudo se registar um efeito significativo na posição da binodal.

Contudo, sais multivalentes, tais como o fosfato, sulfato e tartarato mostram uma tendência crescente de partição na fase inferior, fase rica em dextrano com concentração de sal crescente e distanciamento do ponto crítico. Estes sais alteram significativamente quer a composição das fases, quer a posição da binodal, nos sistemas PEG-dextrano. Geralmente a binodal é deslocada para concentrações inferiores de polímero. O facto de sais multivalentes serem rejeitados para a fase inferior é compreensível uma vez que estes sais formam por si só sistemas bifásicos aquosos com PEG a concentrações elevadas de ambas as espécies. Estes resultados não devem no entanto ser generalizados, pois outros sistemas bifásicos aquosos (Ficoll-dextrano e Polivinilpirrolidona-dextrano) apresentam comportamentos distintos (Diamond e Hsu, 1992).

Em sistemas PEG-sal o pH também tem influência na binodal, quando o sal é um electrólito fraco cujo grau de ionização depende do pH. Um aumento de pH provoca uma aproximação da binodal da origem. Isto é, uma menor concentração de sal é necessária para se observar a separação de fases.

Em sistemas polímero-polímero, a adição de sais em baixa concentração provoca também a alteração da binodal, dependendo do efeito do sal adicionado.

1.2.1.3. Alteração da estrutura da água em soluções de polímeros e sais

Existem vários modelos que descrevem a estrutura da água no estado líquido. O modelo que gera maior consenso considera que cada molécula de água se coordena em tetraedro com as moléculas de água mais próximas através de pontes de hidrogénio (Henn e Kauzmann, 1989). A estrutura da água líquida consiste então numa rede contínua e tetracoordenada de ligações de hidrogénio, com algumas flutuações em características como o tamanho, ângulo e os parâmetros de energia das ligações.

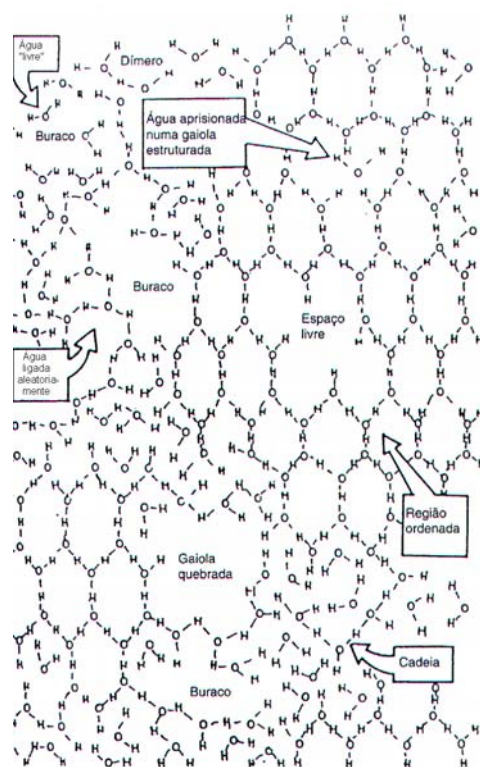


Figura 1.2 Representação esquemática da estrutura da água líquida.

Esta estrutura não é rígida e pode ser perturbada por factores externos como a variação de temperatura e a adição de solutos. O aumento da temperatura, por aumentar o movimento translacional das moléculas, aumenta a desordem e conseqüentemente quebra a estrutura da rede. Pelo contrário, o abaixamento da temperatura implica um aumento da ordenação das moléculas e consolida a estrutura da rede.

De modo semelhante, a adição de sais pode ter o efeito de melhorar ou quebrar a estrutura. A presença de um ião em solução induz as moléculas de água vizinhas a orientarem a extremidade negativa do oxigénio para dentro ou para fora, consoante a carga do mesmo. Esta perturbação provoca alteração e rearranjo da estrutura (Samoilov, 1965). Enquanto que os primeiros reduzem o movimento translacional das moléculas de água, os segundos libertam algumas moléculas de água da estrutura. O efeito dos cátions é reduzido relativamente ao dos aniões (Conway, 1981). Este facto compreende-se observando que os aniões interagem com o eixo OH afectando três vectores de potenciais ligações de hidrogénio. Por analogia com o efeito da temperatura na estrutura da água, os iões podem classificar-se em estruturantes e destruturantes (Conway, 1981). Dos primeiros fazem parte Li^+ , Na^+ , NH_4^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , F^- , SO_4^{2-} , CH_3COO^- , etc. Os segundos incluem iões como K^+ , Rb^+ , Cs^+ , Cl^- , Br^- , I^- , SCN^- , NO_3^- , ClO_4^- etc.

A presença de um polímero em solução altera de igual modo a estrutura da água. Em relação ao PEG, os dados relativamente à sua hidratação diferem de autor para autor e variam entre 2 e 16 moléculas de água por monómero (Zaslavsky, 1995). Se este último número fosse verdadeiro, as soluções de PEG estariam especificamente estruturadas para concentrações superiores a 13% (p/p).

Uma interpretação para esta disparidade de valores é que existem moléculas de água afectadas de dois modos diferentes; ou directamente ligadas ao polímero e por isso fortemente afectadas, ou influenciadas pela alteração induzida na estrutura da água pelas primeiras, e portanto apenas ligeiramente afectadas (Zaslavsky, 1995).

Com base no exposto a separação de fases quando se misturam dois polímeros ou um polímero e um sal deve-se à incompatibilidade entre duas estruturas de água diferentes. Considerando que estas estruturas se comportam como solventes diferentes, este fenómeno é semelhante à bem conhecida incompatibilidade entre alguns solventes orgânicos e água.

1.2.1.4. Modelos Teóricos

A tentativa de interpretação de um determinado fenómeno natural pressupõe a racionalização das observações num modelo que permita prever o comportamento do sistema. Em relação aos sistemas bifásicos aquosos, várias abordagens teóricas têm sido formuladas para interpretar a separação de fases. Os mais importantes descritos na literatura encontram-se descritos abaixo:

a) Modelo de Flory - Huggins

Este é o tratamento teórico mais conhecido e antigo para sistemas bifásicos aquosos. Baseia-se na termodinâmica de soluções de polímero, desenvolvida independentemente por Flory, 1941 e Huggins, 1941. Segundo esta abordagem, as soluções de polímeros podem ser representadas por uma rede tridimensional, em que cada volume unitário é ocupado por um segmento do polímero ou por uma molécula de solvente.

A entalpia das soluções pode então ser calculada pelo somatório das interacções dos vários segmentos de polímero com as moléculas de solvente, ou outros segmentos de polímero adjacentes. A entropia é dada pelo número de distribuições possíveis de moléculas de solvente e de polímero na rede. Aplicando estes pressupostos a uma mistura de dois polímeros (1 e 2) a energia livre de mistura é calculada pela seguinte expressão (Scott, 1949; Brooks e Sharp, 1985):

$$\Delta G_m = (RTV/V_s)[\phi_s \ln \phi_s + \phi_1 \ln(\phi_1/V_1) + \phi_2 \ln(\phi_2/V_2) + \chi_{12}\phi_1\phi_2 + \chi_{1s}\phi_1\phi_s + \chi_{2s}\phi_2\phi_s]$$

em que:

ΔG_m – energia livre de mistura

V e V_s – volume total e volume molar do solvente

ϕ_i – fracção de volume ocupada pelo componente i

χ_{ij} – parâmetros de interacção entre o componente i e j

V_i – razão do volume molar do componente i relativamente ao volume molar do solvente

1, 2, s – índices referentes aos polímeros 1 e 2, e solvente.

A partir desta energia livre é possível calcular o potencial químico de cada espécie em solução, e consequentemente a linha binodal e o ponto crítico.

A teoria de Flory-Huggins sugere que, se a concentração das soluções de polímeros é baixa, então apenas ocorre um pequeno ganho na entropia com a mistura dos polímeros em água. Contudo, uma vez que as cadeias de polímeros têm uma área superficial por molécula muito maior que os compostos de baixo peso molecular, a interação entre segmentos de duas cadeias de polímeros diferentes, que é geralmente desfavorável, levará a uma entalpia positiva que dominará a expressão de variação de energia livre de mistura (ΔG_m). Uma variação de energia livre (ΔG_m) positiva resulta na separação das fases (Diamond e Hsu, 1992).

Este modelo de Flory-Huggins pressupõe que a água não tem um papel determinante na separação de fases, ao contrário da interação dos polímeros (Diamond e Hsu, 1992).

Embora este modelo descreva alguns aspectos qualitativos da separação em duas fases aquosas, deve ser realçado que o modelo original foi desenvolvido com base no modelo de Van der Waals para interações moleculares, e aplicado a soluções de polímeros em solventes apolares. Alguns autores têm posto em causa a adequabilidade deste modelo para descrever soluções aquosas (Zaslavsky, 1995). Além disso, a diferente estrutura das duas fases sugerida experimentalmente não é contemplada.

b) Modelo de Expansão Virial

Neste modelo as soluções de polímero são termodinamicamente descritas por uma série de potências da concentração de polímero com coeficientes determinados empiricamente (Edmond e Ogston, 1968).

Os diagramas de fase são calculados assumindo que, para cada espécie o potencial químico deve ser igual em ambas as fases. O potencial químico do solvente é descrito por:

$$\mu_1 - \mu_1^o = -kTv_1\rho_1 [m_2 + m_3 + \frac{1}{2} a_{22} (m_2)^2 + \frac{1}{2} a_{23} (m_3)^2 + a_{23} (m_2m_3)]$$

em que:

μ_1 – potencial químico do solvente

μ°_1 – potencial químico do solvente puro

k – constante de Boltzmann

T – temperatura absoluta

v_1 - volume molar do solvente

ρ_1 - densidade do solvente

m_2 e m_3 - concentração molal dos polímeros 2 e 3

a_{ij} - coeficientes viriais de segunda ordem dos componentes i e j

Os coeficientes viriais representam as interações entre os componentes do sistema. Assim, os coeficientes de segunda ordem reflectem a força de interacção entre dois componentes, os de terceira ordem entre 3 e assim sucessivamente.

Os coeficientes viriais representam por definição interacções em soluções diluídas, pelo que, sendo a concentração de polímeros em cada uma das fases de 5-25 % (p/p), possivelmente os factores ajustados são apenas empíricos e não reflectem nenhuma realidade física (Baskir et al, 1989).

c) Modelo Binodal

Recentemente foi elaborado um modelo aplicando os conceitos de geometria estatística, denominado de modelo binodal.

Neste modelo, as moléculas de um polímero distribuem-se aleatoriamente em solução (Guan et al, 1993). Com a adição de outro polímero ou sal, as moléculas deste componente vão ocupar os “espaços livres” entre as moléculas do primeiro polímero. Ao ser atingida uma determinada concentração deste segundo componente a solução fica geometricamente saturada. Isto é, não existe mais nenhum “espaço livre” capaz de comportar uma molécula de polímero adicionado. Atinge-se portanto o limite de saturação que corresponde à linha binodal. A adição subsequente do segundo polímero origina a formação de duas fases com estruturas diferentes.

Segundo este modelo, a condição de saturação é atingida quando o volume de polímero adicionado é igual ao volume de espaços livres capazes de o acomodar, existentes na solução de polímero inicial.

Utilizando esta relação e a distribuição de Poisson para a probabilidade de encontrar um espaço livre capaz de comportar o polímero adicionado, obtém-se a seguinte expressão para a linha binodal:

$$\ln (\langle v^* \rangle_{210} \cdot w_2 / \langle M_{rms} \rangle_2) + \langle v^* \rangle_{210} \cdot w_1 / \langle M_{rms} \rangle_1 = 0$$

em que:

w_i – concentração total do componente i em solução

$\langle v^* \rangle_{210}$ – volume excluído efectivo

$\langle M_{rms} \rangle_i$ – estimativa de peso molecular médio do componente i

1,2 – índices referentes aos polímeros 1 e 2

Assim, para o cálculo da binodal apenas precisamos de conhecer o volume excluído efectivo e a massa molecular média dos componentes. O volume excluído efectivo representa o espaço mínimo necessário entre duas moléculas do componente 1 para acomodar o componente 2.

Esta equação deve ser considerada semi-empírica, uma vez que, em sistemas PEG-sal, devido à existência de iões é pouco provável que a distribuição dos componentes da solução seja completamente aleatória, que é um dos pressupostos básicos deste modelo.

d) A Equação de Setschenow

Relativamente a sistemas polímero-sal uma abordagem mais simplista foi elaborada. A separação de fases nestes sistemas deve-se ao efeito de um electrólito (sal) na solubilidade de um não electrólito (polímero) - fenómeno denominado de “*salting-out*”. O fenómeno de “*salting-out*” traduz-se na diminuição de solubilidade e consequente precipitação de um soluto quando é adicionado um outro soluto (sal) à solução.

No caso dos sistemas bifásicos aquosos, o sal diminui a solubilidade do polímero na fase do sal, e este forma uma outra fase. Matematicamente este fenómeno pode ser descrito pela equação de Setschenow:

$$\log (S/S_0) = K_s C_s$$

em que:

S – solubilidade do soluto

S₀ – solubilidade do soluto inicial (antes da adição de outro soluto)

K_s – constante de Setschenow

C_s – concentração do soluto adicionado

A equação de Setschenow apenas é válida para situações em que um dos componentes é muito menos concentrado do que o outro, e em que o soluto adicionado é o componente de maior concentração.

1.2.1.5. Partição em Sistemas de Duas Fases Aquosas

Ao adicionar um composto ou uma partícula a um sistema de duas fases aquosas, observa-se a sua distribuição diferencial entre as duas fases.

Esta resulta das diferentes características físico-químicas das fases e, conseqüentemente da diferente afinidade do componente adicionado para cada uma delas. Quantitativamente a diferença de afinidade é expressa em termos de um parâmetro denominado coeficiente de partição (k), que é obtido pela razão de concentrações (ou actividades) do composto nas duas fases. Este coeficiente representa as concentrações do componente em cada uma das fases no equilíbrio, e portanto corresponde ao mínimo de energia do sistema. O coeficiente de partição pode ser separado em vários termos:

$$\ln k = \ln k_0 + \ln k_{exc} + \ln k_{hfob} + \ln k_{elect} + \ln k_{afin}$$

em que k_{exc} , k_{hfob} , k_{elect} e k_{afin} representam respectivamente as contribuições devidas à exclusão, hidrofobicidade, interacção electrostática e à afinidade específica. O termo k_0 inclui todos os outros efeitos.

A partição de substâncias com actividade biológica em sistemas bifásicos aquosos varia com inúmeros factores de ordem ambiental e factores de ordem estrutural. Assim, o coeficiente de partição pode ser expresso como:

$$\ln k = \ln k_{ambiente} + \ln k_{estrutura}$$

As condições do sistema que influenciam a partição da proteína incluem tipo de sal e concentração; pH; tipo de polímero e peso molecular; presença de ligandos bioespecíficos; e temperatura.

As propriedades estruturais da proteína incluem o seu peso molecular; estruturas primária, secundária, terciária e quaternária; carga; hidrofobicidade e outras propriedades de superfície (Diamond e Hsu, 1992).

A partição de compostos com actividade biológica pode ser ajustada por manipulação da composição do sistema bifásico aquoso. A estrutura, presença de grupos iónicos e massa molecular dos polímeros influenciam a partição.

Exclusão

Um dos factores que determina a dissolução de um componente, em termos moleculares, é a formação de uma cavidade na estrutura do solvente que permita englobar o soluto. A estrutura do solvente, bem como a disponibilidade de espaços vazios define a maior ou menor facilidade de formação dessa cavidade. A totalidade do espaço não ocupado existente no solvente denomina-se de volume livre. Embora não seja possível quantificá-lo em termos absolutos, é possível definir a sua variação em relação a uma solução de referência. Assim, define-se volume livre relativo como sendo a diferença entre o inverso da densidade de duas soluções (Eiteman e Gainer, 1989).

$$V_f = 1/\rho - 1/\rho_0$$

em que:

V_f – volume livre relativo

ρ_0 e ρ - densidades da solução antes e depois da adição do componente

Em sistemas de duas fases aquosas podemos então definir a variação de volume livre (ΔV_f) entre as duas fases como sendo a diferença de volume relativo entre as mesmas, utilizando como referência a solução antes da separação de fases. Podemos então escrever (Eiteman e Gainer, 1989):

$$\Delta V_f = (1/\rho - 1/\rho_0)_s - (1/\rho - 1/\rho_0)_i = (1/\rho_s - 1/\rho_i)$$

em que, s corresponde à fase superior e i à fase inferior.

Sendo a densidade da fase superior menor que a da fase inferior, este valor é sempre positivo. Isto significa que o volume livre na fase superior é sempre maior que na fase inferior. No entanto, embora a totalidade de espaço livre na fase superior seja maior, isto não significa necessariamente que esta possa albergar mais moléculas de um determinado componente adicionado. Esta capacidade depende da estrutura do componente dominante nessa fase e conseqüentemente da estrutura da mesma. Podemos então definir um outro parâmetro denominado volume excluído, que corresponde ao somatório de todos os espaços livres em solução capazes de acomodar o componente adicionado. O volume excluído é característico de cada componente e está extremamente dependente da sua geometria e volume.

A capacidade de cada fase acomodar o componente adicionado, determinará a partição. Esta capacidade vai estar dependente do tamanho do componente e da composição do sistema.

Em relação ao tamanho, os componentes pequenos apresentarão distribuição semelhante nas duas fases, uma vez que facilmente se acomodarão em qualquer das estruturas. Com o aumento de tamanho será observada uma preferência nítida para uma das fases. Albertsson et al (1985), demonstraram que o efeito exercido pela alteração do peso molecular do polímero também depende do peso molecular da proteína. Estes mostraram que a magnitude de alteração do coeficiente de partição da proteína, era pequena para proteínas de peso molecular 10 000 Da, mas elevada para pesos moleculares de 250 000 Da (Diamond e Hsu, 1992).

Este tipo de comportamento foi observado para um conjunto de proteínas de diferentes pesos moleculares, em sistemas PEG-dextrano tamponizados ao pH correspondente ao ponto isoelétrico da proteína em estudo (Figura 1.3).

Verificou-se que com o aumento de peso molecular, se regista uma maior acumulação de proteína na fase inferior rica em dextrano (Sasakawa e Walter, 1972).

A composição dos sistemas determina o volume livre e conseqüentemente a partição. À medida que se aumenta a concentração de polímero, portanto deslocando-se mais do ponto crítico, a partição da proteína tem tendência a tornar-se mais extrema (Diamond e Hsu, 1992).

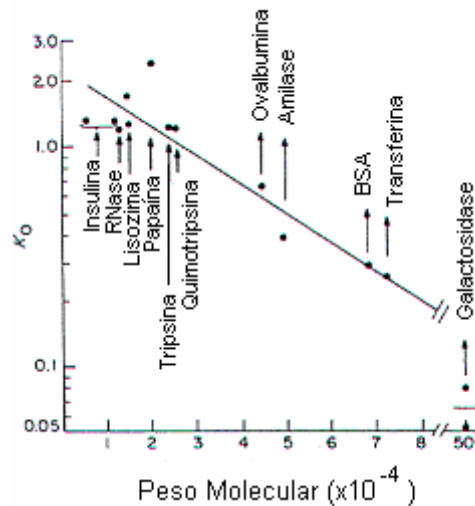


Figura 1.3 – Variação do coeficiente de partição de várias proteínas com diferentes pesos moleculares. Determinações realizadas no ponto isoelétrico da proteína, em sistemas Dextrano T500 (7% (p/p)) – PEG 6000 (4,4% (p/p)) contendo 0,1M NaCl ou 0,05M Tampão fosfato ou glicina a 20°C (adaptado de Sasakawa e Walter, 1972).

Estudos realizados em sistemas PEG-sal demonstram que a adição de sais, o pH e o comportamento da “tie-line”, influenciam significativamente o volume livre.

O efeito do peso molecular do polímero pode ser muito útil para manipular o coeficiente de partição das proteínas. Geralmente observa-se que o aumento do peso molecular do polímero ou a da sua concentração numa das fases, dirige a partição do componente em estudo para a outra fase, ou seja para a fase oposta à fase rica no polímero em causa – efeito de exclusão (Albertsson, 1985; Diamond e Hsu, 1992). Este comportamento pode ser interpretado em termos de exclusão uma vez que, qualquer das situações corresponde ao aumento da densidade da solução. Deste modo, o volume livre e consequentemente o volume excluído vão diminuir, e o componente terá mais dificuldade em se acomodar nessa fase.

Hidrofobicidade

A hidrofobicidade é um termo que define a pouca afinidade de uma molécula ou grupo químico para a água. Sendo a estrutura da água estabilizada por ligações de hidrogénio, as interacções favoráveis de qualquer molécula com a água serão de natureza polar. Assim, grupos químicos apolares são designados hidrófobos porque não estabelecem interacções favoráveis com a água. Grupos químicos ou moléculas

hidrófobas vão originar uma quebra da estrutura da água, formando as moléculas de água uma espécie de gaiola em volta deste componente (corresponde a uma diminuição de entropia e conseqüentemente é termodinamicamente desfavorável).

Quando vários grupos apolares se encontram dissolvidos em água, estes vão ter tendência para se agruparem, diminuindo assim as alterações à estrutura da água. Este efeito denomina-se efeito hidrófobo e desempenha um papel predominante na organização das estruturas biológicas. Por exemplo, o enrolamento das cadeias polipéptídicas para a formação de proteínas globulares é, em grande parte devido este efeito. Neste caso, os resíduos de aminoácidos com grupos hidrófobos vão ter tendência a agruparem-se no interior da proteína, deixando os resíduos de aminoácidos com grupos polares no exterior.

Os sistemas bifásicos aquosos são formados por dois solventes imiscíveis e portanto com hidrofobicidades diferentes. A diferença de hidrofobicidades entre fases vai ser determinante no processo de partição de um soluto. A hidrofobicidade de cada uma das fases vai depender do tipo e concentração do polímero, e do tipo e concentração de sais presentes.

Aumentando a concentração de polímero verifica-se um aumento da hidrofobicidade do polímero até um valor limite.

Em relação ao peso molecular, o efeito deste na hidrofobicidade do meio depende do tipo de polímero. Assim, enquanto que no caso do PEG e da poliacrilamida, a hidrofobicidade aumenta com o peso molecular do polímero (Masimov et al, 1984), para a polivinilpirrolidona a tendência é inversa (Zaslavsky et al, 1984).

Não foi realizado um estudo sistemático sobre a influência da concentração e tipo de sal na hidrofobicidade de uma solução. No entanto, sabe-se que o aumento da força iónica produz um aumento do efeito hidrófobo. O aumento do número de iões em solução provoca uma diminuição do número de moléculas de água livres para a solvatação hidrófoba, o que origina uma maior tendência de agrupamento dos solutos apolares. Alguns dos polímeros usados em sistemas bifásicos aquosos, embora sejam solúveis em água, contêm vários segmentos apolares. Em soluções destes polímeros é previsível que o aumento da força iónica promova um aumento da interacção hidrófoba entre os solutos apolares e o polímero. Assim, em sistemas bifásicos aquosos, o aumento da força iónica induz o aumento de interacções hidrófobas na fase rica em

polímero apolar. Será então de esperar um deslocamento dos solutos apolares para a fase rica no polímero mais hidrófobo.

Interação Electrostática

Os efeitos electrostáticos estão relacionados com o campo eléctrico gerado por um ião em solução. Em termos de composição do sistema, estes efeitos vão ser determinados pela concentração e tipo de sais presentes. O valor de pH determina a carga dos solutos e dos componentes do sistema quando estes são electrólitos e, consequentemente a razão entre as concentrações das diferentes espécies.

O anião e catião constituintes de um sal exibem, geralmente, afinidades diferentes para as duas fases. Pela condição de electroneutralidade, as suas concentrações são iguais em cada uma delas. No entanto, esta diferença de afinidade gera uma diferença de potencial na interface.

Embora as fases sejam globalmente neutras, a diferente distribuição dos iões perto da interface origina uma diferença de potencial entre as duas (Albertsson, 1985).

Segundo Albertsson (1985), esta diferença de potencial (0-20mV) vai influenciar a partição de polielectrólitos como proteínas e ácidos nucleicos, de acordo com a seguinte expressão:

$$\ln k_p = \ln k_p^0 + Fz/RT \Delta\phi$$

em que:

F – constante de Faraday

R – constante dos gases ideais

T – temperatura absoluta

$\Delta\phi$ - diferença de potencial

z – carga

k_p – coeficiente de partição do polielectrólito

k_p^0 - coeficiente de partição do polielectrólito quando a sua carga é nula

Analisando esta expressão, verifica-se que a partição de um polielectrólito é extremamente dependente da sua carga. De facto, observou-se experimentalmente que o coeficiente de partição (k) das proteínas, ribonuclease A (Johansson, 1974 a.), lisozima e ovalbumina (Johansson, 1974 b.) dependia da sua carga pela seguinte relação empírica:

$$\ln k = \ln k_0 + \gamma z$$

em que:

k – coeficiente de partição da proteína

k₀ – coeficiente de partição da proteína no seu ponto isoeléctrico

z – carga da proteína

γ - factor que depende da composição do meio. $\gamma = (F/RT)\Delta\phi$

A partição de um soluto de carga nula será independente da composição salina do meio. Isto é, o coeficiente de partição de uma proteína no seu ponto isoeléctrico num determinado sistema de duas fases não será influenciado pela concentração ou tipo de sais adicionados. Esta premissa permite determinar o ponto isoeléctrico de uma proteína.

Os sais têm diferentes efeitos na estrutura da água alterando assim as características das duas fases e conseqüentemente a partição dos solutos.

A adição de sais a sistemas bifásicos aquosos pode ser usada efectivamente para alterar o coeficiente de partição das proteínas. Geralmente, para proteínas carregadas negativamente em sistemas PEG-dextrano, o coeficiente de partição diminui ao longo das séries de iões $\text{HPO}_4^{2-} > \text{SO}_4^{2-} > \text{F}^- > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^- > \text{SCN}^- > \text{ClO}_4^-$ e $\text{Li}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+$, verificando-se o contrário para proteínas carregadas positivamente (Diamond e Hsu, 1992).

Embora seja geralmente aceite que a diferença de potencial entre as fases promove a partição dos solutos em função da sua carga, algumas reflexões recentes têm posto esta regra em causa (Zaslavsky, 1995). Embora exista uma diferença de potencial interfacial, as duas fases são electricamente neutras. Uma vez que esta condição deve ser mantida, o transporte de um ião de uma fase para a outra será sempre acompanhado pela passagem de um ião de carga oposta. Deste modo, a diferença de potencial não afecta a partição de solutos iónicos, uma vez que apenas quantidades equivalentes de iões de cargas diferentes podem ser transferidas através da interface. A diferença de potencial deverá então ser vista como caracterizando as interacções electrostáticas existentes nas duas fases. Mais especificamente, caracterizará a capacidade de hidratação dos catiões e aniões do sal adicionado, que corresponde a uma medida da diferença entre as estruturas das duas fases.

Estudos recentes comprovam que a carga da proteína não é determinante na sua partição. A proteína taumatina foi modificada quimicamente de modo a apresentar

diferentes pontos isoelétricos (Franco et al, 1996). As quatro proteínas modificadas deste modo não apresentaram coeficientes de partição significativamente diferentes nos vários sistemas PEG-sal e PEG-dextrano estudados (Franco et al, 1996). Além disso, as pequenas diferenças observadas podem ser atribuídas à concomitante ligeira alteração de hidrofobicidade.

Afinidade Específica

O efeito da afinidade difere dos outros por consistir na interação particular de um componente das duas fases com o soluto. Este componente denominado ligando tem uma afinidade específica para um determinado soluto. Deste modo, é possível direccionar a partição de um soluto para uma determinada fase pela acumulação nessa fase de um ligando específico para esse composto. A acumulação do ligando numa fase pode ser conseguida de dois métodos diferentes: pela selecção de condições de modo a que o ligando se acumule nessa fase, ou por ligação covalente do ligando ao polímero predominante nessa fase (sendo o último método o mais utilizado).

Os sistemas de duas fases aquosas têm sido principalmente utilizados para a separação de material de origem biológica, proteínas, ácidos nucleicos, células, organitos e fragmentos celulares. Deste modo, os ligandos utilizados baseiam-se em interações bioquímicas. No caso das proteínas têm sido utilizados substratos, inibidores (Takerkart et al, 1974), cofactores (Persson e Olde, 1988) e anticorpos monoclonais (Elling e Kula, 1991).

Outros compostos muito utilizados na separação de proteínas têm sido os corantes de triazina. Estes apresentam vantagens em termos de preço relativamente aos compostos de origem natural, e exibem grande afinidade para enzimas do grupo das desidrogenases e cinases.

Ligandos menos específicos têm também sido utilizados para direccionar a partição de proteínas num determinado sentido. Um dos mais utilizados é o palmitato. Este ácido gordo covalentemente ligado ao PEG permite aumentar significativamente a partição de lactalbumina e albumina do soro humano para a fase contendo este derivado, em sistemas PEG-dextrano (Johansson e Shanbhag, 1984). O aumento registado deve-se provavelmente à ligação do ácido gordo a determinadas regiões da proteína com grande afinidade para este tipo de compostos. Na albumina do soro

humano por exemplo, é sabido que existem vários locais de ligação a ácidos gordos de cadeia longa.

Foi realizado um estudo sistemático sobre o efeito de vários ésteres de PEG na partição de algumas proteínas (Johansson, 1976). Verificou-se que em relação às albuminas de soro humano e bovino, os ésteres de ácidos gordos apenas provocaram um efeito semelhante ao do palmitato, para cadeias maiores o efeito aumenta com o comprimento desta.

A partição de outras proteínas como a lisozima, ovalbumina e ribonuclease não regista alteração significativa na presença de qualquer dos derivados testados.

A alteração da partição induzida por ligandos derivados de PEG contendo grupos carregados será devida à interacção directa, de natureza electrostática, entre o ligando e a proteína. Deste modo, a carga global da proteína não será muito relevante, sendo o factor determinante a carga dos grupos químicos envolvidos na interacção.

Existem uma série de parâmetros que influenciam a partição de afinidade de proteínas, que incluem a concentração do ligando e características de ligação, concentração do polímero, concentração de sal, peso molecular do polímero, temperatura, número de ligandos por molécula, existência de solventes orgânicos e tipo de proteína (Diamond e Hsu, 1992).

Dos estudos efectuados sobre a partição por afinidade foram retiradas as seguintes conclusões (Venâncio, 1996):

- $\log k$ varia com a concentração de ligando, aproximando-se de um valor de saturação. A massa molecular dos polímeros constituintes do sistema bifásico pode ter um efeito acentuado na partição.
- $\Delta \log k$ aumenta com o afastamento da binodal, resultante do aumento da concentração dos polímeros constituintes do sistema bifásico aquoso.
- o aumento de temperatura reduz fortemente $\Delta \log k$.
- $\Delta \log k$ aumenta com a diminuição do pH, usualmente este efeito é acompanhado por uma diminuição na selectividade da extracção.
- a presença de sais diminui $\Delta \log k$ e esta diminuição é mais acentuada à medida que se aumenta a concentração de sais. Diferentes sais apresentam diferentes

efeitos. Enquanto íões de fosfato ou acetato têm uma influência reduzida sobre $\Delta\log k$, íões como o iodeto ou perclorato reduzem fortemente a partição.

- a adição de nucleotídeos elimina a partição por afinidade por competição com os ligandos pelos locais de ligação nas proteínas. A presença de íões de magnésio aumenta este efeito.

- por selecção cuidadosa dos corantes de triazina empregues a selectividade pode ser melhorada. O uso de dois ligandos, um em cada fase pode ser bastante útil.

1.2.2 Aplicação de Sistemas de Duas Fases Aquosas à Purificação de Proteínas

A extracção e purificação de proteínas é uma das aplicações mais importante dos sistemas de duas fases aquosas. Para tal contribui a crescente importância económica atribuída a preparações puras de proteínas. Relativamente a outros processos estes sistemas apresentam várias vantagens. Destas destacam-se a sua simplicidade técnica, a facilidade de implementação em larga escala e a possibilidade de desenvolver processos de baixo custo comparativamente com outros métodos. De acordo com Albertsson (1985) as principais vantagens na utilização de sistemas bifásicos aquosos são (Diamond e Hsu, 1992):

- facilidade no aumento de escala
- rápida transferência de massa
- equilíbrio alcançado com baixas energias na forma de mistura mecânica
- enzimas estabilizadas pelos polímeros
- possibilidade de operação em contínuo
- possibilidade de separação rápida e selectiva
- possibilidade de operação à temperatura ambiente
- mais económico que outros processos de separação

Estes sistemas apresentam contudo algumas desvantagens, como por exemplo a inexistência de um modelo adequado capaz de prever, de um modo geral e com apreciável rigor, a partição de solutos. A integração de vários efeitos num único modelo

ainda não foi realizada. Vários estudos comprovam que o coeficiente de partição de proteínas puras aumenta relativamente a extractos brutos.

A selecção de um sistema para a purificação de uma determinada proteína é geralmente empírica. Isto é, variam-se sistematicamente determinados parâmetros separadamente até se atingir um resultado aceitável. No entanto, isso por vezes é impossível, uma vez que os parâmetros experimentalmente manipuláveis influenciam em geral mais do que um factor.

As características dos sistemas de duas fases aquosas estão dependentes do tipo de polímero ou polímeros presentes, das suas concentrações, do tipo e concentração de sais presentes e do pH. Os polímeros presentes vão não só determinar a hidrofobicidade de cada uma das fases mas também o volume livre. A concentração de sais vai determinar o volume livre, as interacções hidrófobas e electrostáticas. O pH, por fazer variar o grau de protonação de electrólitos fracos presentes, altera a concentração de cationes e anions. Além disso, altera a carga média de polielectrólitos presentes, como as proteínas. Um dos parâmetros que geralmente se varia é o comprimento da “tie-line”, que corresponde à variação da diferença de concentrações dos componentes em cada uma das fases. Deste modo, todos os principais factores vão ser variados.

A utilização de ligandos específicos para a proteína alvo é aparentemente a única maneira de prever a partição. No entanto, mesmo neste caso o processo não é tão simples como parece. Além das particularidades associadas a este método, é necessário dispor de ligandos suficientemente específicos para a proteína e de fácil ligação a polímeros.

Apesar de todas as restrições, a variação sistemática de parâmetros permite seleccionar condições para a purificação de proteínas, a nível laboratorial e mesmo em grande escala.

É possível obter elevados factores de purificação com apreciáveis níveis de recuperação. Este processo constitui uma alternativa válida aos passos iniciais de purificação de proteínas. Uma das desvantagens práticas da utilização deste método é a necessidade de eliminar os polímeros da preparação parcialmente purificada.

Um processo muito simples e utilizado, consiste na adição de uma solução salina à fase polimérica contendo a proteína. Obtém-se um novo sistema de duas fases aquosas

que, com as condições adequadas, permite recolher a proteína na fase de sal, onde a concentração de polímero é mínima.

Alternativamente podem-se utilizar a diálise, ultrafiltração ou cromatografia de permeação molecular. Embora mais eficientes estes métodos são mais demorados e mais dispendiosos.

Os sistemas de partição bifásica aquosa embora ainda pouco implementados podem competir com vantagens com os métodos clássicos de purificação de proteínas.

1.2.3. Aplicação de Sistemas de Duas Fases Aquosas em Grande Escala

A extracção como operação unitária requer duas etapas: a mistura de correntes líquidas imiscíveis e a separação das fases resultantes. Cada ciclo mistura/separação constitui um prato teórico. À escala laboratorial a extracção é facilmente conseguida em tubos de ensaio.

Em operações contínuas à escala industrial, a mistura pode ser obtida em reactores agitados, e a separação por centrifugação ou por acção da gravidade em tanques estagnados. A centrifugação é usada sempre que a viscosidade da corrente à saída do misturador seja elevada, ou sempre que a diferença de densidades entre as fases do sistema bifásico seja demasiado pequena. A separação por acção da gravidade é utilizada em casos em que o produto é suficientemente estável para não ser afectado durante o tempo necessário para a separação.

O coeficiente de partição mantém-se quando se altera a escala do processo, assim, conseguem-se previsões precisas do comportamento em grande escala, partindo de dados laboratoriais.

O consumo de reagentes químicos, isto é, sais e polímeros, pode constituir uma limitação da aplicabilidade destes sistemas à escala industrial, por este motivo a recirculação de reagentes desempenha um papel importante. A recirculação dos reagentes constituintes do sistema bifásico pode reduzir os custos do processo, por diminuição dos custos com reagentes e dos custos de tratamento de efluentes (Venâncio, 1996).

1.2.4. Conclusões

A extracção com sistemas bifásicos aquosos pode ser economicamente competitiva na separação de proteínas, células e componentes celulares.

A grande vantagem destes sistemas reside nos seus baixos tempos de processamento, elevadas capacidades volumétricas e facilidades de aumento de escala.

Os sistemas bifásicos aquosos apresentam um investimento total e custos de produção muito inferiores, quando comparados com outras técnicas tradicionais. Os custos de produção podem ainda ser reduzidos se se apostar na recirculação de reagentes constituintes do sistema bifásico.

Os sistemas bifásicos aquosos permitem a separação de uma vasta gama de compostos e partículas com actividade biológica. A separação pode ser obtida por manipulação de uma série de variáveis nomeadamente a carga eléctrica, recurso a ligandos bioespecíficos ou hidrofobicidade.

Comercializado pela Reppe AB, sob o nome comercial de Reppal PES (hidroxipropilamido purificado), este tem sido logo a seguir ao dextrano, o mais empregue em partição bifásica aquosa (Venâncio, 1996). A substituição de dextrano por Reppal em sistemas bifásicos aquosos provocou uma diminuição de 7x no custo dos reagentes. Esta redução embora significativa não é suficiente.

Apesar do elevado custo dos reagentes estas técnicas de extracção não deixam de ser competitivas quando comparadas com outras técnicas (por exemplo centrifugação ou filtração) e deve-se apostar na procura de novos polímeros com custos inferiores ou na implementação de técnicas de recirculação de reagentes.

1.3 Soro de Queijo

1.3.1 Considerações Gerais

Na indústria de laticínios, o termo soro é usado para definir o líquido esverdeado que permanece em solução após a precipitação das caseínas (formação de coalho) durante o fabrico do queijo ou produção de caseínas (Moulin e Galzy, 1993; Jelen, 1992)

O soro apesar de ser um subproduto da indústria de laticínios, possui um elevado valor nutritivo uma vez que retém a maior parte dos componentes do leite; 10 litros de leite produzem cerca de 1 quilograma de queijo e 9 litros de soro, que retém cerca de 6,3-12,4% (p/v) de lípidos, 21,4-25,1% (p/v) de compostos azotados, 88,0-99,3% (p/v) de lactose, 61,8-88,5% (p/v) de sais e 49,0-50,0% (p/v) de sólidos totais do leite (Monzón e Olano, 1977)

Assim, os sólidos do soro são essencialmente lactose, proteínas e minerais. O conteúdo em gordura pode variar entre 0,5-1,0%, dependendo do tipo de leite usado e do processo de fabrico do queijo. No entanto esta gordura pode ser aproveitada, retornando ao processo de produção de queijo ou sendo processada em manteiga (Jelen, 1992).

Apesar do soro apresentar normalmente estas características, a sua composição varia com o tipo de tratamento a que o leite é submetido (aquecimento, centrifugação, homogeneização), com o processo de fabrico de queijo ou caseínas e com o tratamento que o soro sofre após estar separado do coalho (pasteurização, pré-concentração e remoção de partículas de caseína).

Tabela 1.2 Distribuição (% p/v) dos componentes do leite no coalho e no soro (adaptado de Kirk e Sawyer, 1991).

Componente	Leite (%)	Coalho (%)	Soro (%)
Água	87,3	6,5	80,8
Gordura	3,7	3,5	0,2
Lactose	4,7	0,3	4,4
Caseínas	3,0	2,6	0,4
Proteínas	0,4	Vestígios	0,4
Minerais	0,7	0,1	0,6

Em geral, a produção de queijo é iniciada com o tratamento térmico do leite e adição de uma cultura microbiana para acidificar o leite a um pH 5,9-6,3. A etapa seguinte é a coagulação do leite, a qual pode ser realizada por um abaixamento do pH a 4,5-4,8 ou por acção de uma enzima específica, a renina, adicionada sob a forma de extracto comercial (Kirk e Sawyer, 1991).

As caseínas encontram-se organizadas no leite sob a forma de grandes micélios esféricos. As caseínas são usadas na produção de queijo, embora possam também ser incorporadas em produtos de pastelaria ou molhos (Zydney, 1998). Estas podem ainda ser usadas para a preparação de péptidos biologicamente activos para usar em suplementos dietéticos ou como drogas naturais (por exemplo a β -casomorfina) (Maubois e Ollivier, 1997).

A precipitação de caseínas pode ser conseguida pela acidificação não acima de pH 5,1, como na produção de queijo ácido ou caseína ácida (produção de soro ácido), ou pela destabilização dos micélios de caseína por via enzimática a pH não inferior a 5,6, tal como na produção de queijos de coalho (produção de soro doce) (Morr, 1989; Pearce, 1986).

Na coagulação ácida, o pH baixa quer por fermentação microbiana da lactose presente no leite em ácido láctico, quer por adição directa de ácidos minerais ou orgânicos (Banks, 1998). O soro resultante deste processo é designado por **soro ácido** (pH máximo 5,1). Em contraste, o **soro doce** obtido a partir do coágulo de leite formado por acção enzimática, a $\text{pH} > 6,0$, contém um teor em ácido láctico muito baixo. No entanto, o conteúdo deste ácido pode aumentar drasticamente se a fermentação bacteriana não for controlada rapidamente por pasteurização e/ou arrefecimento rápido.

Quando o coágulo tiver a consistência desejada, é cortado ou partido, para se proceder à remoção do soro, por um processo que envolve tratamento térmico e ajuste do pH.

Estes passos iniciais são comuns a todos os processos de fabrico de queijo, enquanto que as etapas seguintes são específicas para cada tipo de queijo.

Cerca de 80% da proteína no soro consiste em betalactoglobulina e alfalactalbumina e ambas são extremamente nutritivas.

As concentrações de betalactoglobulina (β lg), alfa lactalbumina (α la), BSA e imunoglobulinas (IgG) no soro bovino são (2-4), (1-1.5), (0.1-0.4), e (0.6-1.0) g/l, respectivamente (Fox, 1989).

As proteínas do soro puras e no seu estado nativo têm elevado valor funcional e nutricional não encontrado noutras proteínas vulgarmente utilizadas como aditivos na indústria alimentar, como por exemplo a proteína de soja e de ovo (Etzel, 1995).

Tabela 1.3 Composição do soro ácido e doce em % (p/p)

Componente	Soro <i>Ácido</i>		Soro <i>Doce</i>		Ref ^a
	Líquido	Matéria Seca	Líquido	Matéria Seca	
Lactose	4,4	69	4,9	74	Morr, 1989 Etzel, 1995
Proteína	0,7	11	0,8	12	
Minerais	0,8	12	0,5	8	
Gordura	0,04	0,6	0,2	3	
Ác.Láctico	0,5	0,8	0,2	3	
Água	93,6		93,4		Pearce, 1986
β lg	54		45		
α la	23		18		
BSA	6		5		
IgG	6		5		
Derivados Caseína	2		20		
Outros	7		7		

A composição dos soros bovinos não é sempre a mesma e altera-se devido à técnica de produção de queijo acoplada a variações sazonais e claro, também com as espécies produtoras e a sua alimentação.

O soro doce é geralmente mais rico em lactose, enquanto que o soro ácido exhibe uma maior concentração em minerais. A composição proteica de ambos os soros é semelhante no que se refere à maioria das proteínas.

A concentração de lactose no soro ácido é menor do que no soro doce, devido ao processo de fermentação, pois uma fracção de lactose é transformada em ácido láctico, durante a formação do coalho. Por outro lado, o soro ácido contém mais cálcio e fósforo que o soro doce, devido à solubilização do complexo Ca-P, existente nos micélios de

caseína, a pH ácido. No soro doce, a acção da renina não provoca a diminuição do pH, logo o ião cálcio é retido no queijo.

As diferenças na acidez e no conteúdo mineral, entre os dois tipos de soro, são as responsáveis pelas diferentes propriedades físico-químicas que apresentam.

Em relação às propriedades ópticas do soro, estas são influenciadas pelo tipo e concentração de proteína e essencialmente pelo conteúdo de riboflavina no soro, vitamina que confere ao soro uma cor esverdeada.

No entanto, o soro pode apresentar uma tonalidade amarela, devido à coloração durante o fabrico de queijo. A turbidez do soro deve-se à presença de pequenas quantidades de caseína no soro (Jelen, 1992).

1.3.2 Utilização do Soro

Os produtos obtidos a partir do soro podem, consoante o processamento a que estão sujeitos, ser designados de soro líquido, soro em pó, soro em pó parcialmente deslactosado, soro em pó parcialmente desmineralizado (< 7% cinzas), soro em pó deslactosado e desmineralizado, soro em pó desmineralizado (<1,5% cinzas), isolados proteicos de soro (>90% proteína seca) e concentrados proteicos de soro (> 25% proteína seca) (Mathews, 1984).

Os produtores de soro devem decidir qual o seu destino final dentro de três opções possíveis (Zall, 1992):

- reduzir a produção de soro a partir do fabrico de queijo, por alteração selectiva da composição do leite ou utilizando a ultrafiltração para pré-concentrar o leite
- usar o soro como um subproduto valioso para utilizar na indústria alimentar, farmacêutica ou noutros sectores de actividade; ou ainda como matéria prima para a indústria petroquímica
- eliminar o soro como efluente.

As tecnologias de processamento de soro têm crescido exponencialmente nos últimos 10 anos devido ao desenvolvimento dos processos membranares e dos métodos de permuta iónica, bem como devido a um melhor entendimento do soro como matéria-prima. O soro como matéria-prima pode conferir à tecnologia alimentar novas

potencialidades devido às propriedades nutricionais e funcionais das suas proteínas (Huffman, 1996).

Os métodos de processamento de soro na indústria de lacticínios têm passos de purificação comuns e por isso, independentemente do processo, a maioria do equipamento necessário para instalar uma unidade de processamento deste produto, é comum em todas as unidades (Mathews, 1984)

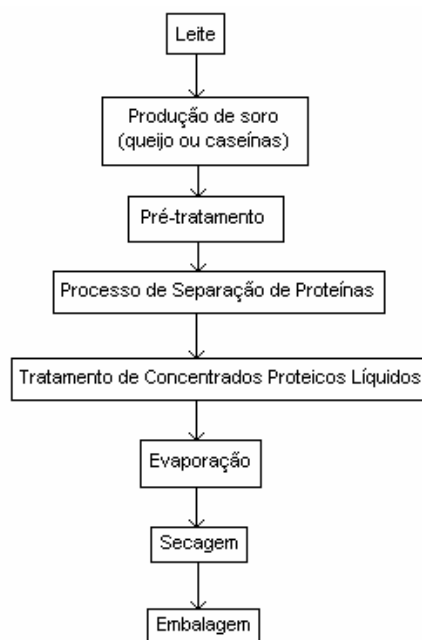


Figura 1.4 Diagrama de blocos geral de produção de concentrados proteicos do soro

Existem vários factores a ter em conta no projecto de uma unidade de processamento de soro (Mathews, 1984), tais como as características do soro (concentração real de proteína, qualidade microbiana e propriedades físicas), o tipo de produtos finais requeridos, a capacidade da unidade, os balanços mássicos e energéticos, os diagramas de fluxo, as condições de armazenamento de soro líquido e finalmente os aspectos regulamentares.

Os baixos rendimentos de produção de concentrados proteicos e os elevados custos da instalação de processamento, têm um impacto importante no preço de venda do produto e na viabilidade da instalação. Assim, é importante estimar os custos de capital e de operação durante o projecto.

Por outro lado, é importante que o processo de recuperação ou de fraccionamento das proteínas do soro seja simples quer em princípios, quer na sua execução técnica, de forma a originar produtos de qualidade que possam ser adquiridos pela indústria alimentar ou por outros potenciais consumidores.

Quanto maior o grau de sofisticação do processo, maior será o valor comercial do produto final e portanto há que contrabalançar estes 2 aspectos (Pearce, 1992).

Os métodos cromatográficos de troca iónica devem ser considerados quando se pretende valorizar o soro de queijo, pois apesar de exigirem elevados custos de investimento e de operação, permitem uma elevada automação (redução dos custos de mão de obra) e recuperação do investimento com o custo dos isolados de proteína (IP) face aos concentrados de proteína (CP) (Etzet, 1998).

Vários processos têm sido investigados laboratorialmente para obter isolados proteicos de soro como por exemplo precipitação com CM celulose, sais férricos, álcool, tanino, ácido poliacrílico, SDS, bentonite e xitosano; co-precipitação com proteínas vegetais; permuta iónica; diálise; ultracentrifugação; extracção com glicerol; utilização de óxidos de cálcio; enzimas e técnicas cromatográficas. Contudo, nenhum destes métodos é economicamente viável para aplicação à escala industrial (Mathews, 1984).

Com o contínuo desenvolvimento de tecnologias e crescente responsabilidade ambiental, por parte das indústrias, a imagem do soro está a mudar rapidamente de efluente para uma fonte valiosa de nutrientes.

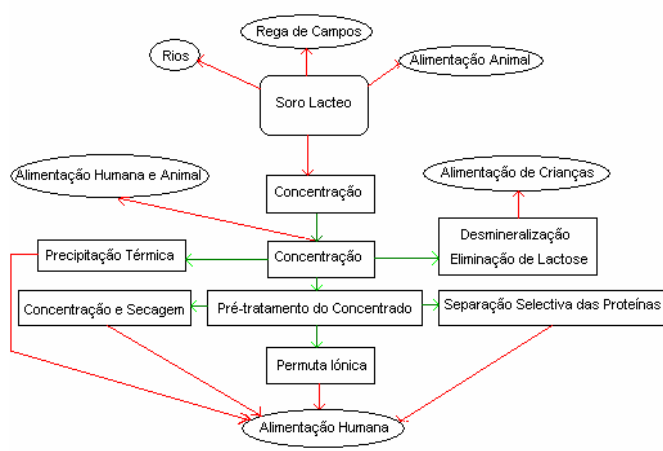


Figura 1.5 Métodos de aproveitamento de soro e respectivas aplicações (adaptado de Riera et al, 1996 e Mathews, 1984).

Soro Líquido

A utilização completa do soro, mesmo recorrendo a novas tecnologias, ainda não é possível (Cheryan, 1986).

O principal problema reside no facto de grande parte das unidades fabris que produzem derivados do leite, estarem localizadas junto a centros populacionais e a sua produção não é suficientemente grande para garantir a rentabilidade de uma unidade de processamento de soro (Clarck, 1992).

Uma solução possível é a produção de bens de valor acrescentado para os consumidores locais, como bebidas e queijos de soro (requeijão).

Em relação às bebidas do soro, apenas alguns produtos atingiram interesse comercial (Jelen, 1992), como é o caso de bebidas de frutos (sumos naturais), bebidas alcoólicas (vinho, cerveja) e bebidas lácteas (iogurtes líquidos) (Clarck, 1992 e Jelen, 1992).

Outras alternativas consistem em utilizar o soro para adubar os campos (Jelen, 1992) ou como fonte de alimentação para animais, especialmente porcos (Moulin e Galzy, 1993).

Por vezes a única solução economicamente viável para pequenos produtores é a rejeição do soro como efluente a tratar em estações de tratamento de águas residuais (E.T.A.R.) municipais.

Soro em Pó

De forma a reduzir os custos de transporte e armazenamento de soro e melhorar a qualidade do produto, foram desenvolvidos vários processos de concentração do soro.

O produto de soro mais comercializado é o soro em pó, com a seguinte composição: 10% cinzas, 1% gordura, 76% lactose e 13% proteínas (Huffman, 1996).

Existem várias metodologias para obter soro granulado (Moulin e Galzy, 1983; Mulvihill, 1994), dentro das quais a osmose inversa e a evaporação de efeito múltiplo. O soro em pó encontra aplicações na alimentação humana e na formulação de rações para animais.

Em 1984, a FDA atribuiu o estatuto de GRAS aos produtos do soro e aos métodos tecnológicos que estão na base da sua produção (Jelen, 1992). Estes produtos

incluem concentrados proteicos (CP), soro desmineralizado com e sem gordura, produtos com lactose hidrolisada, soro sem lactose e muitos outros.

Tabela 1.4 Caracterização dos principais produtos do soro (com estatuto GRAS) e do soro (adaptado de Clark, 1992).

Produto	Proteína%	Gordura%	Cinza%	Lactose%	Humidade%
Soro	10-15	0,2-2,0	7-14	61-75	1-8
Soro em pó	10-15	0,2-2,0	7-14	61-75	1-8
Soro sem lactose	16-24	0,2-4,0	11-27	Máximo 60	1-6
Soro sem minerais	10-24	0,2-4,0	Máximo 7	Máximo 85	1-6
Concentrado Proteico	Mínimo 25	0,2-10,0	2-15	Máximo 60	1-6
Lactose	-	-	0,3	Mínimo 99	1-6

Produtos Proteicos do Soro

Os componentes mais valiosos do soro são as proteínas, mas como a sua concentração neste líquido é muito reduzida (93% de água e 0,6% de proteína), são necessárias etapas de concentração, para que as suas propriedades funcionais sejam realçadas (Huffman, 1996).

O valor comercial de um concentrado proteico é 3-10 vezes maior (Mangino, 1992) que o do soro em pó, devido à maior especificidade do produto a nível funcional e ao excelente valor nutritivo do mesmo.

As propriedades funcionais da fracção proteica do soro, dependem das propriedades físico-químicas de cada uma das proteínas, das interacções com outros componentes e do método de preparação do concentrado proteico.

Os concentrados proteicos podem ser classificados com base na sua composição. Geralmente são agrupados de acordo com o seu conteúdo em proteína (numa base seca) (Tabela 1.5) (Huffman, 1996; Mangino, 1992 e Mathews, 1984).

Tabela 1.5 Composição típica de concentrados proteicos (CP) de soro (adaptado de Huffman, 1996).

Componente (%)	CP35 ⁽¹⁾	CP50	CP80	α -Lactalbumina ⁽²⁾	Isolado Proteico ⁽³⁾
Proteína	34 - 35	53	80	85 - 90	> 90
Lactose	53	35	7	-	1
Gordura	4	5	4 - 7	-	1
Cinzas	8	7	4 - 7	-	3

- (1) Composição semelhante à do leite em pó sem gordura
- (2) Tipo especial de concentrado proteico que foi termicamente desnaturado, pelo que tem propriedades diferentes
- (3) Corresponde virtualmente a toda a proteína do soro.

Os concentrados proteicos de soro (CP) têm uma vasta aplicação na indústria alimentar, pela funcionalidade que podem conferir aos alimentos (Huffman, 1996) (Tabela 1.6). Contudo, nem os concentrados proteicos, nem os isolados podem conferir todas as propriedades funcionais a um único ingrediente, pelo que é necessário fazer coincidir as necessidades da aplicação com a funcionalidade para a qual o concentrado ou isolado proteico foi produzido (Huffman, 1996).

As características nutricionais, terapêuticas e funcionais únicas nestas proteínas isoladas não se manifestam nestes concentrados proteicos devido a interações entre componentes e degradação durante o processamento. Tem portanto vindo a aumentar o interesse comercial na produção de proteínas de soro isoladas com propriedades funcionais e biológicas bem caracterizadas (Zydney, 1998).

Descrevem-se a seguir algumas das propriedades funcionais mais importantes dos concentrados proteicos do soro:

- **Solubilidade** – as proteínas do soro têm uma elevada solubilidade numa grande gama de valores de pH, desde que não tenham sido termicamente desnaturadas (Huffman, 1996). A solubilidade das proteínas do soro quando incorporadas em produtos que vão ser termicamente processados pode ser melhorada pela adição de açúcar, que promove a estabilidade térmica das proteínas (Huffman, 1996). A elevada solubilidade destas proteínas a valores de pH ácido, é muito importante na sua aplicação em bebidas, pois permitem um acréscimo de viscosidade e turbidez dessas bebidas, ou podem funcionar apenas como suplementos nutritivos (Mangino, 1992; Huffman, 1996).
- **Adsorção de água e viscosidade** – quando comparadas com outras proteínas, as proteínas do soro têm uma viscosidade baixa (< 5 cp), o que permite a sua incorporação na produção de produtos dietéticos (Huffman, 1996). Os concentrados proteicos de soro são geralmente muito solúveis e portanto não

têm grande capacidade de adsorver água na sua forma nativa. O tratamento térmico causa desnaturação aumentando a sua capacidade de retenção de água, bem como a sua viscosidade (Huffman, 1996). Assim, as aplicações de concentrados proteicos do soro como retentores de água e espessantes, restringem-se aos alimentos que recebam tratamentos térmicos, como por exemplo pastas de carne, sopas, bolos, entre outros (Mangino, 1992).

- **Gelificação** – sob condições apropriadas de aquecimento, os concentrados proteicos de soro formam géis de uma forma irreversível, aumentando a capacidade de reter água e/ou outras moléculas. A natureza das características do gel podem variar muito consoante a aplicação a que se destinam. A temperatura necessária para iniciar a gelificação e a natureza do gel dependem da concentração de proteína, pH, outros ingredientes alimentares em solução e das condições de processamento (Huffman, 1996). Podem ser aplicados na indústria alimentar para aumentar a capacidade de retenção de água e alterar a textura dos alimentos, como a elasticidade, a coesividade e a dureza.

- **Emulsificação** – as proteínas do soro podem actuar como emulsionantes, pois têm regiões hidrofóbicas e hidrofílicas (Huffman, 1996 e Mangino, 1992). Esta propriedade, bem como o facto de se manterem solúveis a valores de pH ácido, permite a sua aplicação em molhos para saladas, café e formulações para crianças.

- **Formação de espumas** – a capacidade espumante das soluções de proteínas do soro aumenta com o tratamento térmico, uma vez que as proteínas do soro são melhores espumantes quando desnaturadas. A estabilidade da espuma depende do tipo de proteína, nível de desnaturação da proteína, conteúdo em gordura, concentração de proteína e carboidratos, concentração de cálcio e outros iões, pH, bem como do método e equipamento de processamento do soro (Huffman, 1996). Esta propriedade é desejável em alguns produtos como os merengues e os gelados (Mangino, 1992, Huffman, 1996), e indesejável em produtos como fiambre e sumos de fruta fortificados (Huffman, 1996).

Tabela 1.6 Propriedades funcionais que os concentrados proteicos conferem aos alimentos (adaptado de deWit, 1989; Mangino, 1992).

Propriedade Funcional	Modo de Acção	Sector Alimentar	Composição do Concentrado Proteico (CP)
Solubilidade, estabilidade coloidal	Solvatação de proteínas	Bebidas	Sem gordura Sem sais
Adsorção de água e de gordura	Ligação por pontes de H à água, captação de gordura	Produtos de carne	CP a 85%
Viscosidade	Espessante; ligação de moléculas de H ₂ O	Sobremesas	CP a 35%
Gelificação	Formação de gel	Produtos lácteos	CP a 65%
Coesão-Adesão	As proteínas actuam como material adesivo	Produtos de charcutaria, produtos em pasta	CP a 85%
Elasticidade	Ligações hidrofóbicas	Panificação	CP a 65%
Emulsificação	Formação e estabilização de emulsões de gordura	Café, sopas, formulações para crianças	CP + aditivos
Formação de espumas	Formam um filme estável para captar o gás	Confeitaria	Sem gordura Ultrafiltração

Os concentrados proteicos do soro também têm aplicação na saúde humana, uma vez que, como já foi mencionado têm um elevado valor nutritivo e portanto, podem complementar e fortificar alguns alimentos, aumentando o valor nutricional desse alimento (por exemplo, o enriquecimento de arroz de trigo em lisina) (Huffman, 1996).

Os concentrados proteicos de soro ajudam também no desenvolvimento ou formação de massa muscular do corpo humano, porque são uma das fontes naturais mais ricas em isoleucina, leucina e valina.

Devido ao seu elevado valor biológico, são necessárias apenas 14,5 gramas de proteínas do soro por dia para satisfazer as necessidades diárias proteicas (Shastri, 1998), em comparação com 17,4 gramas de proteína do ovo por dia.

Assim, são muito úteis para incorporar em bebidas para desportistas, alimentos para crianças e produtos dietéticos (Huffman, 1996).

Além destas aplicações, os concentrados de proteínas de soro são também uma fonte natural de imunoglobulinas e de albumina do soro bovino (BSA) e, como tal oferecem protecção contra infecções, pois estimulam a produção de linfócitos.

Fracções Proteicas Individuais

Devido às propriedades funcionais, fisiológicas e biológicas específicas de cada uma das proteínas do soro, tem havido um crescente interesse no fracionamento das proteínas, pois muitas vezes estas características não se fazem notar nos concentrados proteicos de soro devido a interacções de outros componentes (Bramaud et al, 1997).

A betalactoglobulina (β Lg) tem maior capacidade de gelificação que a alfa lactalbumina (α La). Por outro lado, o leite humano não contém β Lg (é a proteína do leite bovino que causa mais reacções alérgicas), e por esse motivo a α La (tem 4 resíduos de triptofano/molécula) é mais adequada para a formulação de alimentos para crianças, do que os concentrados proteicos do soro (Zydney, 1998).

Além destas duas proteínas que são maioritárias, existem outros componentes proteicos que também têm interesse farmacêutico e biológico (Tabela 1.7).

Uma alternativa ao processamento das proteínas de soro é a hidrólise enzimática. Por este processo, verifica-se um aumento de certas propriedades funcionais das proteínas. A conversão de proteínas em misturas de oligopéptidos permite a sua utilização como substituto da glucose como agente osmótico em soluções de diálise peritonais. A hidrólise mais completa resulta numa mistura de aminoácidos com péptidos de cadeia curta, que pode ser utilizada em formulações de soros para a alimentação hospitalar intravenosa.

Tabela 1.7 Interesse comercial de algumas proteínas do soro (adaptado de Zydney, 1998)

Proteínas	Função (interesse comercial)
Lactoperoxidase, Lactotransferina	Cosméticos terapêuticos e formulações para crianças, devido à sua actividade antibacteriana e antioxidante
Imunoglobulinas	Propriedades imunológicas em alimentos para crianças e para animais recém-nascidos
Glicomacropéptidos	Melhora a digestão de lípidos, protege contra a <i>influenza</i> , previne a cárie (usado em pastas dentífricas) e inibe o ataque de <i>E.coli</i> nos intestinos

Lactose

A indústria de queijo produz grandes quantidades de lactose na forma de soro de queijo e permeado de soro (Yang e Silva, 1995)

A lactose (dissacárido) é o principal açúcar presente no leite de mamíferos com concentração de 4,8% e um peso molecular compreendido entre 342,0 – 360,1 Da (Harper, 1992; Yang e Silva, 1995). É sintetizada a partir de glucose e galactose e em meios ácidos sofre hidrólise. A lactose apresenta uma baixa solubilidade quando comparada com outros açúcares (Harper, 1992), o que condiciona a sua aplicação em alimentos (gelados e leite condensado), pois se estiver presente em concentrações elevadas tem tendência a cristalizar. Outra limitação da aplicação da lactose em produtos alimentares tem a ver com a intolerância à lactose apresentada por alguns indivíduos (Yang e Silva, 1995).

A lactose é o principal carbohidrato do soro e pode ser obtido por separação da fracção proteica, por concentração do soro ou a partir do permeado, que resulta da ultrafiltração do soro.

Qualquer processo que tenha por objectivo recuperar as proteínas do soro, deverá ter em conta a fracção lactosada do soro, pois é esta que causa graves problemas ecológicos em termos de COD e BOD.

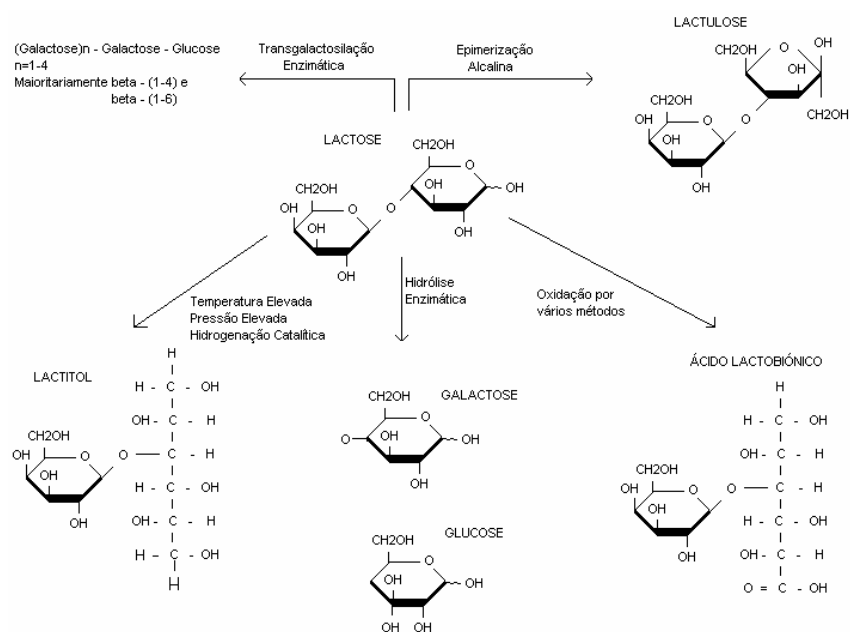


Figura 1.6 Estrutura química da lactose e derivados de lactose (adaptado de Yang e Silva, 1995).

Existem três métodos gerais para produzir lactose a partir de permeado de soro. O método mais comum, o tradicional, consiste na cristalização da lactose a partir de uma solução super saturada, contudo este método só é economicamente viável na aplicação em grande escala. Outro método, consiste na precipitação de lactose com metais alcalinos que formam complexos com açúcares. Finalmente, a utilização de álcoois ou outros solventes que reduzem a solubilidade da lactose provocando a sua precipitação, contudo este método não é usado comercialmente (Yang e Silva, 1995).

Nem toda a lactose presente no permeado de soro pode ser economicamente recuperada por cristalização, cerca de 20-40% do conteúdo original de lactose permanece no permeado juntamente com os sais, não tendo aplicação (Yang e Silva, 1995).

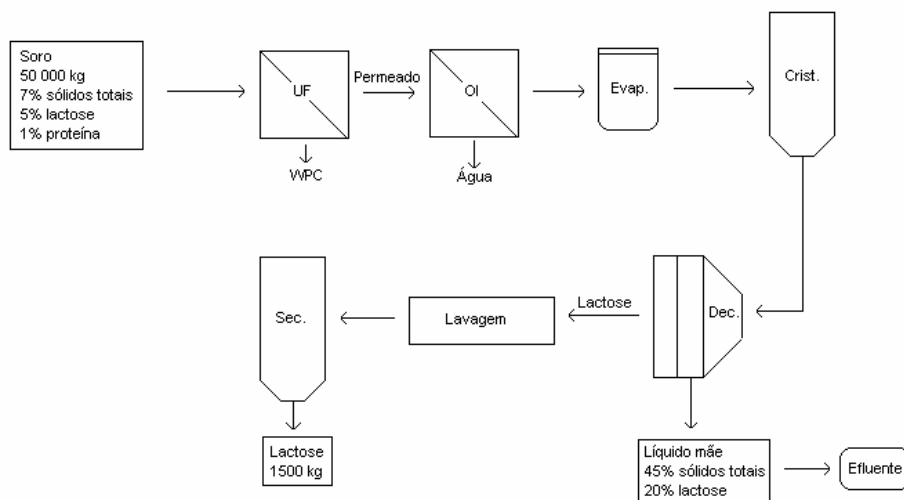


Figura 1.7 Produção de lactose a partir do permeado de soro (adaptado de Yang e Silva, 1995).

A lactose existe em várias formas cristalinas que possuem diferentes propriedades físico-químicas importantes para aplicação na indústria alimentar (Tabela 1.8).

Tabela 1.8 Propriedades físico-químicas da lactose importantes para a sua aplicação na indústria alimentar (adaptado de Yang e Silva, 1995).

Desejável	Indesejável
<ul style="list-style-type: none"> - sabor levemente adocicado - acentua aromas naturais sem os tornar excessivamente doces - participa em reacções de Maillard conferindo cor acastanhada a produtos de pastelaria - melhora a adsorção de cálcio no intestino humano - aumenta a produção benéfica de ácido láctico no intestino 	<ul style="list-style-type: none"> - 60% menos doce que a sacarose - baixa solubilidade - em concentrações elevadas deixa um sabor desagradável na boca - difícil digestão - intolerância à lactose de alguns indivíduos

As principais aplicações de lactose incluem a incorporação como aditivo alimentar (em formulações para crianças), utilização na indústria farmacêutica e como matéria prima para produção de derivados de lactose (Tabela 1.9). Os derivados de lactose têm também aplicações interessantes dadas as suas propriedades físico-químicas e funcionais (Tabela 1.10 e Tabela 1.11).

Tabela 1.9 Aplicações da lactose (adaptado de Yang e Silva, 1995; Harper, 1992)

Aplicação	Exemplos
Indústria Alimentar	Formulações para crianças, panificação, pastelaria, bebidas, lacticínios, molhos e sobremesas geladas
Indústria Fermentação	Substrato de fermentação para produzir uma série de produtos petroquímicos e alimentares, dentro dos quais lactato, propionato, acetato e goma de xantano.
Produção de derivados de lactose	Lactulose, lactitol, ácido lactobiónico e oligossacáridos
Indústria Farmacêutica	Excipiente na formulação de medicamentos

Tabela 1.10 Funções da lactose quando aplicada na indústria alimentar (adaptado de Yang e Silva, 1995)

Aplicação	Função da Lactose ou motivo de aplicação
Panificação	Transportador de sabor e cor, aumenta a coloração acastanhada e favorece a emulsificação
Leite condensado doce	Vantagem económica
Fruta cristalizada	Melhora a textura
Lacticínios	Vantagem económica
Sopas e molhos	Acentua o sabor, tempo de vida mais longo, melhora a dispersão e tem vantagens económicas
Bebidas de fruta	Fins terapêuticos
Bebidas instantâneas	Acentua aroma e melhora a dispersão
Molhos para saladas	Menos doce, tempo de vida mais longo e tem vantagens económicas
Confeitaria	Menos doce, acentua o aroma, promove fixação da cor e tempo de vida mais longo
Cacau	Menos doce e acentua aroma
Sobremesas geladas	Vantagem económica
Formulações crianças	É semelhante ao leite humano
Carne e salsichas	Menos doce, maior tempo de vida e tem vantagens económicas
Condimentos	Acentua aroma e melhora a dispersão

Tabela 1.11 Os derivados da lactose e as suas aplicações (adaptado de Yang e Silva, 1995)

Derivados de Lactose	Aplicação
Lactulose	Alimentação saudável, nutrição infantil e uso farmacêutico
Lactitol	Adoçante para diabéticos, adoçante não carcinogénico , e matéria prima
Ésteres de ácidos gordos de lactitol	Emulsificantes
Ureia lactosil	Alimentação animal
Ácido lactobiónico	Determinação de lactose e promove firmeza a alimentos
Galactooligossacáridos	Alimentos probióticos e formulações para crianças

1.3.3 Proteínas do soro

1.3.3.1 Estrutura e propriedades físico-químicas das proteínas do soro

As proteínas do soro têm propriedades físicas e funcionais no seu estado nativo e após tratamento físico, químico ou enzimático (adsorção de água, solubilidade, emulsificação entre outras), devido às várias estruturas conformacionais, que possuem e/ou adquirem (Cheftel e Lorient, 1982).

Tabela 1.12 Características estruturais das principais proteínas do soro lácteo (adaptado de Cheftel e Lorient, 1982).

Proteína	Estrutura Primária							Estrutura Secundária
	Aminoácidos					Parte Prostética		
	TOTAL	Ácidos ^a	Básicos ^b	Cys ^c	Pro	%P	%Glucidos	
βLG	162	27	20	5	8	0	0	10% héliceα 30% est ^a β
αLA	123	17	15	8	2	0	0	26% héliceα 14% est ^a β
BSA	542	136	65	35	-	0	0	-
Imunoglobulinas (IgA, IgG, IgM)	-	-	-	64 ^d	-	0	2-12	Mono, dí e pentímero
Peptonas	-	-	-	0	-	(0,5-2,4)	2-16	-
Azoto não proteico	-	-	3 ^d	0	-		-	-

^a Aminoácidos ácidos: Glu e Asp

^b Aminoácidos básicos: Lys, His e Arg

^c ½ cisteína

^d deWit, 1989

A fracção proteica do soro contém um grupo de proteínas globulares: β-lactoglobulina (β-Lg), α-lactalbumina (α-La), albumina do soro bovino (BSA), imunoglobulinas (IgA, IgG e IgM) entre outras, que representam 50, 20, 10, 10 e 10%,

repectivamente, da proteína total do soro (Mulvihill, 1994). Estas proteínas são sintetizadas ou nas glândulas mamárias, como por exemplo, a β -Lg e a α -La, ou circulam no sangue, como a lisozima, a lactotransferina e a lactoperoxidase. Existem ainda alguns polipéptidos (Tabela 1.13), como componentes de proteases peptonas (PP3, PP5, PP8f e PP8s), que constituem uma mistura heterogénea estável ao calor, são polipéptidos solúveis em meio ácido (pH 4,6), precipitados com ácido tricloroacético (TCA) 12% e em que a maioria (PP5, PP8f e PP8s) resulta da proteólise das caseínas por enzimas do leite. Finalmente, é possível também encontrar no soro glicomacropéptidos (apenas no soro doce), proteína biologicamente activa que resulta da hidrólise da k-caseína pela enzima quimosina (ou renina) presente no soro (Mulvihill, 1994; Marshall, 1991)

A fracção de azoto não proteico, inclui, além de alguns componentes de baixo peso molecular como ureia e aminoácidos, produtos de degradação enzimática das caseínas.

As consequências das várias operações de separação a que o soro é sujeito, na estrutura e nas propriedades das proteínas, dependem do número de grupos reactivos por molécula, como por exemplo, resíduos de $\frac{1}{2}$ Cys e aminoácidos básicos e ácidos (deWit, 1989).

Tabela 1.13 Propriedades e concentração das proteínas do soro (adaptado de Etzel, 1995 e Zydney, 1998).

Proteína	Peso Molecular (kDa)	Ponto Isoelétrico	Concentração (g/l)
β -Lg	18,362	5,2	2,7
α -La	14,147	4,2 – 4,8	1,2
BSA	69,0	4,7-4,9	0,4
Imunoglobulinas	15,0 – 1000,0	5,5-8,3	0,65
Peptonas	4,1 – 40,8	3,3 –3,7	1,4
Lactotransferina	78,0	9,0	0,1
Lactoperoxidase	89,0	9,5	0,02
Glicomacropéptido	7,0		

β -Lactoglobulina

A β -lactoglobulina possui na sua estrutura um grupo tiol livre, que lhe permite a associação a outras proteínas hidrofóbicas, e duas pontes de enxofre internas. A conformação da β -lactoglobulina depende do pH. Para valores de pH compreendidos entre 5,20 e 6,70 (ponto isoeléctrico) e à temperatura ambiente, a β -lactoglobulina existe como um dímero estável, com um peso molecular de 36,7 kDa. Entre pH 3,50 e 5,20, os dímeros associam-se para formar um óctomero de 147 kDa. Para valores de pH inferiores a 3,50 as estruturas quaternárias dissociam-se reversivelmente em monómeros devido a forças electrostáticas repulsivas muito fortes (Grosch, 1987; Dumay e Cheftel, 1989).

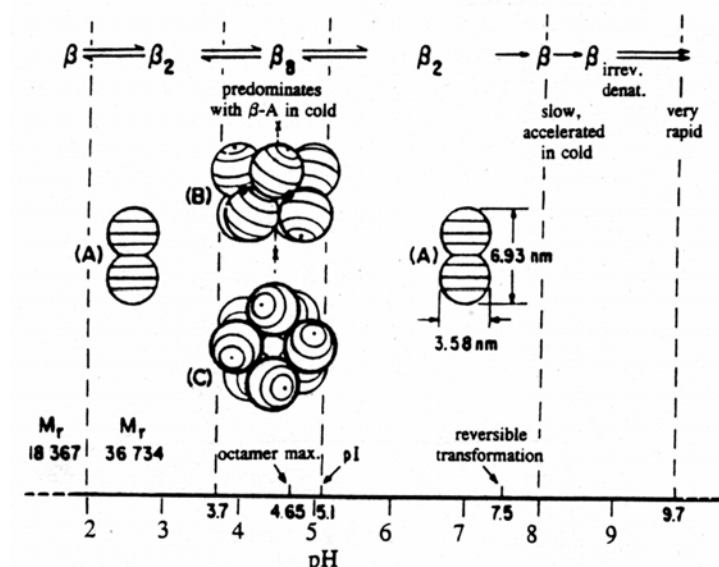


Figura 1.7 Variação da conformação da β -lactoglobulina em função do pH (adaptado de Visser e Jeurnink, 1997).

Apesar deste efeito de carga, a estrutura nativa da proteína não é alterada, mesmo a temperaturas superiores a 80°C (deWit, 1989), até pH 8,60. Para valores de pH superiores a 8,60, ocorre uma desnaturação irreversível da proteína (Grosch, 1987; Dumay e Cheftel, 1989), porque ocorrem alterações importantes nas propriedades físico-químicas da proteína, devido a uma alteração conformacional a pH próximo de 7,50. Esta alteração é acompanhada por uma expansão molecular, por uma exposição de um dos grupos carboximetil/monómero e por um aumento da reactividade do único

grupo tiol presente em cada monómero. Este aumento de reactividade induz reacções de troca tiol-dissulfureto, as quais tem consequências importantes nas propriedades funcionais da proteína (deWit, 1989).

A β -lactoglobulina tem diferentes variantes, sendo as principais a A e a B. A β -lactoglobulina A difere da variante B, em dois aminoácidos: aspartato-64 e valina-118. Estes aminoácidos são substituídos na β -lactoglobulina B, pela glicina e pela alanina. Ambas têm resíduos de cisteínas. A β -lactoglobulina (Figura 1.8) pode ligar-se a lípidos ácidos e não polares e fá-lo preferencialmente em meios alcalinos (deWit, 1989).

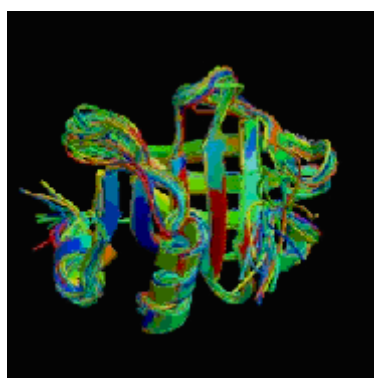


Figura 1.8 Estrutura tridimensional da β -lactoglobulina (<http://www.rcsb.org/pdb>).

α -lactalbumina

A α -lactalbumina (Figura 1.9) contém 8 grupos de cisteína, todos envolvidos em pontes S-S internas e 4 resíduos de triptofano. Tem uma estrutura secundária ordenada e uma estrutura terciária esférica e compacta (Grosch, 1987).

A α -lactalbumina é uma metalo-proteína com um átomo de cálcio que lhe possibilita a ligação a outras proteínas, tendo por isso tendência a polimerizar. Se, por exemplo, existir um grupo -SH livre noutra molécula (como por exemplo na β -lactoglobulina), este reage com uma das pontes S-S presente na α -lactalbumina, originando assim uma associação de proteínas (Cheftel e Lorient, 1982; Mulvihill, 1994).

A valores de pH inferiores a 5,0 ocorre uma mudança na estrutura da proteína, uma vez que a acidificação do meio conduz à libertação do ião Ca^{2+} (Andrews e Valey, 1994; Mulvihill, 1994), a uma desnaturação reversível e a um processo de agregação (deWit, 1989), sendo este mais acentuado a temperaturas próximas dos 55,0°C.

A valores de pH neutro ou alcalino, e na ausência de grupos tiois em solução, os iões OH^- atacam as pontes S-S, levando à formação de dihidroalanina, de H_2S e de ácido cisteico, responsáveis por acelerar o processo de desnaturação da proteína (Cheftel e Lorient, 1982).

A α -lactalbumina interacciona com lípidos não polares e ácidos, tal como a β -lactoglobulina, mas preferencialmente em meios fortemente ácidos (de Wit, 1989).

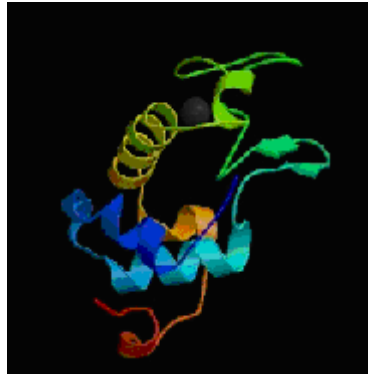


Figura 1.9 Estrutura tridimensional da α -lactalbumina (<http://www.rcsb.org/pdb>).

Albumina de soro bovino (BSA)

A BSA (Figura 1.10) é o polipéptido com a maior cadeia simples de todas as proteínas do soro. Contém 35 resíduos $\frac{1}{2}$ Cys, 17 dos quais existem sob a forma de 17 pontes S-S, com um grupo tiol livre por molécula.

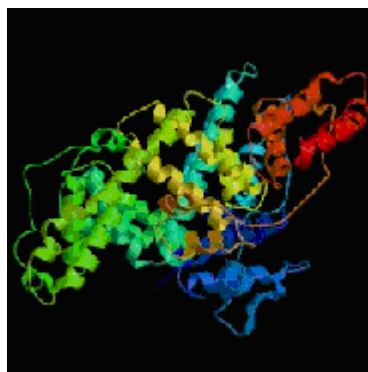
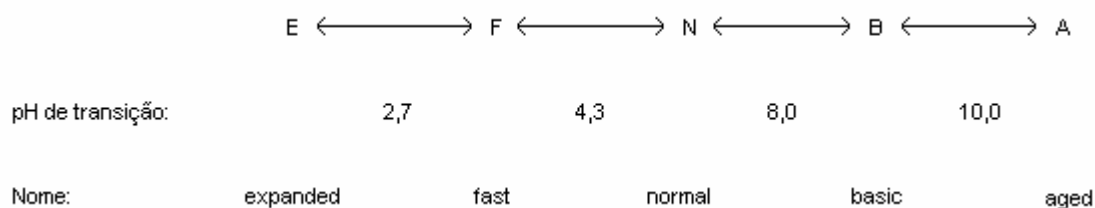


Figura 1.10 Estrutura tridimensional da albumina de soro bovino (BSA) (<http://www.rcsb.org/pdb>).

Esta proteína apresenta várias conformações consoante o pH do meio:



A forma F é caracterizada por proporcionar um aumento na viscosidade e uma muito menor solubilidade. A valores de pH inferiores a 4,0, a proteína adquire a forma E e desnatura, devido à repulsão mútua dos resíduos de aminoácidos internos carregados positivamente (deWit, 1989). Se esta proteína ficar armazenada a pH 9,0 e a 3°C, durante 3 a 4 dias, isomeriza originando a estrutura A.

Imunoglobulinas

No leite bovino existem três classes de imunoglobulinas: IgA, IgM e IgG (deWit, 1989), as quais são compostas por 4 cadeias polipéptidicas, unidas por pontes S-S e apresentam uma temperatura de desnaturação superior à da α -lactalbumina e da β -lactoglobulina.

Proteose Peptonas

O leite bovino contém em média 35 g/l de proteína. A maioria destas (80%) são caseínas que quando associadas a fosfato de cálcio coloidal formam micélios em suspensão no leite. O soro obtido após precipitação das caseínas contém proteínas solúveis incluindo betalactoglobulina, alfa lactalbumina, albumina do soro bovino, imunoglobulinas, lactoferrina, lactoperoxidase, enzimas e proteose peptonas (Girardet, 1996).

O aquecimento de leite desnatado (95°C, 30 minutos) seguido de acidificação (pH 4,6) provoca a desnaturação das proteínas do soro e a sua co-precipitação com as caseínas. Apesar destas condições drásticas, uma fracção heterogénea composta por fosfoglicoproteínas permanece solúvel, esta fracção foi denominada de fracção PP (proteose peptonas) (Nejjar et al, 1990; Girardet, 1996) A fracção PP foi então

caracterizada como sendo uma mistura de glicoproteínas estáveis ao calor e ácido e corresponde a 10% da proteína total do soro (Ng et al, 1990; Paquet, 1989).

Os seus principais componentes foram designados como componentes 3, 5, 8 fast e 8 slow (PP3, PP5 (ou β -CN-5P), PP8f (ou β -CN-4P) e PP8s (ou β -CN-1P)) de acordo com as suas mobilidades electroforeticas ascendentes (Nejjar et al, 1990; Ng et al, 1990; Paquet et al, 1988). O componente PP5 tem 2 bandas muito próximas e o componente PP8 tem 2 bandas, denominadas de PP8 fast e PP8 slow (Kolar e Brunner, 1970; Sorensen e Petersen, 1993) consoante a sua mobilidade. O componente PP3 é o menos móvel e migra como uma banda difusa (Girardet, 1996). Os componentes PP5 e PP8 existem quer no soro, quer em associação com a caseína e resultam da hidrólise das caseínas pelas proteases nativas do leite (Ng et al, 1990; Paquet, 1989). Por oxidação do gel com ácido e coloração de glicoproteínas com reagente de Schiff, demonstrou-se que o componente PP3 ao contrário das restantes, é uma glicoproteína e não resulta da hidrólise enzimática das caseínas (Girardet, 1996).

A composição e concentração das PP variam de acordo com o estado de conservação do leite podendo constituir um bom indicador da qualidade do leite (Paquet, 1989).

Preparação da Fracção PP

Existem uma série de trabalhos publicados sobre métodos de isolamento da fracção proteose peptona como é possível visualizar na Figura 1.11:

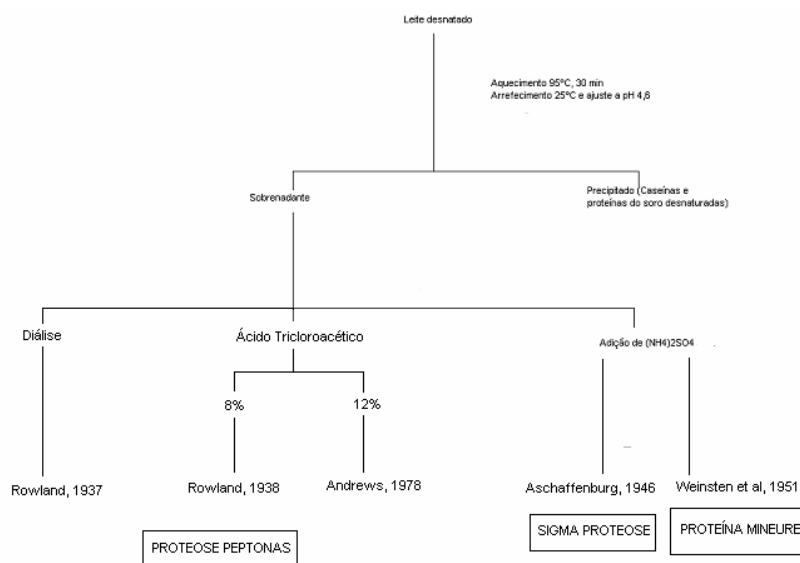


Figura 1.11 – Vários métodos de preparação da fracção PP (adaptado de Paquet, 1989).

Rowland (1937), utilizou um tratamento térmico (90°C durante 30 minutos ou 95°C durante 15 minutos) seguido de acidificação a pH 4,7, provocando deste modo a desnaturação de 76% das proteínas do soro. As proteínas residuais (24%) consistem na fracção PP e não foi considerado o azoto não proteico (Paquet, 1989).

Rowland (1938), propôs dois protocolos para o fraccionamento das proteínas do leite. O primeiro consistia na separação da caseína por acidificação do leite em presença de tampão acetato de sódio. As proteínas do soro são fraccionadas em duas partes, uma contendo as globulinas e albuminas e, a outra contendo as PP, em presença de sulfato de magnésio. O segundo protocolo consistia na obtenção de fracção PP por acidificação do sobrenadante resultante da termocoagulação do leite, com ácido tricloroacético (TCA) a 8% (Paquet, 1989).

Aschaffenburg (1946) isolou uma fracção proteica com propriedades tensioactivas que corresponde a 3% das proteínas totais do leite, utilizando sulfato de amónio. Esta fracção foi denominada de SIGMA PROTEOSE (Paquet, 1989).

Isolamento das Diferentes Fracções Termoestáveis

O componente PP3 é uma fracção proteica caracterizada por um baixo conteúdo em aminoácidos aromáticos e metionina, ausência de cisteína, elevado conteúdo em carboidratos (173g/kg) e conteúdo em fósforo de 5 g/kg (Ng et al, 1970; Paquet, 1989). É uma fosfoglicoproteína que forma complexos de PM 163 000 Da que se dissociam em subunidades monoméricas de 22000 Da (Paquet, 1989; Girardet, 1996; Sorensen et al, 1997).

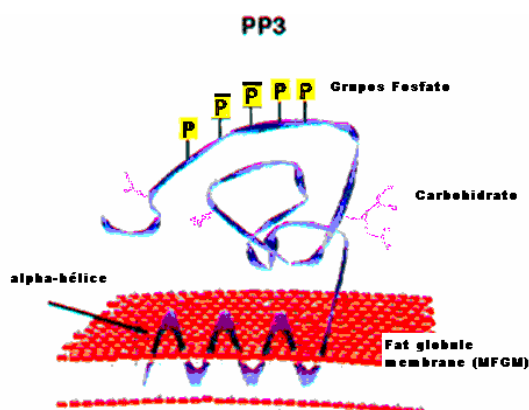


Figura 1.12 Estrutura terciária do componente PP3 (Rasmussen et al, 1998).

Uma preparação rica em PP3 foi inicialmente isolada a partir de leite desnatado aquecido (95°C, 30 minutos) (Figura 1.13) ou não (Figura 1.14). O componente PP3 foi caracterizado como sendo um complexo glicosilado associado a uma fosfoglicoproteína (Nejjar et al, 1990).

As primeiras tentativas de purificar este componente presente apenas no soro consistiram na preparação de concentrados ricos em proteína obtidos por precipitação salina de leite desnatado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Figura 1.13) (Girardet, 1996).

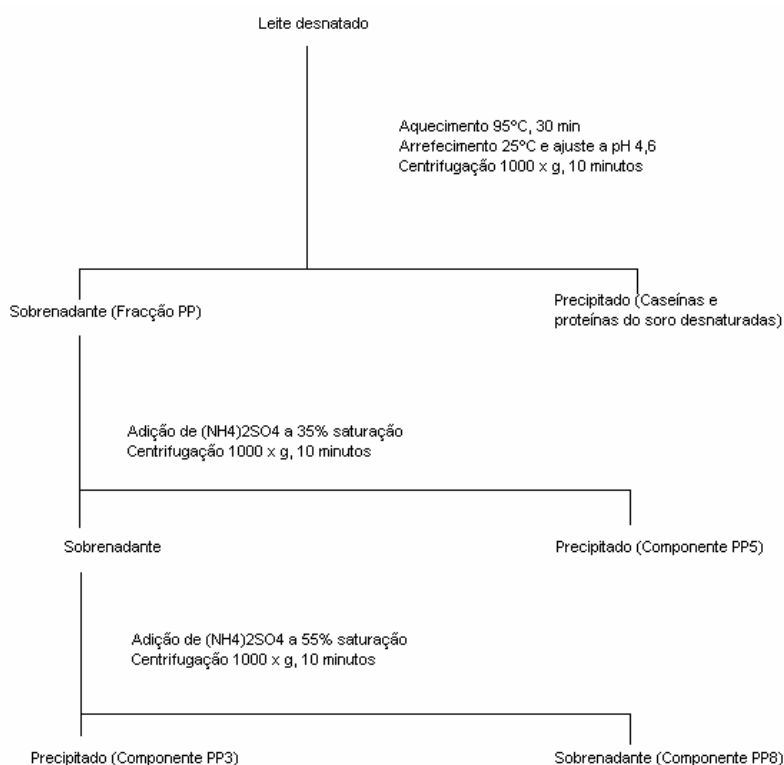


Figura 1.13 Esquema de preparação de componente PP3 a partir de leite desnatado aquecido (adaptado de Ng et al, 1990).

A purificação de PP3 de leite não aquecido obtido por precipitação salina com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Figura 1.14) seguido de adsorção cromatográfica em hidroxiapatite (Nejjar et al, 1990) revelou a presença de três moléculas: lactoferrina (PM 88kDa) e duas glicoproteínas (PM 30kDa e PM 18kDa) (Girardet, 1996).

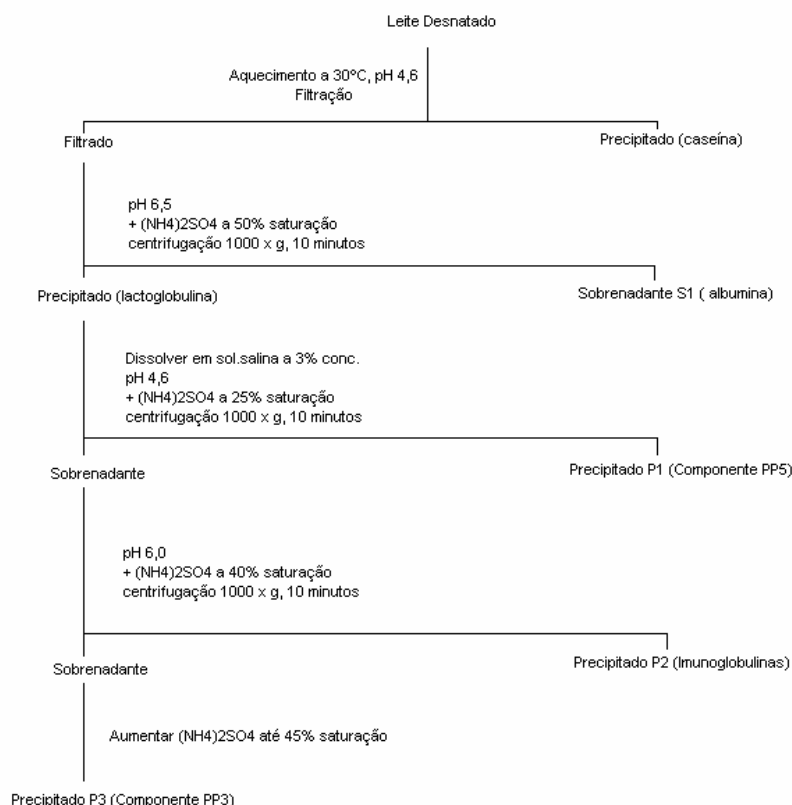


Figura 1.14 Esquema de preparação de componente PP3 a partir de leite desnatado não aquecido (adaptado de Ng et al, 1990).

Purificação do Componente PP3

O componente PP3 é heterogéneo, Kester e Brunner (1982) isolaram a fracção de glicoproteína que contém o componente PP3 usando cromatografia de afinidade com Con A. Revelou-se por PAGE a presença de 2 glicoproteínas maioritárias com massas moleculares de 17700 – 20900 e 24600 – 33400 respectivamente (Girardet, 1996).

Paquet et al (1985, 1988) isolaram PP3 por 3 passos cromatográficos: interacção hidrofóbica (Phenyl Sepharose), adsorção em hidroxiapatite e filtração em gel (Sephacryl S200). Devido à heterogeneidade da PP3, Paquet et al caracterizaram esta fracção como sendo a fracção hidrofóbica das proteose peptonas (HFPP) (Girardet, 1996)

Estes dois trabalhos demonstraram a identidade antigénica entre este componente e a membrana dos glóbulos de gordura (Nejjar et al, 1990).

Nejjar et al (1990) pretenderam avaliar a composição e o comportamento do componente PP3 quando extraído de leite desnatado não aquecido, promovendo um

tratamento que consistiu em tratamentos sucessivos com sulfato de amónia, hidroxiapatite e cromatografia de interacção hidrofóbica. Concluíram que o componente PP3 é composto por 3 moléculas principais: uma glicoproteína (PM 30000 Da), uma grande glicoproteína hidrofóbica (PM 18000 Da) e um peptido hidrofóbico (PM 7000). Os resultados deste trabalho demonstram que o comportamento altamente hidrofóbico do componente PP3 extraído do leite desnatado aquecido, não se deve a indução por parte dos tratamentos térmicos, mas é uma propriedade das proteínas nativas (Nejjar et al, 1990).

A grande parte dos constituintes da fracção PP têm pontos isoeléctricos muito próximos pelo que a cromatografia de permuta iónica não se mostrou muito eficaz para o seu fraccionamento (Andrews e Alichanidis, 1983; Pearce, 1980; Paquet, 1989)

Usando outro procedimento de purificação que inclui 4 cromatografias de permuta iónica (DEAE celulose) e passos de filtração em gel, Kanno (1989) mostrou que a PP3 inclui 7 formas semelhantes diferindo nas suas mobilidades relativas. O autor concluiu que o componente PP3 é composto por uma glicoproteína comum às 7 formas, que está associada com várias outras proteínas por ligações iónicas. Observou duas glicoproteínas maioritárias com massas moleculares 25000 e 17000 que estão associadas a outras glicoproteínas ou proteínas minoritárias com maior massa molecular (42000-67000) (Girardet, 1996).

Recentemente demonstrou-se a presença de proteínas minoritárias na fracção PP, incluindo vestígios de proteínas do soro, caseínas, osteopontina (Sorensen e Petersen, 1993, 1994), lactose- α la e lactose- β lg (Shida et al, 1994; Girardet, 1996).

Purificação das glicoproteínas MM 18000 e MM 28000

A estrutura molecular do componente PP3 foi determinada pelo desenho de uma cromatografia de electroforese de alta performance (HPEC) semipreparativa.

Esta permitiu isolar as várias entidades do componente PP3 de leite pré aquecido (cromatografia de afinidade Con A de HFPP) ou de leite não aquecido (cromatografia de afinidade Con A de material retido por ultrafiltração a MM 100000 de soro não aquecido). Todo o componente PP3 foi retido no concentrado de ultrafiltração. Sorensen

e Petersen (1993) isolaram as glicoproteínas MM 18000 e 28000 da fracção PP em três passos cromatográficos (Girardet, 1996).

Proteínas minoritárias

Durante a extracção da fracção PP do leite por coagulação térmica têm sido detectados vestígios de betalactoglobulina, alfalactalbumina, β -caseína e α s1-caseína (Andrews e Alichanidis, 1983).

Recentemente, duas glicoproteínas de peso molecular 16 e 20 kDa com forte afinidade para a enterotoxina da *E.coli* foram identificadas na fracção PP como formas glicosiladas da alfalactalbumina e betalactoglobulina (Girardet, 1996).

Durante a preparação da fracção PP por tratamento térmico a lactose reage com as proteínas e forma lactulose-lisina. A enterotoxina da *E.coli* reconhece os resíduos terminais galactose das glicoproteínas. Assim, a lactose- α la e a lactose- β lg podem prevenir algumas formas de diarreia, por ligação à toxina e portanto competindo com os receptores da enterotoxina localizados à superfície das células epiteliais do intestino (Girardet, 1996).

Quando se prepara o componente PP3 da fracção PP (Sorensen e Petersen, 1993, 1994), consegue-se isolar uma fosfoglicoproteína identificada como osteopontina por sequenciação parcial. Esta glicoproteína acídica (MM 60 kDa) é uma proteína altamente fosforilada que ocorre geralmente nos ossos e tem um papel importante na adesão celular devido à sua sequência de aminoácidos Arg-Gly-Asp, que é a sequência mediadora da adesão celular (Sorensen e Petersen, 1993; Girardet, 1996).

A interacção de fosfato de cálcio inorgânico com proteínas é essencial nos tecidos duros normais tipo ossos e dentes mas pode também ter muita importância na calcificação patogénica, como a arteriosclerose (Sorensen e Petersen, 1993 a.).

Proteínas que se ligam ao fosfato de cálcio afectam a sua solubilidade e podem ter um papel importante na biomineralização, isto é verdade para a osteopontina que está presente na fase mineralizada do osso (Sorensen e Petersen, 1993 a.).

Heterogeneidade Físico-Química do Componente PP3

a - Massa Molecular Aparente – apesar dos perfis electroforéticos das fracções contendo o componente PP3 diferirem de protocolo para protocolo, as glicoproteínas maioritárias com MM 28000 e 18000 estão sempre presentes.

b – Ponto Isoeléctrico Aparente – os pontos isoelectricos das duas glicoproteínas maioritárias encontram-se distribuídos entre 4,9 e 6,1 (Girardet et al, 1991).

c – Hidrofobicidade Superficial – o comportamento hidrofóbico do componente PP3 é complexo. Quando as proteose peptonas foram separadas por cromatografia hidrofóbica (Girardet et al, 1991), parte do componente PP3 pouco ligada à matriz foi eluído mais depressa que PP5. Usando SDS PAGE mostrou-se que esta parte corresponde a parte da banda MM 28000 (PP3a) que ficou apenas ligeiramente retida, enquanto que toda a fracção MM 18000 e 11000 foram finalmente recuperadas na HFPP.

A ordem de eluição que está relacionada com a ordem da hidrofobicidade superficial é a seguinte:

$$\beta\text{-CN-4P f (1-28)} < \text{PP3a (MM 28000)} < \beta\text{-CN - 5P f (1-105/7)} < \beta\text{-CN - 1P f (29-105/7)} < \text{HFPP (MM 28000, 18000 e 11000)}$$

Origem e Caracterização Molecular da PP3

Sorensen et al (1997) demonstraram que o componente PP3 está presente no soro bovino e na membrana dos glóbulos de gordura (MFGM) mas está ausente na fracção correspondente às caseínas.

O componente PP3 e a fracção glicoproteica da membrana dos glóbulos de gordura (MFGM), demonstraram actividade antigénica (Girardet, 1996).

Kester e Brunner (1982) concluíram que:

- PP3 pode resultar da quebra de alguns componentes maioritários da MFGM devido ao sistema proteolítico endógeno
- PP3 pode ser uma glicoproteína da membrana que está apenas ligeiramente ligada, pelo que pode facilmente desorver para a fase aquosa do leite, que ocorre quer em associação com a MFGM, quer como soluto no soro.

- PP3 pode ser uma proteína do soro que se adsorve a alguma extensão da MFGM (como a caseína micelar).

Estrutura Primária da Mistura Apoglicoproteína do Componente PP3

Kanno (1989 a, b) distinguiu 7 formas do componente PP3, todos eles partilhando grupos antigénicos que se ligam directamente aos anticorpos dirigidos às glicoproteínas da MFGM.

Kanno (1989 a) introduz o termo lactoforina para se referir ao complexo glicoproteína do soro que reage com um antisoro contra as glicoproteínas da MFGM. A lactoforina poderá portanto ser idêntica ao componente PP3.

Estudos recentes permitiram determinar as estruturas do cDNA precursor da lactoforina (Tsukasaki et al, 1994) e do componente PP3 (Johnsen et al, 1995); estes resultados indicam que a lactoforina e o componente PP3 correspondem à glicoproteína MM 28000. Esta fosfoglicoproteína contém 135 resíduos de aminoácidos e tem elevados teores de ácido aspártico, glutâmico, serina e treonina, não tem cisteína nem triptofano (Girardet, 1996).

Propriedades Funcionais e Papel Biológico do Componente PP3

Propriedades espumantes e emulsionantes – as propriedades físico-químicas do componente PP3 (estabilidade ao calor, propriedades de agregação, hidrofobicidade superficial) são a fonte de várias propriedades surfactantes da fracção PP (Paquet, 1989). Esta fracção é responsável por conferir espuma ao leite (Girardet, 1996; Innocente et al, 1998).

As propriedades emulsionantes da fracção PP foram investigadas numa emulsão óleo de soja-água. A fracção PP teve um efeito emulsionante e as emulsões obtidas eram mais estáveis (Girardet, 1996).

Inibição da actividade lipolítica – a fracção PP inibe a lipólise espontânea no leite bovino que esteve armazenado a 4°C durante vários dias (Anderson, 1981) e este papel foi atribuído à fracção hidrofóbica que contém o componente PP3 (Cartier et al, 1990).

A fracção PP5 por outro lado tende a estimular a lipólise. Num estudo do mecanismo de inibição que foi feito num sistema modelo (Girardet et al, 1993), o componente PP3 inibia completamente a lipase pancreática usada numa emulsão tributirina-água.

A inibição não se deve a uma interacção directa entre o componente PP3 e a lipase, mas sim às fortes propriedades surfactantes do componente PP3, que por adsorção na interface diminui fortemente a tensão interfacial e previne a adsorção de lipase, prevenindo o contacto entre a lipase e o seu substrato (Girardet et al, 1993; Innocente et al, 1998).

Relação entre a Estrutura e o Papel Biológico do Componente PP3

A estrutura primária do componente PP3 (1-135) determinada por Sorensen e Petersen (1993 b.) não leva em linha de conta com as suas propriedades hidrofóbicas. Estes autores não encontraram nenhuma zona hidrofóbica na cadeia polipéptidica que possa explicar porque é que ao componente PP3 (1-135) adsorve à interface óleo-água.

A estrutura secundária revela que o terminal C 99-135, pode formar uma α -hélice anfílica, ou seja contendo uma face com resíduos hidrofóbicos e outra com resíduos hidrofílicos polares. Estas estruturas anfílicas geralmente interagem bem com os lípidos. Assim, parece que a estrutura secundária α -hélice anfílica está presente em várias espécies, indicando que o terminal C é uma região funcionalmente importante do componente PP3 (1-135) (Girardet, 1996).

Outros Papeis do Componente PP3

A fracção hidrofóbica das proteose peptonas (HFPP) estimula o crescimento da bifidobactéria (Etienne et al, 1994).

A estrutura primária do componente PP3 inclui resíduos de fosfoserina localizados perto do terminal – N que pode actuar como fixante do ião cálcio. O componente PP3 pode controlar a solubilidade do fosfato de cálcio que não se liga aos micélios de caseína (Sorensen e Petersen, 1993 b.).

Contudo, o potencial de afinidade de ligação do cálcio ao componente PP3 é difícil de determinar, devido à grande variação na extensão de fosforilação de resíduos de serina (Girardet, 1996).

Concluindo, a estrutura primária do componente MM 28000 determinado por Sorensen e Petersen (1993, b.) inclui três partes principais: um terminal-N fosforilado que se pode ligar ao cálcio ou ao ferro, uma região central que comporta N-acetilgalactosamina – N

– glicano que é a estrutura comum partilhada pelo componente PP3 e pelas glicoproteínas da MFGM, e um terminal-C, que é provavelmente anfílico e responsável pelas propriedades funcionais especiais do componente PP3 (Girardet, 1996).

1.3.3.2 Propriedades funcionais das proteínas do soro

As propriedades funcionais das proteínas do soro podem ser definidas como as propriedades físico-químicas, que contribuem para obter uma determinada característica no produto alimentar final em que são inseridas (deWit, 1989). A conformação e as propriedades funcionais das proteínas do soro estão interligadas e são determinadas por alterações na estrutura globular das moléculas. No entanto, as propriedades destas proteínas nos alimentos são muito difíceis de prever, uma vez que dependem do tratamento a que foram sujeitas (para as recuperar do soro) e além disso, dependem das interações que as próprias proteínas estabelecem com outros componentes no alimento (Cheftel e Lorient, 1982).

Assim, existem propriedades inerentes à fracção proteica do soro, enquanto que outras são adquiridas com os tratamentos a que o soro é submetido, como por exemplo, a capacidade de gelificação.

As principais propriedades funcionais das proteínas do soro encontram-se abaixo resumidas:

(a) Solubilidade

Esta é uma propriedade muito importante pois está inter-relacionada com as outras propriedades, nomeadamente com a viscosidade, a amplitude de gelificação e emulsificação, e é ainda um critério de desnaturação. A solubilidade depende do pré-tratamento de separação e do método de concentração do soro, da presença de outros iões, do pH e da temperatura (para temperaturas acima de 70°C, as proteínas do soro lácteo perdem a sua solubilidade, por desnaturação).

(b) Coagulação – Gelificação – Floculação

A floculação resulta da formação de uma estrutura tridimensional com água que promove o equilíbrio entre forças de repulsão electrostática e forças de atracção de Van der Waals.

A coagulação é considerada uma agregação desordenada que ocorre após a desnaturação térmica.

O aquecimento do soro lácteo, com uma concentração superior a 8%, conduz à formação de um gel, cuja composição varia com o tipo de tratamento térmico e com o pH (formam-se a valores de pH ácidos), com a concentração de proteína (deverá ser elevada) e com os açúcares presentes em solução.

(c) Propriedades emulsificantes

Estas propriedades estão relacionadas com a solubilidade das proteínas em água e permitem reduzir a tensão interfacial, entre componentes hidrofóbicos e hidrofílicos de um alimento. As proteínas que possuem capacidade de emulsificação, têm vasta aplicação nos alimentos que contêm gordura e água (charcutaria, condimentos e outros). A capacidade emulsificante das proteínas do soro diminui com o aumento da temperatura e apresenta um valor óptimo a pH 5,6.

1.3.3.3 Propriedades biológicas e valor nutricional das proteínas maioritárias do soro

A OMS (Organização Mundial de Saúde) especificou a concentração ideal de aminoácidos, que devem ser incluídos na dieta humana. Comparando (Tabela 1.14) esta concentração de referência, com a das proteínas do soro, pode concluir-se que a fracção proteica do soro contém mais aminoácidos essenciais do que a proteína de referência. Observando a Tabela 1.14 é também possível verificar que a β -lactoglobulina (β -Lg) e a α -lactalbumina (α -La), têm um valor nutritivo superior ao da proteína de referência (Renner, 1992).

Tabela 1.14 Concentração de aminoácidos essenciais na proteína de referência, nas proteínas do soro, na β -lactoglobulina (β -Lg), e na α -lactalbumina (α -La) (Renner, 1992).

Aminoácido	Proteína Ref^a	Proteína Soro	β-Lg	α-La
Triptofano	1,0	2,1	2,2	6,6
Fenilalanina + Tirosina	6,0	7,3	7,3	9,6
Leucina	7,0	11,1	15,3	11,6
Isoleucina	4,0	6,8	6,7	6,8
Tionina	4,0	8,0	5,4	5,5
Metionina + Cisteína	3,5	4,8	5,6	6,9
Lisina	5,5	9,9	11,7	11,4
Valina	5,0	6,8	5,9	4,8
TOTAL	36,0	56,8	60,1	63,2

Além da concentração de aminoácidos, devemos ter em conta a sua disponibilidade biológica, ou seja o valor biológico das proteínas no alimento. Comparativamente as proteínas do soro têm um valor biológico superior ao das proteínas do ovo (Renner, 1992). Assim, devido à quantidade supérflua de aminoácidos presente nas proteínas do soro, estas podem aumentar o valor proteico dos alimentos usados na dieta humana (Renner, 1992).

Além de aminoácidos, o soro contém também a maioria das vitaminas presentes no leite (e solúveis em água), como a vitamina B12 (0,0002 mg/100g), a vitamina B6 (0,05 mg/100g), ácido pantoténico (0,4 mg/100g), riboflavina (0,14 mg/100g), biotina, tiamina (0,04 mg/100g), ácido fólico (0,001 mg/100g) e ascórbico (Renner, 1986). Na Tabela 1.15 apresentam-se as principais funções biológicas das proteínas do soro.

Tabela 1.15 Principais funções biológicas das proteínas do soro.

Proteínas	Função Biológica
β -Lg	Capacidade de ligar moléculas hidrofóbicas, como o retinol, fazendo o seu transporte do estômago para o intestino. ^a
α -La	Faz parte do enzima lactose sintetase, a qual permite a síntese de lactose a partir da galactose e glucose. ^b
BSA	Transporta ácidos gordos insolúveis no sangue. ^c
Imunoglobulinas	Função imunitária. ^d
Lactoperoxidase	Suprime o crescimento bacteriano. ^e
Lactotransferina	Capacidade de se ligar ao Fe ³⁺ , estimula a resposta imunitária, e suprime o crescimento bacteriano. ^e

a, e – Fox e Flynn, 1992 b – Brew e Grobler, 1992 c – deWit, 1989 d – Cheftel e Lorient, 1982

1.3.4 Processos de Recuperação das Proteínas do Soro – Obtenção de Concentrados Proteicos de Soro

Têm sido desenvolvidas metodologias que permitem a concentração de proteínas relativamente aos outros componentes de natureza não proteica (Moulin e Galzy, 1993). Isto deve-se ao facto de o soro não ser uma fonte equilibrada de nutrientes, contendo um elevado teor de lactose e uma baixa concentração de proteínas e cinzas, não permitindo evidenciar nenhuma das propriedades das proteínas. De seguida serão descritos os principais métodos usados actualmente para obter concentrados proteicos e fracções individuais de proteínas.

Precipitação Térmica

No que respeita à fracção proteica do soro lácteo considerada globalmente, o procedimento mais comum consiste na obtenção da mal denominada comercialmente alfa lactalbumina, que consiste na realidade numa mescla de proteínas do soro obtidas por precipitação após um aquecimento intenso (90°C, 10 minutos) a pH inferior a 3,0, o que resulta na desnaturação irreversível e precipitação da fracção correspondente às proteínas solúveis (Marshall, 1982; Mathews, 1984; Riera et al, 1996).

Quando as proteínas do soro lácteo são sujeitas a tal aquecimento perdem a sua estrutura globular ficando expostos os seus grupos sulfídricos, e portanto sendo mais fácil a sua posterior agregação (Marshall, 1982; Riera et al, 1996).

O produto é um pó insolúvel em água, com elevado conteúdo de cinza e com uma concentração de proteína de 60-95% (Zall, 1992; Pearce, 1992).

Estas práticas são habituais nas indústrias de produção de queijo, onde o precipitado é usado como aditivo, e incorporado na cuba com a finalidade de aumentar o rendimento total do processo (Riera et al, 1996).

Outro processo muito usado em plantas de produção de queijo ou tratamento de soro lácteo é a produção de concentrados de proteína, que consistem em misturas de praticamente todas as proteínas presentes no soro (nas mesmas proporções), onde se aumentou a sua percentagem sobre o extracto seco (o valor inicial ronda os 15% e pode ser elevado a 80% com procedimentos bem desenhados), mediante etapas de decantação ou centrifugação com posterior lavagem dos precipitados/sedimentos e secagem (Riera et al, 1996).

No entanto estas operações apresentam alguns problemas quando passados a grande escala ou a processos contínuos, para além de implicarem em determinadas circunstâncias um certo grau de desnaturação.

A concentração pode ser elevada a 95% quando se usam técnicas como troca iónica ou ultrafiltração (acompanhada de diafiltração) combinadas geralmente com pré-tratamentos do soro (Riera et al, 1996).

Ultrafiltração (UF)

Desde 1981, que a ultrafiltração se tornou a técnica mais utilizada para recuperar as proteínas solúveis do soro. O desenvolvimento de membranas robustas, sintéticas e laváveis, bem como a melhoria dos processos contínuos pelo uso de multietapas, reciclagem e diafiltração, foram factores significativos para o sucesso destes processos (Mathews, 1984). Os componentes de baixo peso molecular (lactose, sais e água – corrente de permeado) permeiam preferencialmente as membranas de ultrafiltração, as quais retêm as moléculas de proteína (retentado).

Antes do processamento, o soro é sujeito a um pré tratamento por métodos que envolvem ajuste de pH e/ou temperatura, adição de cálcio ou agentes complexantes do íão Ca^{2+} , centrifugação ou microfiltração para dissolver o fosfato de cálcio coloidal e/ou para remover partículas de caseína insolúveis (Mulvihill, 1994).

Na maioria das aplicações comerciais a ultrafiltração é acompanhada de diafiltração, permitindo uma maior remoção de sais e lactose, conduzindo simultaneamente a uma maior diluição do retentado. Assim, o concentrado proteico do soro antes de ser seco, tem que passar por uma etapa de concentração.

Filtração em gel

A resina mais utilizada é a Sephadex (Mathews, 1984). As proteínas são eluídas da coluna, enquanto que os sais e a lactose são retardados. Esta técnica permite obter produtos com 30-80% de proteínas, mas é um processo que exige elevados custos de investimento e operação (Zall, 1992).

Precipitação por agentes complexantes

Têm sido usados vários agentes complexantes para recuperar as proteínas do soro, mas apenas o “polifosfato” encontrou aplicação comercial (Mathews, 1984). Os

polifosfatos de cadeia longa precipitam as proteínas do soro a valores de pH ácido (~2,5). O precipitado removido por centrifugação, é lavado, sofre um ajuste de pH e por fim é adicionado cálcio, por forma a remover o fosfato. A remoção de cátions (em particular o cálcio) antes da adição de fosfato permite reduzir a quantidade de fosfato necessária e resulta na recuperação de mais de 90% de proteína (Mathews, 1984). O concentrado proteico de soro preparado por esta técnica tem uma solubilidade e funcionalidade limitada, na formulação de alimentos com pH baixo. Este concentrado proteico de soro pode ter 30-85% de proteína e 10-15% de fosfatos (Morr, 1989; Zall, 1992).

Adsorção de troca iónica

Os concentrados proteicos de soro têm por vezes propriedades indesejáveis, devido ao elevado conteúdo em lípidos e lactose.

De forma a melhorar a qualidade dos concentrados proteicos de soro, foram estudadas técnicas baseadas na adsorção das proteínas e resinas (Etzcel, 1995). Os isolados de proteínas de soro contêm mais de 90% de proteína e têm propriedades funcionais superiores às dos concentrados proteicos do soro, e por isso um valor comercial superior.

Existem quatro tipos de resina de troca iónica: catiónicas fortes (grupo SP - sulfopropanil), catiónicas fracas (grupo CM - carboximetil), aniónicas fortes (grupo DEAE - dietilaminoetil) e aniónicas fracas (grupo QAE - aminoetil quaternário). As resinas fortes são as mais utilizadas para purificar as proteínas do soro, porque diminuem o custo do processo e o volume das soluções de lavagem (Etzcel, 1995).

Existem dois tipos de troca iónica que estão actualmente a ser utilizados para produzir concentrados de proteína do soro.

O processo VISTEC (usado para produzir BiPro®, isolado de proteínas do soro) utiliza uma resina de celulose num tanque agitado (Etzcel, 1995; Morr, 1989; Mulvihill, 1994; Mathews, 1984). O processo envolve vários passos, que estão descritos na figura 1.15:

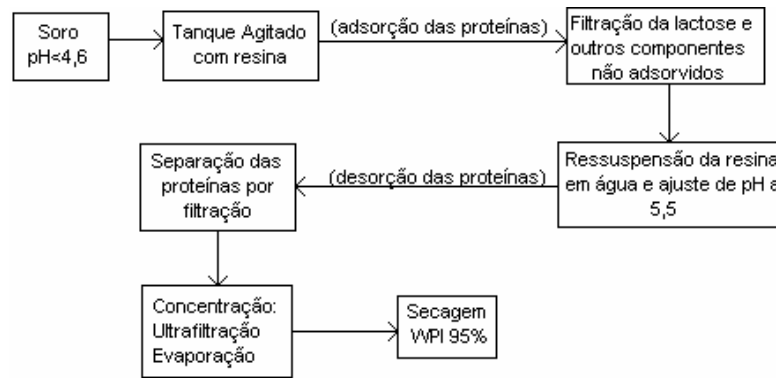


Figura 1.15 Processo VISTEC de recuperação de proteínas do soro, por adsorção de troca iónica em batch (adaptado de Mulvihill, 1984).

Quando neste processo se utiliza uma resina catiónica, o pH do soro que entra no reactor agitado é ajustado a 3,2 e depois até pH 9,0 para promover a desorção das proteínas (Etzel, 1995). Este processo em batch não permite a remoção total das proteínas do soro. Os processos de troca iónica em colunas, permitem alcançar este objectivo e são designados por cromatografia de troca iónica.

Em colunas empacotadas, a velocidade de separação é limitada pela difusão intraparticular ou pela difusão axial e/ou perdas de carga. A velocidade à qual a proteína se liga à resina iónica é usualmente rápida e não limita a velocidade global do processo. A ineficiente distribuição do fluxo, dispersão axial, transferência de massa e difusão intraparticular, geralmente baixa a eficiência da separação, baixando a resolução ou a capacidade (Etzel, 1995).

O processo SPHEROSIL (Etzel, 1995; Mathews, 1984) usa resinas catiónicas (Spherosil S) e aniónicas (Spherosil QMA) empacotadas em leito fixo. O soro é injectado na coluna promovendo a adsorção de proteínas, as quais são depois desorvidas por alteração do pH ou da força iónica.

Quando o soro tem um pH compreendido entre 6,0 e 6,5, as proteínas estão carregadas negativamente e podem ser adsorvidas na resina Spherosil QMA (Skudder, 1985; Barker e Morr, 1986). Depois da adsorção, a resina é lavada com água destilada e as proteínas são eluídas com uma solução de ácido clorídrico 0,1N. O processo permite recuperar cerca de 64% das proteínas do soro e a fracção proteica eluída depois de concentração por ultrafiltração e liofilizada, origina o concentrado proteico do soro com

20,8% de lactose. As imunoglobulinas e a lactotransferina do soro não são recuperadas com esta técnica.

A solubilidade do concentrado proteico do soro obtido por este processo é idêntica à dos concentrados proteicos preparados por ultrafiltração, as propriedades de gelificação são superiores, mas têm uma funcionalidade muito pobre no que respeita à expansão de bolos, quando comparada com a funcionalidade que apresenta a clara do ovo.

Um exemplo de aplicação desta técnica a nível industrial é o denominado processo BIOSEPPRA, com um rendimento de 70%, capaz de tratar 1 00 000 litros de soro por dia, com uma coluna de 2 metros de altura e 1 metro de diâmetro. A produção de proteínas é de 462 kg/dia e o produto final tem 90% de proteína (não desnaturada) e menos de 1% de lactose e gordura. Este concentrado proteico de soro tem propriedades funcionais fortes, como solubilidade completa (mesmo a valores de pH ácido), capacidade de formar espumas estáveis e géis.

Na troca catiónica, o soro clarificado com pH inferior a 4,5 é injectado na coluna, que contém a resina Spherosil SP, de forma a permitir a adsorção das proteínas (Morr e Nichols, 1985). Depois da lactose e do material não adsorvido ser eluído com HCl 0,1N, o pH do meio é elevado com uma solução alcalina de NaOH 0,1M por forma a promover a eluição das proteínas. A recuperação das proteínas é de 86-94% para fracções eluídas entre pH 5-12,2. No entanto, para diminuir a desnaturação proteica as fracções eluídas passam a ser recolhidas a pH 3-10, o que conduz a um menor rendimento em proteína 10-20%. Os autores concluíram que para produzir um concentrado proteico com maior conteúdo de proteína e menor de cinza, seria necessário usar ultrafiltração seguida de diafiltração, depois da operação em coluna.

Todas as proteínas à excepção das imunoglobulinas foram recuperadas. A solubilidade deste concentrado proteico de soro é inferior à de um concentrado proteico de soro preparado por ultrafiltração.

Estes processos de adsorção iónica, em condições ideais, recuperam cerca de 85% de proteína e os concentrados assim obtidos são caracterizados por um elevado conteúdo proteico, baixas concentrações de lípidos e lactose e, boas propriedades funcionais. No entanto, têm várias limitações (tabela 1.16), nomeadamente o fouling irreversível da resina (Etzel, 1995; Morr e Nichols, 1985), devido à ligação de lípidos polares do soro aos poros de resina. Antes de se proceder à separação cromatográfica

devem ser utilizados métodos de clarificação, mais eficientes na remoção de lípidos (fosfolípidos e lipoproteínas). No entanto, estes tratamentos adicionais são mais um factor de consumo de tempo e aumento de custos de produção de concentrados proteicos de soro (Biscans et al, 1985).

Uma das opções para ultrapassar estes inconvenientes é a utilização da adsorção em batch, em que a solução de alimentação não clarificada contacta directamente com o adsorvente, num tanque agitado (Frej et al, 1994). A desvantagem deste método é que, o tanque agitado actua como um único prato teórico, e por isso conduz a tempos de processo muito elevados. Outra opção, é a utilização de adsorção em leito expandido (EBA), a qual permite que as impurezas passem através do leito sem que estas se acumulem dentro da coluna. Deste modo, permite eliminar os passos de clarificação e aumentar o tempo de vida das resinas. A técnica EBA ganhou rápida aceitação nas separações industriais, nomeadamente na indústria de lacticínios (Biscans et al, 1985; Noppe, 1998).

Tabela 1.16 Vantagens e desvantagens dos principais métodos usados na concentração de proteínas do soro.

Método	Desvantagens	Vantagens	Ref^o
Ultrafiltração	Elevados custos de investimento e operação. Remoção incompleta dos componentes de baixo peso molecular. Contaminação microbiana. Produção de elevados volumes de permeado	Concentrados proteicos com boas propriedades funcionais	Zall, 1992
Filtração em gel	Elevado custo. Fouling das resinas. Contaminação microbiana.	Concentrados proteicos com elevados conteúdos de proteína não desnaturada	Mathews, 1984
Precipitação Térmica	Baixa recuperação de proteína com várias impurezas. Desnaturação proteica.	Método simples.	Mathews, 1984
<i>Cromatografia de Troca Iónica</i>	Produção de elevados volumes de soluções de lavagem, regeneração e de fracção lactosada. Necessidade de concentrar a fracção proteica eluída por UF, evaporação e secagem. Elevado consumo de tempo em cada ciclo de purificação. Contaminação microbiana e fouling da resina. Resinas caras e com baixa capacidade proteica	Recuperação elevada de proteína. Concentrados proteicos com baixo conteúdo em lactose e lípidos. Boas propriedades funcionais	Mulvihill, 1994 e Pearce, 1992

1.3.5 Fraccionamento das Proteínas Maioritárias do Soro

Actualmente, existe um interesse comercial considerável na preparação das proteínas individuais para alimentação e aplicações nutricionais e terapêuticas (Zydney, 1998). Técnicas para isolar proteínas de soro individuais à escala laboratorial por salting-out, permuta iónica e/ou cristalização estão disponíveis à cerca de 40 anos (Mulvihill, 1994). Assim, têm sido desenvolvidos vários métodos de fraccionamento de proteínas do soro, embora só alguns deles tenham aplicação a nível industrial (Zydney, 1998).

Precipitação Selectiva

Neste método podem variar-se parâmetros como o pH, a temperatura e a concentração de sal, de forma a obter diferentes fracções proteicas (Kwata et al, 1985; Zydney, 1998).

Kwata et al (1985) descreveram o uso de FeCl_3 como agente precipitante selectivo das proteínas do soro. O pH do soro é ajustado a 4,5 e com adição de 6,7mM de FeCl_3 , a betalactoglobulina e a maioria das imunoglobulinas precipitam, enquanto que as restantes proteínas permanecem no sobrenadante. Para eliminar as imunoglobulinas do precipitado, o pH do soro sofre novo ajuste até pH 3,0, na presença de FeCl_3 (Mulvihill, 1994). O mecanismo de precipitação ainda não está bem definido, mas pensa-se que o ião Fe^{3+} se liga às proteínas através de pontes de FeCl_3 (Pearce, 1992).

Outra estratégia para eliminar a betalactoglobulina do soro é utilizar a baixa solubilidade da betalactoglobulina a valores de pH próximos do seu ponto isoeléctrico (Pearce, 1992). O soro sofre um pré-tratamento que inclui ultrafiltração, desmineralização por electrodiálise e ajuste do pH a 4,65. Este pH promove a precipitação da betalactoglobulina, ficando um sobrenadante rico em alfa lactalbumina em conjunto com outras proteínas.

Outro parâmetro que permite alterar a solubilidade da alfa lactalbumina é a temperatura. Pierre e Fauquant (1986) descreveram um processo, com interesse para aplicação à escala industrial, que permite isolar alfa lactalbumina e betalactoglobulina, em fracções separadas. O soro é primeiro clarificado e concentrado por ultrafiltração, e, depois sofre um tratamento térmico a 55°C, durante 30 minutos, o qual promove a

agregação da alfa lactalbumina e da albumina do soro bovino (BSA). Assim, obtém-se um sobrenadante rico em betalactoglobulina (98% pura) e um precipitado constituído por alfa lactalbumina (50%), BSA (15%) e outras proteínas (13%).

Extracção líquido-líquido

A separação das duas principais proteínas do soro usando um sistema de duas fases aquosas, com polietileno glicol (PEG) e fosfato de potássio, foi descrita por Chen (1992). Utilizando PEG de baixo peso molecular (PEG1000 e PEG1500) e uma elevada concentração de sal (20% p/p), conseguiu obter betalactoglobulina (pura) na fase inferior do sistema e, alfa lactalbumina (84%) na fase superior do sistema aquoso.

Separação com membranas

Zydney (1998) mostrou que, através de um sistema de membranas e com modificações no pH e força iónica das soluções, é possível fraccionar os constituintes proteicos do soro. Permite isolar betalactoglobulina e alfa lactalbumina, BSA, lactotransferina, lactoperoxidase e imunoglobulinas em fracções distintas. Esta é uma técnica que poderá ter aplicação em larga escala.

Cromatografia de afinidade

Existem vários ligandos que já foram testados para fraccionar o soro: heparina-sepharose, cibracon-blue e anticorpos monoclonais específicos (Zydney, 1996). Apesar deste tipo de cromatografia permitir purificar proteínas com eficácia é uma metodologia economicamente inviável à escala industrial (Pearce, 1992; Zydney, 1998).

Cromatografia de troca iónica

Em 1985, Skudder estudou a possibilidade de usar a resina Spherosil-QMA em leito fixo, para fraccionar as principais proteínas do soro. A adsorção de proteínas do soro é máxima a pH 6,5 e a aplicação de um gradiente de NaCl (0,01-0,41M) para eluir as proteínas originou dois picos, o primeiro continha 2% de proteína e o segundo 77%. Este grau de fraccionamento é insuficiente e pode ser devido à similaridade dos pontos isoeléctricos das principais proteínas.

No entanto, foi possível produzir fracções com elevado conteúdo em betalactoglobulina, através da passagem de grandes quantidades de soro pela resina e

utilizando como eluente HCL 0,1M (devido à maior afinidade de betalactoglobulina para a resina, do que as outras proteínas).

Skudder obteve frações com 99,9% e 67,7% de betalactoglobulina (embora parcialmente desnaturada, (Outinen et al, 1996)), a partir de soro ácido e doce, respectivamente.

1.3.6 Aspectos económicos do processamento do soro

A existência de soro de queijo é fortemente condicionada pela produção de queijo, uma vez que o soro é um subproduto incontornável na produção de qualquer tipo de queijo (Meireles, 1999)

Situação Mundial

Nos últimos anos tem-se verificado um aumento da produção de soro devido a um aumento da produção mundial de queijo, em virtude do aumento das exigências das populações.

A quantidade total de queijo e soro produzida no mundo, em 1983, foi de aproximadamente 10 e 90 milhões de toneladas respectivamente, o que corresponde a 0,7 e 6 milhões de toneladas de proteínas e sólidos totais.

A União Europeia é o mercado mais desenvolvido do mundo no ramo dos lacticínios, devido à quantidade total de leite produzido e à elevada concentração de produtores. Assim, é no espaço da União Europeia que a competição é mais agressiva e onde as margens de rentabilidade sofrem uma maior pressão (Meireles, 1999).

O aumento da produção de queijo e a diminuição da produção de leite colocam desafios à indústria de lacticínios no sentido de melhorar a sua eficiência e é neste sentido que o soro de queijo pode ser considerado um precioso contributo.

Apesar de cerca de metade do soro produzido no mundo ser eliminado como efluente, deitado nas terras ou em sistemas hídricos, resultando numa perda importante de energia alimentar, bem como criando uma grande perda económica, a outra metade é processada em vários produtos alimentares ou rações.

A produção mundial estimada de proteínas de soro de elevada qualidade é pelo menos de 600 000 toneladas. Na Europa, cerca de 50% de 2 milhões de toneladas de sólidos totais do soro é utilizada para a produção de soro em pó (devido à facilidade desta solução e à versatilidade de utilizações que permite), e a restante é distribuída entre produção de soro em pó deslactosado (18%), soro em pó desmineralizado (5%) e vários produtos de proteína do soro (5,5%). Nos E.U.A. cerca de 50% dos sólidos totais do soro (680 000 toneladas) são distribuídos entre produção de soro seco (52,5%), soro parcialmente desmineralizado por electrodiálise (2%) e concentrados proteicos (5%).

A produção de produtos de maior valor acrescentado tem vindo a aumentar, e em 1995 foram produzidas 230 000 toneladas de concentrados proteicos na Europa:

- Soro em pó – 600 000 toneladas
- Soro em pó desmineralizado e deslactosado – 180 000 toneladas
- Concentrados proteicos – 230 000 toneladas
- Lactose - 150 000 toneladas
- Soro deslactosado – 100 000 toneladas
- Outras formas 50 000 toneladas

Situação Portuguesa

A produção nacional de queijo corresponde a cerca de 1% da produção total da União Europeia. Considerando que a indústria de lacticínios nacional tem uma concentração substancialmente mais baixa que a da maior parte dos países europeus, as condições para o desenvolvimento de soluções de processamento de soro não são as ideais.

A produção anual de soro em Portugal tem vindo a aumentar a taxas diferentes ao longo desta última década.

Tabela 1.17 Leite, queijo e soro em Portugal Continental (adaptado de Meireles, 1999 e Pintado, 1999)

Ano	Produto(ton)					Ref ^a
	Leite	Queijo			Soro	
		Total	Vaca	Ovelha+Cabra ^a		
1984	912848	36861	-	-	-	Santiago,93
1985	965920	38949	-	-	-	
1986	1043807	35970	-	-	72750	
1987	1212193	39334	-	-	78000	
1988	1157966	41163	-	-	94912	
1989	1187231	49985	-	-	76484	
1992	1209852	-	28970	16619	-	Tecninvest,98
1993	1139810	-	29026	17557	-	
1994	1123827	-	31845	17991	-	
1995	1158647	34383	32443	-	277263 *	

^a País inteiro * resultados em 10³ litro

A produção total de soro hoje em dia é de cerca de 280 000 m³/ano, o que corresponde a cerca de 1000 m³/dia, e a maior parte é distribuída por apenas 31 fábricas de queijo.

Deste volume total de soro, cerca de 27% é ainda deitado nos esgotos ou nas correntes hídricas, o que constitui um problema persistente para a indústria queijeira. Esta realidade é mais observada em pequenas instalações que não conseguem ter autonomia para secar o seu próprio soro. É esperado que os contratos de adaptação ambiental do ministério do ambiente ajudem a resolver esta situação, principalmente por concentração ou secagem do soro, ou quando estas possibilidades não forem viáveis, o soro deverá ser usado directamente na alimentação de gado.

Tabela 1.18 Quantidades de soro produzidas em Portugal (adaptado de Meireles, 1999)

Região	Destino Soro Produzido (kl/dia)				TOTAL(kl/dia)
	Efluente	Pecuária	Requeijão	Secador	
Entre Douro e Minho	89	27	12	272	400
Beira Litoral	3	89	2	243	337
Beira Interior	151	41	6	0	197
Ribatejo	4	52	6	19	81
Alentejo	4	23	0	19	46
TOTAL	250	232	25	554	1061

A produção portuguesa de soro em pó é cerca de 6300 toneladas e cerca de 4114 toneladas são exportadas. Contudo, devido ao baixo preço do soro em pó e ao mercado limitado, é estrategicamente importante desenvolver novas aplicações mais rentáveis para a utilização do soro.

Finalmente, cerca de 2% do soro total (cerca de 630 toneladas) é usado para produzir requeijão, tradicional soro de queijo português, obtido pelo tratamento térmico do soro levando à precipitação das proteínas do soro.

A utilização de soro para requeijão deveria ser expandida porque praticamente todas as proteínas são recuperadas e obtém-se um produto nutritivo. Contudo, devido a problemas de marketing associados ao facto do produto ter um tempo de vida muito curto, o mercado é ainda muito limitado.

O líquido que permanece após a precipitação das proteínas do soro (rescaldão) contém a maior parte da lactose original, o que exige posterior tratamento.

1.3.7 Ambiente Legal

O ambiente legal dos lacticínios é influenciado por duas políticas de fundo da União Europeia, por um lado a política agrícola comum (P.A.C.) e por outro a convergência da legislação ambiental dos estados membros.

A P.A.C. estabelece as quotas limitativas da produção de leite na tentativa de controlar o excesso de produção. Esta política tem impacto especialmente nos grandes produtores de queijo, que procurarão aproveitar os elementos do leite da melhor forma.

A convergência da legislação ambiental tem um elevado impacto na produção nacional de queijo.

Tradicionalmente as normas ambientais portuguesas eram bastante permissivas em questões de tratamento de efluentes. Com a adopção de novas medidas, as indústrias de queijo nacionais serão obrigadas a encontrar aplicações para o soro produzido.

O sector dos lacticínios é um dos 18 sectores de actividade industrial com que o Ministério do Ambiente celebrou contratos de adaptação ambiental, cuja adesão por parte das empresas foi voluntária (Ferraz, 1998)

Aderiram ao contrato de adaptação ambiental (C.A.A.) assinado pela ANIL – Associação Nacional das Indústrias de Lacticínios, 49 unidades industriais. Destas, 5 unidades encerraram e 2 não estão actualmente a laborar. Das restantes 42 unidades, 34 cumpriram integralmente os planos de adaptação, 4 empresas decidiram construir unidades novas de raiz, estando as restantes 4 unidades um pouco mais atrasadas. A ANIL considera como muito positivo o esforço que as empresas fizeram para se adaptarem à legislação. Foram introduzidas importantes alterações por forma a ser melhorado o desempenho ambiental das empresas. A introdução da lavagem CIP (cleaning in place) e a utilização de sistemas de osmose inversa, que permitem reduzir o volume de soro para menos de 1/3 da quantidade inicial, são meros exemplos dessa melhoria (Silva e Frutuoso, 2000).

1.3.8 Potencial Poluente

Em Portugal a maioria das indústrias de lacticínios não contemplam ainda a fase de valorização de resíduos, o que agrava os problemas ambientais do sector, e em particular das unidades com produção de queijo, devido à rejeição de grandes quantidades de soro de leite (Ferraz, 1998).

Apesar de terem sido publicados alguns avanços na utilização do soro durante esta última década, uma grande parte do soro produzido é ainda eliminado como efluente. Eliminar o soro por esta via é não somente contra a lei ambiental em vigor, como também um desperdício de nutrientes, uma vez o soro na forma seca é uma fonte rica em vitaminas, minerais e energia.

O principal problema ambiental do sector prende-se com os efluentes líquidos, não pelo seu volume, mas pela elevada carga orgânica apresentada (Silva e Frutuoso, 2000). Os efluentes líquidos gerados pelas indústrias de lacticínios caracterizam-se

também por apresentarem variações cíclicas tanto de caudais como de características, nomeadamente no valor de pH, devido às fases de lavagem que utilizam alternadamente soluções ácidas e alcalinas (Ferraz, 1998).

O soro é um dos poluentes mais potentes dentro dos efluentes da indústria alimentar, devido ao seu elevado BOD. É estimado que 100 kg de soro líquido, contendo 3,5 kg de BOD e 6,8 kg de COD, tem uma carga poluente equivalente aos efluentes produzidos anualmente por 15 pessoas.

Tabela 1.19 Tipos de efluentes e correspondente BOD (adaptado de Ferraz, 1998)

TIPO EFLUENTE	BOD (mg/l)
Soro doce	35 000
Soro ácido	45 000
Efluente da indústria de processamento de peixe	50 000
Efluente doméstico	300

O soro libertado quer nos sistemas hídricos (por exemplo, canais de irrigação), quer directamente na terra, com ou sem tratamento, pode ser perigoso por alteração da sua composição físico-química, pelo decréscimo do rendimento de produção e decréscimo das formas de vida aquáticas, devido à carência de oxigénio dissolvido.

Tabela 1.20 Parâmetros típicos de um efluente produzido numa fábrica com e sem recuperação de soro.

	Sólidos Totais (mg/l)	COD (mg/l)	BOD (mg/l)	Óleo/Gordura (mg/l)	Azoto Total (mg/l)	Fósforo Total (mg/l)
Fábrica com recuperação de soro	681	5312	2397	96	90	26
Fábrica sem recuperação de soro	-	20559	5312	463	159	21

A introdução de processos membranares para a recuperação da fracção proteica do soro inteiro não resolve completamente este problema, devido à lactose que permanece no permeado e que tem que ser removida antes do permeado ser descarregado, na realidade os permeados típicos têm COD de 50-60 g/l, o que aumenta devido ao seu conteúdo em lactose e lactato.

Em Portugal, os efluentes são tratados essencialmente por lamas activadas, ou digestão anaeróbica seguida de lamas activas, contudo, quando o soro é descarregado no sistema de esgotos público, é necessário intensificar os pré-tratamentos a jusante antes de sair da fábrica o que implica um aumento dos custos do processo (Ferraz, 1998).

Estão em desenvolvimento alguns projectos, com contornos empresariais e que englobam diversas gamas de produtos, que visam o aproveitamento do soro para a produção de produtos de maior valor acrescentado do que o soro em pó. Um exemplo de um destes projectos é o que está a ser desenvolvido por um conjunto de 3 indústrias de lacticínios, projecto PROLAC, Quinta dos Ingleses, Lacticínios Âncora e Lacticínios Halos, em colaboração com a Universidade do Minho e o Instituto Superior Técnico (Ferraz, 1998).

1.3.9 Projecto PROLAC – Valorização das proteínas e lactose do soro

O objectivo deste projecto é promover a valorização integral de soro de queijo, pela criação de novos produtos para o mercado português e, simultaneamente, solucionar o problema ambiental associado ao soro (Coelho, 1999).

O projecto de valorização do soro envolve: uma unidade de ultrafiltração (onde se separa a fracção rica em proteína da fracção rica em lactose), um fermentador de operação contínua (onde a lactose é convertida a etanol por uma estirpe de levedura), um destilador (concentração do etanol produzido) e uma unidade de secagem (secagem da fracção rica em proteína).



Figura 1.16 Unidade de ultrafiltração da instalação piloto para valorização integral de soro de queijo da Quinta dos Ingleses.

Considerando o processo na sua globalidade (fraccionamento, fermentação e destilação), os efluentes existentes são: águas de lavagem do equipamento e efluente do processo de destilação como é visível na Figura 1.17.

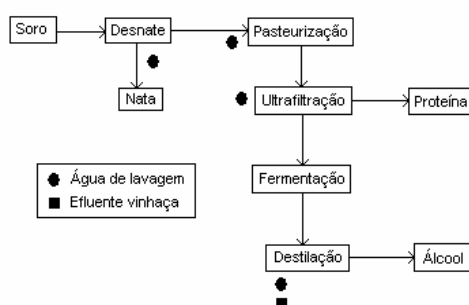


Figura 1.17 Efluentes da instalação piloto de valorização integral do soro de queijo da Quinta dos Ingleses

A caracterização do efluente líquido constou na determinação dos seguintes parâmetros: volume de efluente, CQO, CBO5, sólidos suspensos totais (SST) e voláteis, azoto total, temperatura, pH e cor.

Tabela 1.21 Caracterização dos efluentes e do soro de queijo da Quinta dos Ingleses (adaptado de Coelho, 1999).

Parâmetro	Vinhaça	Água de lavagem	Soro
Volume diário (l)	2367 *	6350	-
PH	3,8-4,3	5,0-6,0	5,5-6,5
Temperatura (°C)	70±10	20±5	30±5
CQO (mg O2/l)	19,794	400	76,076
CBO5 (mg O2/l)	3,245	200	67,067
SST (mg/l)	1,717	160	11,440
Azoto Total (mg/l)	986	-	1,329
Cor	Amarelo opaco	Branco	Branco esverdeado

* o caudal médio é calculado a partir do volume de mosto, do número de destilações a efectuar no dia e tempo que cada um demora.

O efluente da instalação piloto é encaminhado para a estação de tratamento de efluentes da Quinta dos Ingleses, que dispõe de uma unidade de produção de biogás, uma unidade de tratamento por lamas activadas e lagoas aeróbias.

A estação piloto de valorização de soro de queijo não possui qualquer tipo de emissão gasosa responsável pela alteração da qualidade do ar. A única substância gasosa libertada é dióxido de carbono resultante do processo fermentativo, que poderá teoricamente atingir 33,9 m³/dia.

A instalação piloto permite uma redução de 21% no volume e de 74% na carga orgânica valorizando os seus constituintes. No entanto, o efluente resultante desta estação não se enquadra dentro dos parâmetros de descargas de águas residuais, anexo XVIII Dec-Lei nº236/98.

À escala industrial existem duas situações a considerar: ou a implementação de uma unidade de tratamento de efluentes ou a descarga em colector municipal (Coelho, 1999).

1.3.10 Avaliação de mercado

As aplicações dos derivados do soro são variadas, podendo ser distinguidas entre as aplicações para a alimentação animal e humana. As aplicações na alimentação animal, embora sejam as mais importantes em termos de quantidades consumidas, são aquelas que apresentam menor sofisticação, menor valor e menor crescimento. Deste modo, são as aplicações na alimentação humana que se apresentam mais atractivas.

De um modo geral, os derivados de soro substituem outras fontes proteicas e aditivos funcionais, como por exemplo a clara do ovo, leite em pó, proteína de soja, caseínatos, etc.

Os concentrados de proteína do soro têm uma grande vantagem face aos produtos substitutos que é terem por base uma matéria-prima de baixo valor, permitindo ser bastante competitivos em termos de preço.

Para além disso, as proteínas do soro são as melhores quer em propriedades nutritivas quer em propriedades funcionais (Meireles, 1999)

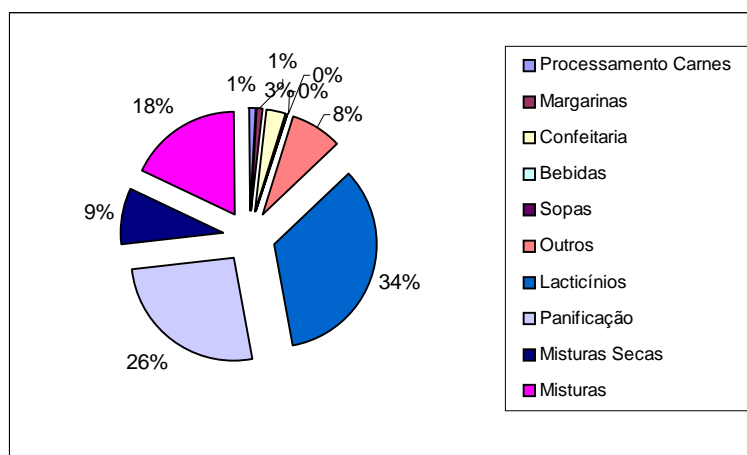


Figura 1.18 Utilizações finais de soro em pó para consumo humano nos E.U.A. (adaptado de Meireles, 1999)

Considerando as utilizações de soro em pó nos Estados Unidos da América, será previsível que as aplicações com maior consumo potencial serão na indústria de lacticínios, concretamente nos iogurtes, sobremesas, chocolates e pastelaria. Contudo, deve ser realçado o facto de determinados sectores da indústria alimentar terem

diferentes índices de desenvolvimento nos E.U.A. e em Portugal. Assim, não será de esperar que sectores muito tradicionais em Portugal, como por exemplo a panificação, utilizem este tipo de produtos em larga escala (Meireles, 1999).

O conjunto dos sectores da indústria alimentar portuguesa apresentam os seguintes consumos potenciais de concentrados proteicos de soro.

Tabela 1.22 Consumo potencial de concentrados proteicos de soro nos vários sectores da indústria alimentar portuguesa (adaptado de Meireles, 1999).

Sector Industrial	Concentrado Proteico 35%		Concentrado Proteico 80%	
	Preço \$	Quantidade ton/ano	Preço \$	Quantidade ton/ano
Carnes	N.A.	N.A.	500	75
Panificação	250	283	800	20
Confeitaria	250	2945	1000	130
Chocolates	N.A.	N.A.	800	75
Gelados	300	262	N.A.	N.A.
Iogurtes	N.A.	N.A.	800	200
Margarinas	N.A.	N.A.	800	16,5
TOTAL		3490		449

N.A. – não aplicável

O soro em pó é dos produtos disponibilizados pelos produtores de derivados do soro, o mais comum. As fracções proteicas são produzidas por poucas empresas, e normalmente requerem elevados investimentos em investigação e desenvolvimento, bem como na área produtiva e nas aplicações.

É previsível um decréscimo da produção de leite, pelo que a procura de outras fontes proteicas irá ser intensificada, beneficiando os derivados de soro.

O grande desenvolvimento da procura será na área de produtos de elevado valor acrescentado, fracções proteicas de soro para a utilização em produtos alimentares transformados ou farmacêuticos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Apresentam-se nesta secção todos os materiais e métodos experimentais utilizados durante a realização do trabalho experimental de partição bifásica aquosa.

2.1 Materiais

As tabelas 2.1, 2.2 e 2.3 apresentam os polímeros, sais, proteínas e outros reagentes utilizados durante os ensaios de partição.

Tabela 2.1 Polímeros utilizados na preparação dos sistemas bifásicos, sua origem e fornecedor

Polímero	Origem	Fornecedor
Reppal PES 100	milho	Reppe AB, Växjö
Polietileno glycol	—	Sigma Chemical Co, St. Louis, MO Merck

Tabela 2.2 Reagentes utilizados, grau de pureza e fornecedor.

Reagente		Pureza	Fornecedor
Sais	Cloreto de Sódio	P.A.	PRONALAB
	Sulfato de Potássio	P.A.	PRONALAB
	Iodeto de Potássio	P.A.	MERCK
	Tiocianato de Potássio	P.A.	MERCK
	Sulfato de Sódio	P.A.	MERCK
	Fosfato Dipotássio trihidratado	P.A.	PRONALAB
	Potássio Dihidrogenofosfato	P.A.	PRONALAB
	Sulfato de Amónio	P.A.	PRONALAB
Ácidos	Ácido Clorídrico	P.A.	PRONALAB
	Ácido Acético	P.A.	Ridel-de Haën
Outros	Coomassie blue G-250	P/ electroforese	MERCK
	2- Mercaptoetanol	P.A.	PROMEGA
	Metanol e Etanol	P.A.	PRONALAB
	Acril e bis-Acrilamida	P/ electroforese	SIGMA
	Persulfato de amónio	P.A.	MERCK
	SDS	P/ electroforese	SIGMA
	Hidróxido de Sódio	P.A.	MERCK
	TRIS	Ultrol grade	CALBIOCHEM
	Nitrato de Prata	P.A.	LAB. MUNDIAL
	TEMED	P/ electroforese	SIGMA

Tabela 2.3 Proteínas utilizadas neste trabalho, seu peso molecular, ponto isoelétrico, origem e fornecedor

Proteína	Peso Molecular (kDa)	pI	Origem	Fornecedor
BSA	66,5	4,75-4,95	Soro bovino	SIGMA
β - lactoglobulina	18,362	5,2	Soro bovino	SIGMA
α - lactalbumina	14,147	4,2 – 4,8	Soro bovino	SIGMA

Neste trabalho foi utilizado um concentrado proteico 80 % p/p (CP 80) produzido na instalação piloto da Quinta dos Ingleses, obtido por ultrafiltração/diafiltração seguido de secagem por atomização. A composição deste concentrado proteico é de 80% de proteína, menos de 5% de gordura, menos de 11% de lactose e, entre 1,8 e 2,0% de cinzas (Coelho, 1999).

2.2 Preparação das soluções utilizadas

2.2.1 Preparação das soluções tampão

Ao longo do trabalho apresentado nesta dissertação usaram-se diversas soluções tampão: tampão fosfato e tampão TRIS/HCl. Estas soluções tampão foram preparadas conforme descrito no trabalho de revisão compilado por McKenzie (1969).

2.2.2 Solução – mãe de Reppal PES 100

Num frasco de 100 ml adicionou-se água e Reppal PES 100® de modo a ter uma concentração de 40% em massa deste polímero. Manteve-se esta mistura sob agitação até completa dissolução do polímero.

2.2.3 Soluções – mãe de polietileno glicol (PEG)

As soluções de PEG foram preparadas em matrizes contendo água desionizada de modo a obter uma concentração de 50% em massa de PEG 600, PEG 900, PEG 1500, PEG 6000, PEG 8000, PEG 10000 e PEG 20000.

A dissolução foi feita sob agitação, à temperatura ambiente.

2.2.4 Soluções – mãe de fosfato de potássio

A solução mãe de fosfato foi preparada adicionando num matraz sais de fosfato de potássio e água de forma a obter uma concentração final de 50% em massa nesse sal.

2.2.5 Soluções – mãe de sulfato de amónio

A solução mãe de sulfato de amónio foi preparada em matraz, adicionando água e sulfato de amónio de forma a obter uma concentração final de 50% em massa nesse sal.

2.3 Preparação dos sistemas bifásicos

Este trabalho foi dividido em 3 etapas, numa primeira etapa foram efectuados ensaios de partição bifásica aquosa com proteínas comerciais puras, α -lactalbumina e β -lactoglobulina (que correspondem às proteínas maioritárias do soro de queijo), numa segunda etapa, após se obterem as melhores condições para as proteínas comerciais, estas foram aplicadas a um concentrado proteico de soro proveniente da Quinta dos Ingleses, e numa etapa final do trabalho procedeu-se à extracção da fracção PP do concentrado proteico, purificação do componente PP3 por cromatografia de interacção hidrofóbica e finalmente esta proteína foi também aplicada em sistemas de partição bifásica aquosa.

Os sistemas bifásicos aquosos foram preparados em tubos de centrífuga de 15 ml de capacidade total ou eppendorfs de 2 ml, consoante a quantidade de proteína disponível para os ensaios de partição. Usaram-se soluções-mãe dos vários componentes do sistema bifásico aquoso, que eram pesadas directamente para o tubo (ou eppendorf) de modo a obter as concentrações desejadas para uma massa total de

10,00 gramas ou 1 grama. Assim, no caso dos sistemas PEG-Reppal, primeiro pesou-se o Reppal e depois a solução de PEG (de MM 600, 900, 1500, 6000, 8000, 10000 e 20000). No caso dos sistemas PEG-Sulfato ou PEG-Fosfato primeiro foram pesados os sais e só finalmente as soluções de PEG. Os sistemas foram tamponados de forma a obter o pH adequado. Os SBA com sais (NaCl, KI, K₂SO₄, KSCN, KCl) foram preparados dissolvendo o sal directamente no sistema bifásico para as concentrações pretendidas. Por fim acrescentou-se solução de proteína e fez-se a massa total com água desionizada. É de notar que, a quantidade de solução de proteína, bem como a concentração da solução de proteína adicionada diferiu de sistema para sistema. Nos ensaios efectuados com concentrado proteico de soro foram preparados sistemas bifásicos aquosos de 10 gramas, enquanto que, quando se utilizaram proteínas comerciais prepararam-se sistemas de 1 grama.

2.4 Doseamentos – Doseamento de proteína total

Para a determinação da concentração de proteína em soluções aquosas usam-se dois métodos, o método desenvolvido por Bradford (1976) e o método da absorção de radiação ultravioleta. O primeiro método é empregue nas experiências realizadas com concentrado proteico de soro e com o componente PP3 preparado a partir de concentrado proteico de soro. A absorção de radiação ultravioleta é empregue na determinação da concentração de proteína nas experiências realizadas com proteínas comerciais puras (α -lactalbumina e β -lactoglobulina).

Nos ensaios efectuados com concentrado proteico de soro, a partição foi avaliada por cromatografia de permuta iónica (FPLC) e por electroforese SDS PAGE.

2.4.1 Método de Bradford

Este método é utilizado para a determinação de proteína em soluções aquosas por se tratar de um método expedito e não sofrer grandes interferências. O princípio do método de Bradford (1976) é baseado no facto do corante Coomassie Blue G-250 coexistir em duas formas de cores diferentes: vermelho e azul. A sua forma de cor vermelha é rapidamente convertida na outra forma, por ligação da parte cromófora do corante a proteínas. Dada a ligação à proteína, é observada uma mudança no máximo de absorção das soluções deste corante de 465 nm para 595 nm. A reacção de ligação do

corante à proteína é um processo bastante rápido e a cor adquirida é estável durante 1 hora.

A determinação da proteína é efectuada em microplaca adicionando a cada poço, 20 µl de amostra, a 40 µl de hidróxido de sódio e a 1 ml de reagente de Bradford. A solução assim obtida é agitada e mantida em repouso durante 20 minutos à temperatura ambiente. Ao fim deste tempo, a absorvância da solução é medida a 595 nm.

2.4.1.1 Preparação do reagente de Bradford

O reagente de Bradford preparou-se por dissolução de 100 mg de corante Coomassie Blue G-250 em 50 ml de etanol absoluto. Esta solução foi mantida sob agitação durante cerca de 1 hora, para dissolução do corante. A esta solução adicionaram-se 100 ml de ácido fosfórico 85% (p/p) e o volume final foi acertado a 1000 ml com água destilada (Bradford, 1976).

Para cada solução de reagente de Bradford, é preparada uma curva de calibração com soluções de albumina de soro bovino de concentração até 1 mg/ml.

2.4.2 Método de absorção de radiação ultravioleta

O método de doseamento de proteína por absorção de radiação ultravioleta é empregue por se tratar de um método de leitura directo e, por isso, expedito. No entanto, este método apresenta como principais inconvenientes o facto de sofrer interferências de um elevado número de compostos e o facto de necessitar de um razoável volume de amostra (suficiente para encher a cuvete).

A absorção de radiação ultravioleta por proteínas é devida à presença de certos grupos cromóforos na sua estrutura. Cada um destes grupos absorve a um determinado comprimento de onda e portanto, a absorvância de proteínas a estes comprimentos de onda varia muito de proteína para proteína. A absorção a 280 nm é fundamentalmente devida à presença de ácidos aminados com anéis aromáticos, por exemplo triptofano e tirosina. A 260 nm absorve a fenilalanina, e entre 225 e 240 nm a cisteína, metionina, cistina e histidina. A comprimentos de onda de 225 nm e inferiores, é a própria ponte peptídica a absorver.

Opta-se por um método de leitura directa, porque nas experiências com as proteínas comerciais se tem de lidar com um elevado número de amostras. Assim, as amostras recolhidas de ambas as fases são diluídas 1:1 e a sua absorvância é determinada a 280 nm. Para eliminar as interferências produzidas pelos constituintes dos sistemas bifásicos aquosos, para cada sistema é preparado um ensaio em branco (isto é exactamente igual ao anterior, em que em vez de solução de proteína se adiciona água desionizada) e as suas fases sofrem o mesmo tratamento que as amostras, permitindo assim remover qualquer interferência observada.

2.4.3 Fast Protein Liquid Chromatography – FPLC – Cromatografia de permuta iónica

Nos ensaios efectuados com concentrado proteico de soro, a partição foi avaliada por cromatografia de permuta iónica (FPLC).

Esta técnica foi desenvolvida tendo em vista a purificação de proteínas no seu estado nativo. Uma vez que é necessária uma pressão relativamente baixa para atingir as elevadas velocidades de fluxo a que a separação ocorre, o risco de desnaturação provocada por tensões de corte diminui. Por outro lado, os componentes mecânicos são resistentes a tampões corrosivos, para além de não se verificarem contaminações ou inactivação dos compostos de interesse.

Uma outra vantagem desta técnica consiste no reduzido tempo de análise requerido, quando comparada com outros métodos de análise de proteínas (por exemplo, a electroforese). É ainda uma técnica útil na separação de compostos presentes em pequenas concentrações, e que permite facilmente que separações efectuadas em laboratório possam vir a ser realizadas à escala industrial.

O procedimento analítico efectuado consistiu no fraccionamento por troca aniónica, numa coluna Mono Q HR5/5 Pharmacia.

As amostras de ambas as fases dos sistemas bifásicos aquosos efectuados com concentrado de soro foram previamente dialisadas (para remover os sais) e liofilizadas (para concentrar). Em seguida, estas amostras foram dissolvidas em tampão TRIS/HCl

20 mM, pH 8,0, centrifugadas (2000 x g, 10 minutos) e filtradas (0,45 µm) antes de serem injectadas na coluna.

Os tampões foram também filtrados e desgaseificados antes de se proceder à separação.

As condições utilizadas encontram-se descritas na seguinte tabela:

Tabela 2.4 Condições utilizadas na determinação de proteínas por FPLC

Factor	Troca aniónica (Mono Q HR5/5) Resina hidrofílica com grupo carregado $-\text{CH}_2\text{-N}^+(\text{CH}_3)_3$
Caudal	1,0 ml/min
Tampão	TRIS/HCl 20 mM, pH 8,0
Eluição	20 ml em gradiente de NaCl de 0-1M
Detecção	280 nm

2.4.4 Electroforese SDS – PAGE

A electroforese é uma técnica que se baseia no facto de todas as proteínas apresentarem carga quando colocadas a um pH diferente do seu ponto isoeléctrico, permitindo deste modo analisar amostras proteicas heterogéneas. Devido à carga que possuem, as proteínas migram por acção de um campo eléctrico. Esta migração é diferente para cada proteína sendo função da respectiva densidade de carga (razão carga/massa).

A electroforese é normalmente efectuada num suporte que pode ser sílica gel, géis de amido, agár, papel de filtro, acetato de celulose, poliacrilamida, etc. Os géis apresentam vantagens em relação a outros suportes porque são meios porosos em que o tamanho dos poros é da mesma ordem de grandeza do tamanho das moléculas de proteína. Assim, eles funcionam como uma rede molecular e a separação dá-se não só em função da densidade de carga das moléculas, como também em função da respectiva massa molecular.

O gel de poliacrilamida é o mais utilizado não só porque a sua porosidade permite uma melhor separação relativamente a outros géis, como também pelo facto de ser um polímero sintético podendo ser preparado a partir de reagentes de elevado grau de pureza. Este tipo de gel tem também a vantagem de ser quimicamente inerte, estável numa gama extensa de pH, temperatura e força iónica.

A polimerização da acrilamida inicia-se pela adição de persulfato de amónio ou riboflavina. O TEMED – N, N, N',N'-tetrametiletlenodiamina é adicionado para acelerar o processo de polimerização. No sistema persulfato de amónio-TEMED, este último cataliza a formação de radicais livres no persulfato e este por sua vez inicia a polimerização da acrilamida.

A maior parte das electroforeses de proteínas em géis de acrilamida é efectuada em condições desnaturantes (SDS-PAGE). Utiliza-se uma solução tamponada para dissolver a amostra conseguindo-se deste modo a dissociação de todas as proteínas nas suas sub-unidades polipeptídicas. O composto utilizado para efectuar a dissociação é o detergente iónico dodecilsulfato (SDS). A amostra é desnaturada por aquecimento por aquecimento a cerca de 65°C durante 20 minutos, na presença de um excesso de SDS e de reagente tiólico (β -mercaptoetanol) para quebrar as ligações dissulfureto. Assim, nestas condições o SDS liga-se aos polipéptidos segundo uma razão de massas constante (1,4 gramas de SDS por grama de polipéptido). As cargas intrínsecas do polipéptido tornam-se insignificantes quando comparadas com as cargas negativas provenientes das moléculas de detergente ligadas. Desta forma, todos os complexos SDS-polipéptido possuem densidades de carga idêntica e migram em géis de poliacrilamida com porosidade adequada estritamente em função da sua massa molecular.

É possível determinar a massa molecular dos diferentes polipéptidos que constituem a amostra usando como referência a mobilidade electroforética de polipéptidos com massa conhecida, nas mesmas condições electroforéticas. Para isso, é feita a representação gráfica do logaritmo da massa molecular em função da distância de migração no gel de cada um dos polipéptidos de referência. A concentração do gel de poliacrilamida é um factor muito importante a considerar na determinação da massa molecular. Para uma dada concentração do gel a relação de migração entre o logaritmo da massa molecular e a distância de migração é linear apenas numa zona limitada de massas moleculares.

A revelação dos géis pode ser feita ou pelo método de coloração pelo nitrato de prata (necessita 0,3-0,5 ng/ μ l de proteína) ou pelo método de Coomassie (20-30 ng/ μ l proteína).

Preparação do gel para electroforese em condições desnaturantes

1º Preparar o gel separador

Concentração do gel	Volume de SGS ¹ (ml)	Volume de STGS ² (ml)	Volume de Água (ml)
12%P/2.6%C	5,0	4,5	2,5

2º Agitar, ligeiramente e sobre vácuo, o gel separador

3º Adicionar à totalidade do gel separador 250 µl de SDS⁴ e 250 µl de APS⁵ 10%

4º Adicionar, a 1 ml do gel separador, 15 µl de TEMED⁶ e, rapidamente, selar o fundo da câmara de electroforese (esta solução polimerisa em poucos segundos)

5º Adicionar, ao restante gel separador, 15 µl de TEMED e encher a câmara até 1.5 cm da superfície

6º Sobre o gel separador colocar isopropanol

7º Aguardar a gelificação

8º Preparar o gel colector

Concentração do gel	Volume de SGC ⁷ (ml)	Volume de STGC ³ (ml)	Volume de Água (ml)
3.1%P/20%C	2,0	0,5	5,5

9º Agitar, ligeiramente e sobre vácuo o gel colector

10º Verter o isopropanol da câmara de electroforese

11º Adicionar ao gel colector, 80 µl de SDS 10%, 80 µl de APS 10% e 15 µl de TEMED

12º Encher a câmara até à superfície e colocar o pente

13º Aguardar pela gelificação

14º Colocar os depósitos de electrólito e retirar o pente

15º Carregar as amostras

16º Iniciar a electroforese a 55 volts

17º Diminuir a diferença de potencial para 30 volts quando se alcançar o gel separador

Soluções:

¹ – SGS – solução de gel separador – 28,0% Acrilamida + 0,74% bis-Acrilamida

² – STGS – solução tampão TRIS/HCl – 1M tris/HCl pH 8,9

³ – STGC – solução tampão TRIS/HCl – 1M tris/HCl pH 6,8

- ⁴ – SDS – 10,0% SDS
- ⁵ – APS – solução de persulfato de amónio – 10,0% APS
- ⁶ – TEMED – tal qual ($\pm 99\%$)
- ⁷ – SGC – solução de gel colector – 10,0% Acrilamida + 2,50% bis-Acrilamida
- ⁸ – Electrólito – 50 mM tris + 192 mM Glicina + 0,1% SDS, pH 8,3
- ⁹ – 2x tampão A – 0,125 mM TRIS/HCl, pH 6,75 + 4% SDS + 10% 2-mercaptoetanol + 20% Glicerol + 0,002% Azul de bromofenol

Preparação das amostras

- 1º Dialisar
- 2º Concentrar
- 3º Diluir 1:1 com solução 2x tampão A⁹
- 4º Desnaturar 20 minutos a 65°C

Coloração das amostras

A coloração dos géis foi efectuada em agitador orbital, e foram utilizados os dois métodos de coloração de géis consoante a concentração de proteína das amostras a analisar.

- 1º Desmontar a câmara de electroforese e retirar cuidadosamente o gel separador

Método de coloração de Coomassie:

- Mergulhar o gel separador em solução corante
- Manter o gel, durante a noite, com agitação orbital ligeira
- Recolher a solução corante
- Efectuar lavagens sucessivas com solução descorante
- Envolver o gel em papel celofane e secar

Solução corante – 0,25% Azul de coomassie G-250 + 91 ml etanol + 91 ml H₂O + 18 ml CH₃COOH

Solução descorante – 200 ml de metanol (ou etanol) + 250 ml H₂O + 50 ml Ácido acético

Método de coloração do Nitrato de Prata:

Passo	Solução	Concentração final	Tempo
1- Fixação	- 100 ml metanol -24 ml ác. Acético -100 µl formaldeído - preencher até 200 ml com água	50% metanol 12% ác. Acético 0,05% formaldeído (37-40%)	20 minutos
2- Lavagem	-300 ml etanol -300 ml de água	50% etanol	3 x 6 min
3- Pré-tratamento	- preparar stock 100x:200 ml/10 ml H ₂ O - usar 2 ml de stock - preencher até 200 ml com água	200 mg/L Na ₂ S ₂ O ₃ .5H ₂ O (tiosulfato de sódio)	1 minuto
4- Lavagem	-água		3 x 20 segundos
5-Coloração	- 400 mg AgNO ₃ -150 µl formaldeído - preencher até 200 ml com água	2 mg/ml AgNO ₃ 0,75 ml/L formaldeído	10 minutos
6- Lavagem	-água		2 x 20 segundos
7-Revelação	-12 g Na ₂ CO ₃ -100 µl formaldeído -40 µl stock de tiosulfato de sódio - preencher até 200 ml com água	60 g/L Na ₂ CO ₃ 0,5 ml/L formaldeído 4 mg/L tiosulfato sódio	Até intensidade de cor desejada
8- Lavagem	-água		2 x 2 minutos
9- Paragem da reacção	- 100 ml metanol -24 ml ác. Acético - preencher até 200 ml com água	50% metanol 12% ác. Acético	5 minutos
10 – Lavagem	- 100 ml metanol - preencher até 200 ml com água	50% metanol	20 minutos

2.5 Determinação dos coeficientes de partição, rendimentos e recuperações para as proteínas maioritárias do soro de queijo - α -lactalbumina e β -lactoglobulina

Após o trabalho laboratorial referido nas secções anteriores, determinaram-se os coeficientes de partição para as proteínas α -lactalbumina e β -lactoglobulina nos sistemas testados.

O coeficiente de partição da α -lactalbumina e da β -lactoglobulina consiste na razão entre a concentração de proteína na fase superior e na fase inferior. A concentração de proteína na fase inferior foi determinada por balanço material, conhecendo a concentração de proteína na solução inicial, para evitar interações do polissacárido no método de doseamento.

O rendimento percentual de α -lactalbumina na fase superior – $Y_{\alpha l, S}$ (%) – calculou-se segundo a seguinte expressão:

$$Y_{\alpha l, S} = 100 / (1 + PI/PS \times 1/k_{\alpha l})$$

e corresponde à percentagem de α -lactalbumina presente no sistema bifásico aquoso, que se encontra na fase superior.

O rendimento percentual de β -lactoglobulina na fase inferior – $Y_{\beta l, I}$ (%) – calculou-se segundo a seguinte expressão:

$$Y_{\beta l, I} = 100 / (1 + PS/PI \times k_{\beta l})$$

e corresponde à percentagem de β -lactoglobulina presente no sistema bifásico aquoso, que se encontra na fase inferior.

O cálculo do grau de pureza foi efectuado tendo em consideração a composição de um soro comercial contendo 0.7 mg/ml de α -lactalbumina e 3 mg/ml de β -lactoglobulina (proporção 1:4). A proporção das proteínas α -lactalbumina e β -lactoglobulina no concentrado de soro (CP 80) da Quinta dos Ingleses utilizado neste trabalho é também de 1:4.

O grau de pureza teórico P (%) de cada proteína na sua fase de recuperação pode ser calculado por,

$$P_{\alpha la,S} = (100 \times Y_{\alpha la,S} \times 0.7) / (Y_{\alpha la,S} \times 0.7 + (100 - Y_{\beta lg,I}) \times 3)$$

$$P_{\beta lg,I} = 100 \times Y_{\beta lg,I} \times 3 / ((100 - Y_{\alpha la,S}) \times 0.7 + 3 Y_{\beta lg,I})$$

A recuperação de α -lactalbumina na fase superior do sistema bifásico representa a fracção de α -lactalbumina adicionada inicialmente ao sistema que se encontra na fase superior, e é calculada a partir da expressão:

$$R_{\alpha la,S} = ([\alpha la]_s \times m_s) / ([\alpha la]_i \times m_i) \times 100$$

A recuperação de β -lactoglobulina na fase inferior do sistema bifásico representa a fracção de β -lactoglobulina adicionada inicialmente ao sistema que se encontra na fase inferior, e é calculada a partir da expressão:

$$R_{\beta lg,I} = ([\beta lg]_{inf} \times m_{inf}) / ([\beta lg]_i \times m_i) \times 100$$

2.6 Extracção da fracção PP do concentrado proteico de soro

A extracção de fracção PP a partir do concentrado proteico de soro foi efectuada de acordo com o descrito por Inocente et al, 1998 (Figura 2.1).

A preparação do concentrado proteico para a extracção de fracção PP consistiu em pesar 200 gramas de concentrado proteico 80% seco e adicionar água destilada até fazer 1 litro. Esta solução foi homogeneizada com uma varinha mágica de modo a obter a dissolução completa do concentrado proteico.

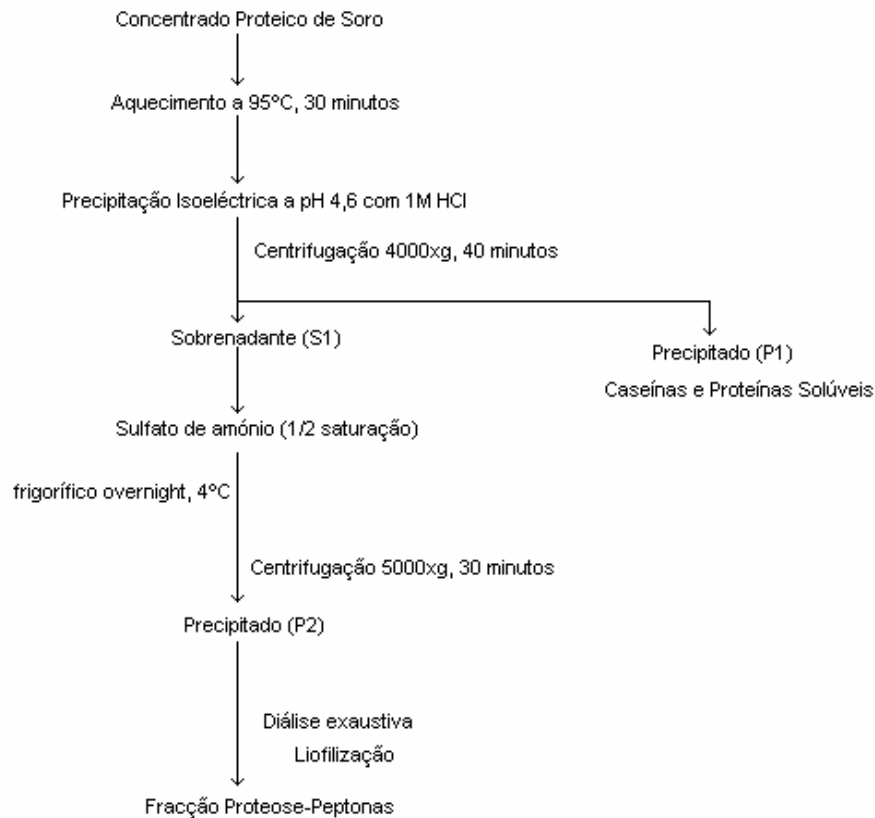


Figura 2.1 Procedimento de extracção da fracção PP (adaptado de Innocente et al, 1998)

2.7 Preparação de componente PP3 por cromatografia de interacção hidrofóbica – FPLC

O componente PP3 foi preparado a partir da fracção PP extraída do concentrado proteico de soro por cromatografia de interacção hidrofóbica, utilizando uma coluna Octyl Sepharose 4 Fast Flow (Supelco).

Foram efectuadas injeções de 500 µl de soluções de proteína (fracção PP) com uma concentração de 250 mg/ml.

As condições utilizadas encontram-se descritas na seguinte tabela:

Tabela 2.5 Condições utilizadas na cromatografia de interação hidrofóbica – FPLC.

Factor	Interação Hidrofóbica (Octyl Sepharose 4FF) Resina com ligando hidrofóbico – n-Octyl
Caudal	3,0 ml/min
Tampão	Fosfato de Potássio 1M, pH 7,0
Eluição	10 ml em gradiente de sal de 1-0M 15 ml em Água ultrapura
Detecção	280 nm

O componente PP3, sendo altamente hidrofóbico, é recolhido durante a eluição com água ultrapura, uma vez que os restantes componentes (PP5 e PP8) da fracção PP são eluídos durante o gradiente decrescente de sal.

O componente PP3 é então dialisado exaustivamente e liofilizado para posteriores ensaios de partição bifásica aquosa.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta secção apresentam-se os resultados experimentais obtidos em ensaios de fraccionamento e purificação de α -lactalbumina, β -lactoglobulina e componente PP3 em sistemas de partição bifásica aquosa. Foram testados sistemas bifásicos compostos por hidroxipropil amido purificado – Reppal PES 100, Fosfato de Potássio ou Sulfato de amónio e polietileno glicol. Os resultados são apresentados em 3 subsecções, a primeira para os resultados obtidos para as proteínas comerciais puras - α -lactalbumina e β -lactoglobulina, a segunda para os resultados obtidos com concentrado proteico de soro e finalmente a última para os resultados obtidos com o componente PP3.

As variáveis calculadas para avaliar a partição das proteínas comerciais em estudo são o coeficiente de partição e o rendimento na fase superior ou inferior consoante se trate de α -lactalbumina ou β -lactoglobulina.

Para o sistema PEG-Reppal estudaram-se os efeitos de:

- pH (4,0; 5,0; 7,0 e 9,0)
- massa molecular de PEG (600/900/1500/6000/8000/10000/20000)
- concentração de polímero PEG (5, 6 e 7% p/p)
- tipo de iões em solução (K^+ , Na^+ , I^- , SO_4^{2-} , SCN^- , Cl^-)
- força iónica (0, 100, 200 e 500 mM K_2SO_4)

Para o sistema PEG-Sulfato estudaram-se os efeitos de:

- pH (6,0; 7,0 e 8,0)
- massa molecular de PEG (600/900/1500/6000/8000/10000)
- concentração de polímero PEG (14, 16 e 18% p/p)
- tipo de iões em solução (K^+ , Na^+ , I^- , SO_4^{2-} , SCN^- , Cl^-)
- força iónica (0, 200, 400 e 600 mM NaCl)

Para o sistema PEG-Fosfato estudaram-se os efeitos de:

- pH (6,0; 7,0 e 8,0)
- massa molecular de PEG (600/900/1500/6000/8000/10000)
- concentração de polímero PEG (14, 16 e 18% p/p)

3.1 Partição das proteínas comerciais puras - α -lactalbumina e β -lactoglobulina

A fracção proteica do soro contém um grupo de proteínas globulares de entre as quais a α -lactalbumina e a β -lactoglobulina, que representam 20 e 50 %, respectivamente, da proteína total do soro, sendo portanto maioritárias. Estas duas proteínas têm propriedades bastante semelhantes. Os seus pesos moleculares são de 14 kDa e 18 kDa, respectivamente, e os seus pontos isoeléctricos de 4,2-4,8 e 5,2 (Etzel, 1995).

3.1.1 Sistemas compostos por PEG e Reppal PES 100 – SISTEMA POLIMERO-POLIMERO

A tabela 3.1 apresenta a composição dos sistemas bifásicos testados, em termos da percentagem em massa (100 x massa de polímero / massa do sistema bifásico) de cada polímero.

Nestes sistemas foram utilizadas soluções de PEG com massas moleculares de 600, 900, 1500, 6000, 8000, 10000 e 20000.

Os valores de pH testados foram 4,0; 5,0; 7,0 e 9,0.

Foram efectuados ensaios na ausência e presença de NaCl 0,6M nos sistemas preparados na gama de pesos moleculares elevados de PEG.

Nos sistemas em que se usou a gama de pesos moleculares elevados de PEG foi avaliado o efeito do tipo de iões em solução, bem como da força iónica.

Tabela 3.1 Composição dos sistemas PEG-Reppal estudados

PEG (% p/p)	Reppal PES 100 (% p/p)
5	13
6	13
7	13

As Figuras 3.1, 3.2 e 3.3 apresentam os resultados obtidos para o sistema PEG-Reppal para a α -lactalbumina e β -lactoglobulina respectivamente, utilizando a gama de pesos moleculares elevados, na ausência e presença de NaCl.

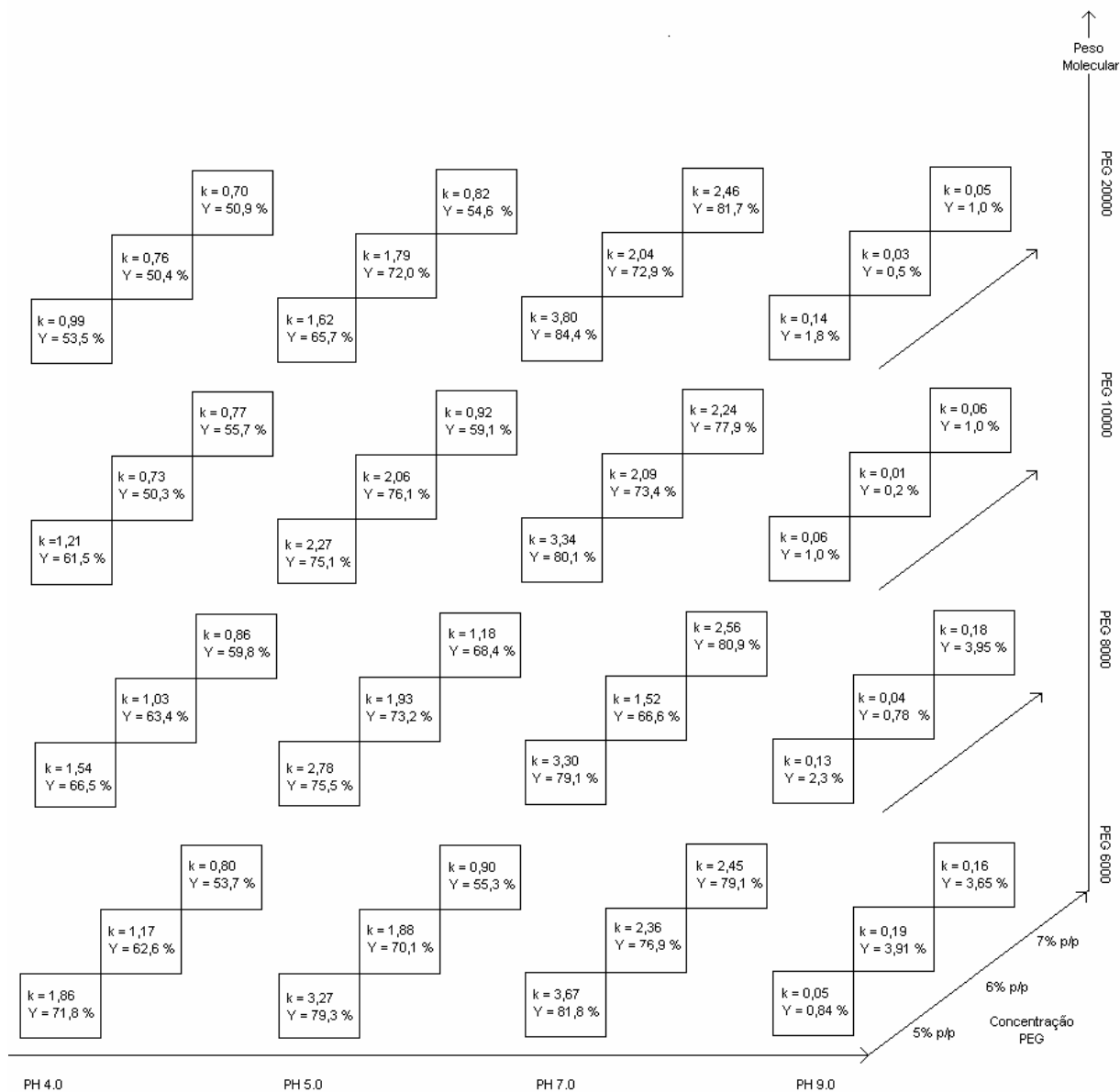


Figura 3.1 Sistemas compostos por PEG e Reppal PES 100 na gama de elevados pesos moleculares de PEG, na ausência de NaCl para purificar α -lactalbumina (k – coeficiente de partição e Y – rendimento em α -lactalbumina na fase superior).

Da análise da Figura 3.1 pode-se verificar que existem algumas variações impostas ao nível do pH, massa molecular e concentração de PEG que permitem obter condições de purificação atraentes. Os melhores resultados em termos de coeficiente de partição e rendimento de α -lactalbumina na fase superior (Yola,S) obtiveram-se para pH 7,0 com os sistemas contendo 5% p/p de PEG 6000, PEG 10000 e PEG 20000 e, para pH 7,0 no sistema com 7% p/p de PEG 8000.

Segue-se uma análise mais detalhada das variáveis em estudo resultantes das alterações impostas aos três parâmetros.

Efeito do pH

A variação do coeficiente de partição da α -lactalbumina e o seu rendimento para a fase superior com o pH é significativa, verificando-se um aumento do coeficiente de partição e Y_{01} , S com o pH até pH 7,0 e depois um grande decréscimo para pH 9,0.

Neste sistema PEG – Reppal a força iónica é muito reduzida, o que minimiza as diferenças de potencial electrostático entre as duas fases, e portanto o efeito da variação do pH deveria ser também minimizado o que não se verificou.

Por outro lado, o PEG devido à presença dos átomos de oxigénio da ligação entre os monómeros, pode estabelecer pontes de hidrogénio com moléculas de água e atrair os catiões presentes. A fase rica em PEG torna-se então mais rica em cargas positivas que a fase inferior do sistema bifásico aquoso.

Abaixo do ponto isoeléctrico a carga da proteína é positiva e consequentemente esta é repelida pela fase superior rica em PEG apresentando coeficientes de partição mais baixos. No seu ponto isoeléctrico a proteína tem carga nula estando pouco dependente da força iónica. Acima do seu ponto isoeléctrico a proteína apresenta carga negativa e é atraída para a fase superior. Assim, sendo o ponto isoeléctrico da α -lactalbumina de 4,2-4,8, um aumento do pH promove um aumento do coeficiente de partição tal como se observa nos resultados experimentais obtidos à excepção dos ensaios efectuados a pH 9,0, em que se obtiveram valores extremamente baixos. Pensa-se que poderá ter ocorrido precipitação de proteína a este pH. O doseamento de proteína total foi efectuado em amostras da fase superior, rica em PEG, sendo os valores de concentração de proteína na fase inferior determinados por balanço material. Então, se ocorrer precipitação, a proteína acumula-se na fase inferior ou na interface e portanto os coeficientes de partição calculados são mais baixos.

Efeito da massa molecular relativa do PEG

A massa molecular dos polímeros influencia a partição de proteínas em sistemas bifásicos aquosos.

O sistema estudado não parece muito sensível à variação da massa molecular relativa do PEG, as variáveis em estudo mantêm valores muito próximos e com uma tendência geral para diminuir à medida que se aumenta o peso molecular do PEG.

O efeito do peso molecular do PEG foi avaliado mantendo todas as outras condições constantes.

O efeito da massa molecular de um dos componentes do sistema é mais notório para proteínas de tamanho maior, ou seja para proteínas de peso molecular superior a 50 kDa.

O aumento do peso molecular de PEG promove um aumento de densidade da fase superior, que corresponde a uma diminuição do volume livre e conseqüentemente do volume excluído de PEG, pelo que a proteína tem cada vez mais dificuldade em se acomodar na fase rica nesse polímero. Analisando a Figura 3.1 verifica-se que independentemente do pH à medida que se aumenta o peso molecular do PEG o coeficiente de partição da α -lactalbumina vai diminuindo.

Efeito da concentração de PEG

O aumento da concentração de PEG dirige a partição da proteína para a outra fase oposta à fase rica no polímero em causa – efeito de exclusão. De um modo geral observou-se esta tendência, ou seja um incremento da concentração de PEG resultou numa diminuição da partição da α -lactalbumina para a fase superior, embora em algumas situações a diferença entre o coeficiente de partição obtido para uma concentração de PEG de 5% p/p e 7% p/p não seja muito significativa.

A Figura 3.2 apresenta os resultados obtidos para a β -lactoglobulina com os mesmos sistemas estudados anteriormente.

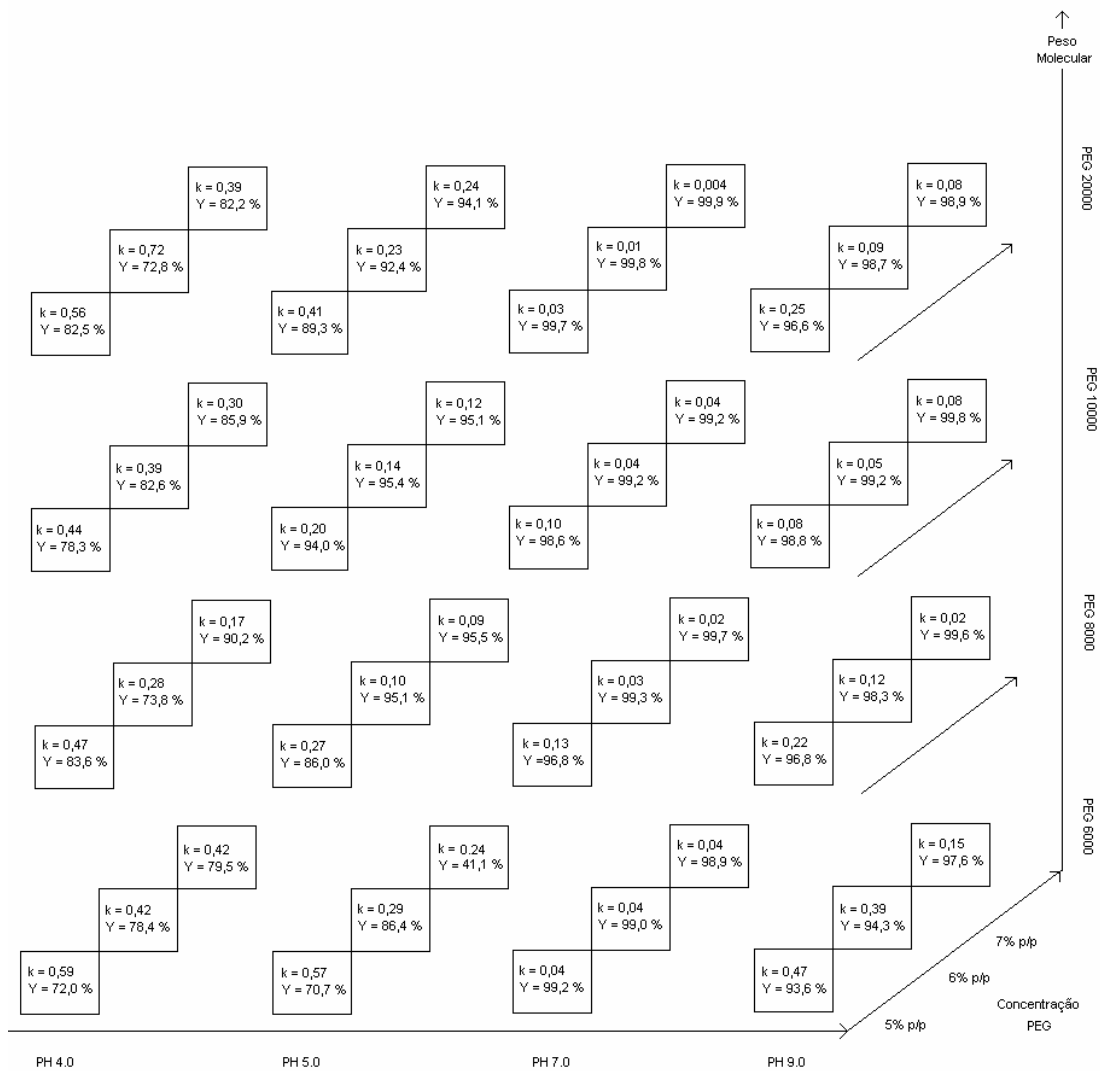


Figura 3.2 Sistemas compostos por PEG e Reppal PES 100 na gama de elevados pesos moleculares de PEG, na ausência de NaCl para purificar β -lactoglobulina (k – coeficiente de partição e Y – rendimento em β -lactoglobulina na fase inferior) .

Da análise da Figura 3.2 pode-se verificar que de um modo geral a β -lactoglobulina se desloca para a fase inferior dos sistemas, embora as variações impostas ao nível do pH, massa molecular e concentração de PEG não sejam muito significativas. Os melhores resultados em termos de coeficiente de partição e rendimento de β -lactoglobulina na fase inferior ($Y_{\beta Ig, I}$) obtiveram-se para pH 7,0 no sistema com 7% p/p PEG 20000. Os ensaios efectuados a pH 7,0 foram os que permitiram os rendimentos mais elevados e coeficientes de partição mais baixos ou seja uma maior partição da β -lactoglobulina para a fase inferior.

Segue-se uma análise mais detalhada das variáveis em estudo resultantes das alterações impostas aos três parâmetros.

Efeito do pH

A variação do coeficiente de partição e rendimento da β -lactoglobulina para a fase inferior com o pH não é muito significativa, verificando-se uma diminuição do coeficiente de partição (e aumento de rendimento de proteína na fase inferior) especialmente para pH 7,0 voltando a subir para pH 9,0.

O aumento do coeficiente de partição da β -lactoglobulina a pH 9,0 pode estar relacionada com o aumento de proteína desnaturada em suspensão no sistema, já que a partir de pH 8,6 a β -lactoglobulina sofre desnaturação irreversível (Visser e Jeurink, 1997; Grosch, 1987; Dumay e Cheftel, 1989).

Esta proteína é extremamente influenciada pelo pH no que respeita à sua conformação pelo que, o efeito do pH não pode ser contabilizado apenas em termos de interações electrostáticas mas também com base no peso molecular da proteína, já que a pH entre 5,20 e 6,70 a β -lactoglobulina apresenta-se como um dímero com massa molecular relativa de 32 kDa, mas a pH entre 3,50 e 5,20 já se apresenta como um octómero com massa molecular relativa de 147 kDa e apenas para pH <3,50 se apresenta na forma de monómero com massa molecular relativa de 18 kDa. Ou seja para a β -lactoglobulina é mais notório o efeito do peso molecular de PEG que para a α -lactalbumina, especialmente para valores de pH entre 3,50 e 6,70.

Neste sistema a força iónica é muito reduzida pelo que as diferenças de potencial electrostático entre as duas fases são minimizadas e consequentemente o efeito da variação do pH.

Para pH 4,0 e 5,0 estamos perante octómeros (147 kDa) sendo portanto mais pronunciados os efeitos do peso molecular e da concentração do polímero que para pH 7,0, ou seja, o efeito do pH não está indissociado dos restantes parâmetros do sistema.

Efeito da massa molecular relativa do PEG

Os sistemas estudados não parecem muito sensíveis à variação do peso molecular do PEG, as variáveis em estudo mantêm valores muito próximos e com uma tendência geral para diminuir o coeficiente de partição da β -lactoglobulina com o

aumento do peso molecular, à excepção dos ensaios realizados com PEG 20000 em que se registaram valores mais elevados. Relativamente ao PEG 20000, sendo este muito hidrofóbico poderão estar a ocorrer interacções hidrofóbicas entre a proteína e a fase rica em PEG e daí os valores mais elevados, enquanto que, com os polímeros de outros pesos moleculares estão a predominar os efeitos de exclusão.

Efeito da concentração de PEG

O aumento da concentração de PEG dirige a partição da proteína para a fase oposta á fase rica em polímero. Assim, seria de esperar que o coeficiente de partição da β -lactoglobulina fosse diminuindo com o aumento da concentração de PEG. Apesar da tendência registada ter sido de diminuição do coeficiente de partição com o aumento da concentração de PEG, isto nem sempre se verificou, na realidade os valores obtidos dentro de uma mesma série (pH e peso molecular de PEG constantes) são muito semelhantes não havendo grandes diferenças entre os valores registados para uma concentração de 5% e 7% de PEG.

Comparando os resultados obtidos para o mesmo sistema para ambas as proteínas podemos afirmar que a α -lactalbumina se particiona preferencialmente para a fase superior enquanto que a β -lactoglobulina se particiona para a fase inferior.

A pH 9,0 não é possível verificar esta tendência possivelmente porque nestas condições mais agressivas ocorre precipitação de proteína e consequentemente surgem valores de coeficientes de partição falseados.

De um modo geral, é a pH 7,0 que se verificam os melhores resultados em termos de partição das proteínas, por dois motivos, primeiro porque para $\text{pH} > 6,50$ aumenta a reactividade do grupo sulfidriolo à superfície da β -lactoglobulina, e em segundo porque para $\text{pH} > 8,60$ ocorre desnaturação da proteína. Foi também para a concentração de 7% p/p de PEG 20000 que se verificou a maior diferença entre os coeficientes de partição obtidos. Contudo trabalhar com PEG 20000 é bastante complicado dada a sua elevada viscosidade e devido a um aumento da precipitação das proteínas, pelo que se optou por trabalhar a pH 7,0 com PEG de pesos moleculares inferiores.

Dentro destes resultados seleccionaram-se as melhores condições para testar a separação das duas proteínas num concentrado proteico de soro (secção 3.2).

Foi avaliada nestes sistemas a influência da força iónica nos coeficientes de partição, para o efeito foi introduzido nos sistemas anteriormente apresentados 0,6 M de cloreto de sódio.

As interacções predominantes no sistema bifásico são de carácter hidrofóbico. A presença de sais altera as forças de interacção entre o polímero hidrofóbico PEG e a proteína. De um modo geral, o aumento da força iónica promove um aumento das interacções hidrofóbicas. Assim, em seguida apresentam-se as figuras 3.3 e 3.4 que correspondem aos sistemas efectuados na presença de sal.

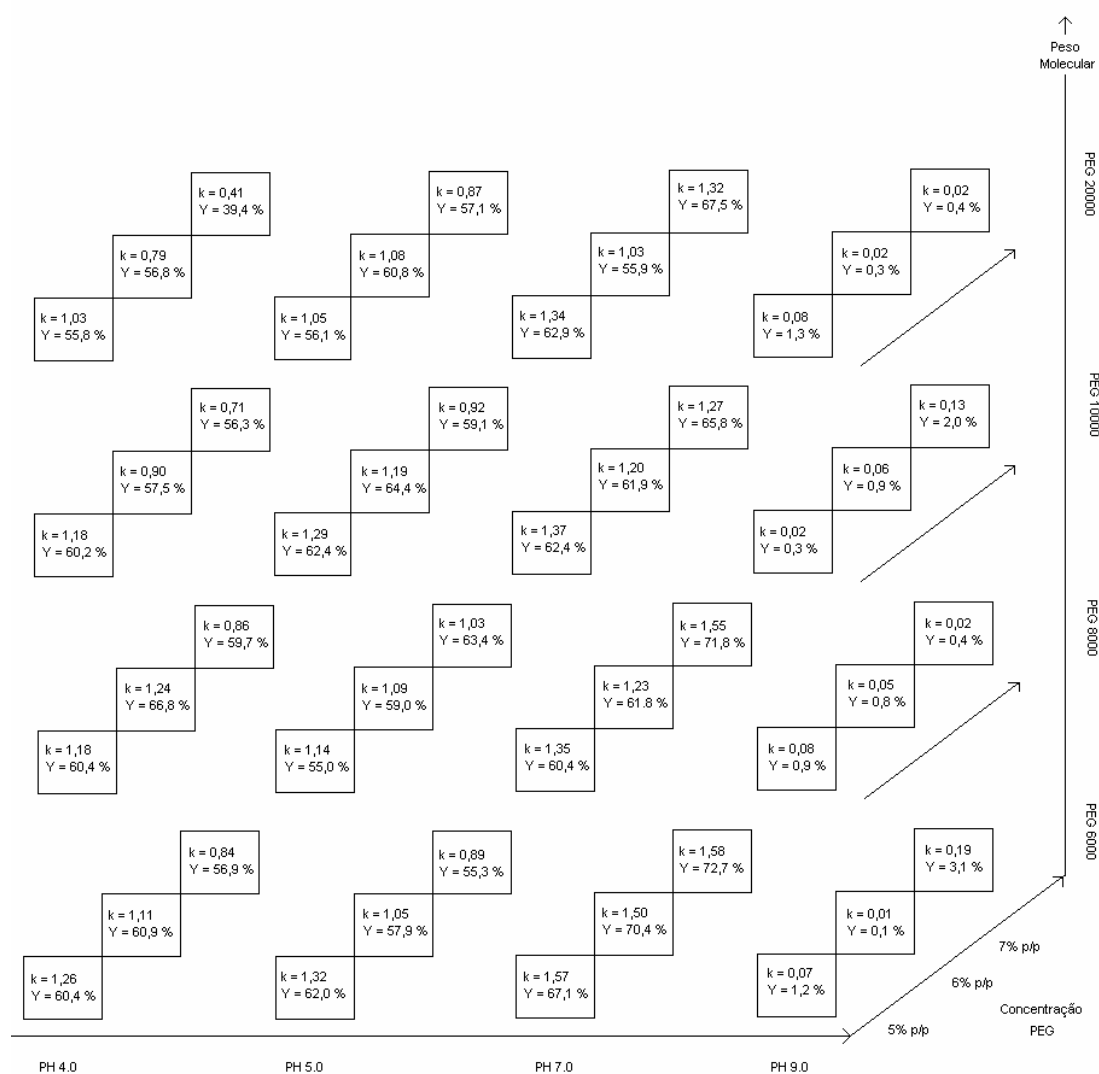


Figura 3.3 Sistemas compostos por PEG e Reppal PES 100 na gama de elevados pesos moleculares de PEG, na presença de 0,6 M NaCl para purificar α -lactalbumina.

De um modo geral (à exceção de pH 9,0) os valores de coeficiente de partição obtidos são bastante constantes entre 0,1-1,0, ou seja a partição é mais ou menos semelhante em ambas as fases donde se depreende que a introdução de NaCl promoveu uma diminuição dos coeficientes de partição, ou seja a introdução de NaCl não é benéfica para a partição de α -lactalbumina na fase superior.

Tal como se verificou anteriormente é a pH 7,0 que se obtêm os melhores resultados e, as tendências observadas anteriormente com a variação do peso molecular e concentração de PEG mantêm-se.

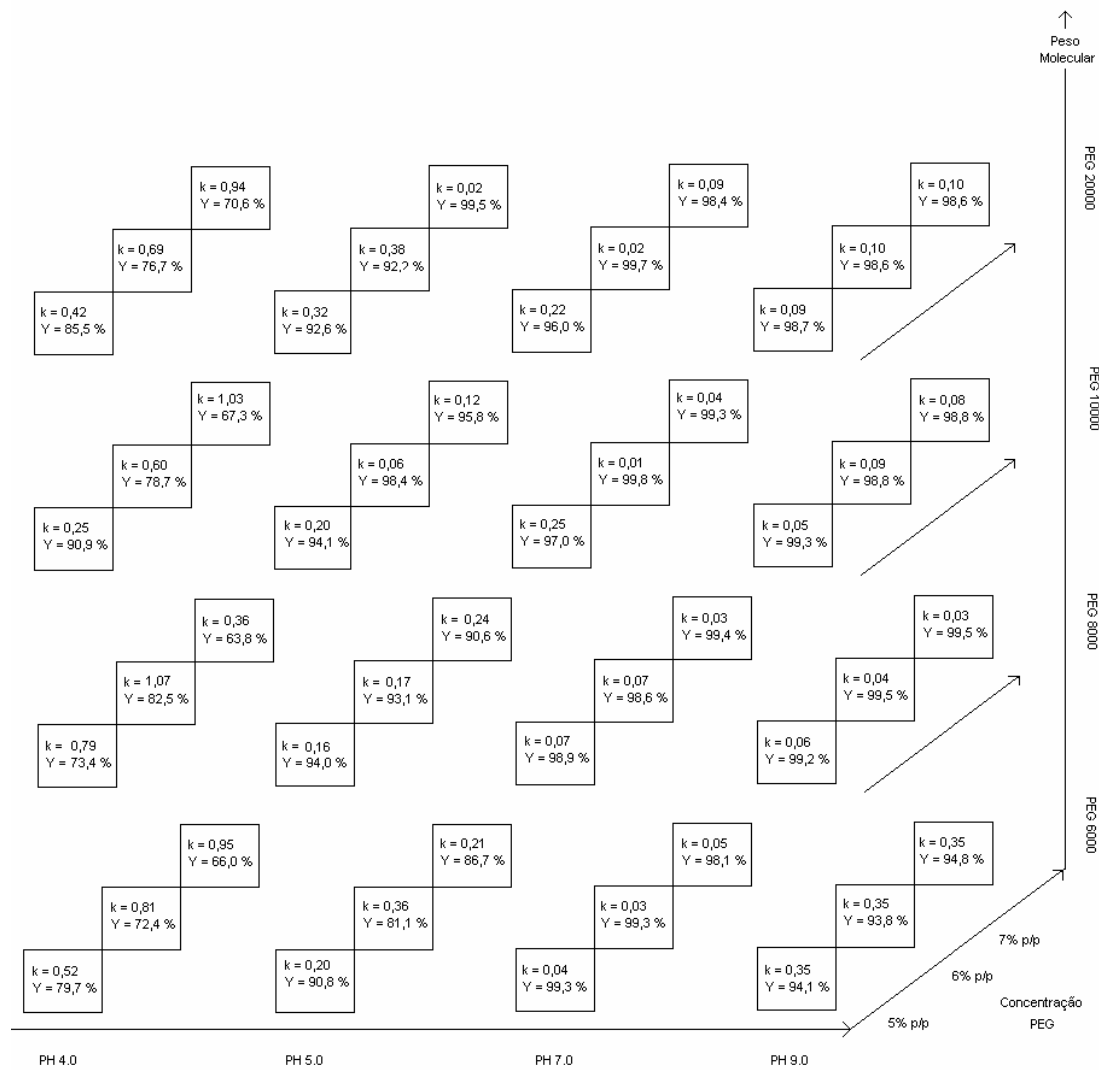


Figura 3.4 Sistemas compostos por PEG e Reppal PES 100 na gama de elevados pesos moleculares de PEG, na presença de 0,6 M NaCl para purificar β -lactoglobulina.

Na realidade, a adição de NaCl altera a composição das fases e diminui o volume livre na fase superior, pelo que seria de esperar uma diminuição do coeficiente de partição, como se verificou.

A introdução de 0,6 M NaCl no sistema PEG-Reppal para a purificação da proteína β -lactoglobulina não se mostrou muito significativa, embora se tenha verificado uma tendência para um ligeiro aumento dos coeficientes de partição, o que pode ser explicado por um aumento das interações hidrofóbicas da proteína com a fase PEG. Os efeitos da variação do pH, peso molecular e concentração de PEG verificados anteriormente mantêm-se com a introdução de sal no sistema. Também no caso da β -lactoglobulina é a pH 7,0 que se observam os melhores resultados em termos de partição da proteína para a fase inferior.

De um modo geral, a introdução de 0,6 M de NaCl não se mostrou vantajosa para ambas as proteínas, uma vez que se pretende obter as duas proteínas em fases diferentes de forma a conseguir separá-las posteriormente num concentrado proteico de soro.

O comportamento dos sistemas bifásicos com a introdução de sais univalentes foi explicado por Zaslavsky et al (1995). Estes demonstraram que, em sistemas PEG-dextrano os sais compostos por iões univalentes (por exemplo NaCl) têm coeficientes de partição próximos de 1 ou seja distribuem-se igualmente em ambas as fases do sistema, e essa tendência foi verificada no caso da α -lactalbumina em que os coeficientes de partição diminuíram para se aproximarem de 1, e também no caso da β -lactoglobulina em que os coeficientes de partição aumentaram aproximando-se também de 1.

Zaslavsky et al (1995) demonstraram ainda que aumentando as concentrações de sais univalentes (acima de 0,1 M) em sistemas PEG-dextrano implica uma alteração da composição das fases, sem contudo se registar um efeito significativo na posição da binodal.

Estes autores demonstraram que a presença de sais multivalentes tais como o fosfato, sulfato e tartarato mostram uma tendência crescente de partição na fase inferior, fase rica em dextrano, com concentrações de sal crescentes e distanciamento do ponto crítico. Estes sais alteram significativamente quer a composição das fases, quer a posição da binodal, nos sistemas PEG-dextrano. Geralmente a binodal é deslocada para

concentrações inferiores de polímero. O facto de os sais multivalentes serem rejeitados para a fase inferior é compreensível uma vez que, estes formam por si só sistemas bifásicos aquosos com PEG a concentrações elevadas de ambas as espécies.

A adição de sais a sistemas bifásicos aquosos pode ser usada efectivamente para alterar o coeficiente de partição das proteínas. Geralmente, para proteínas com carga negativa em sistemas PEG-dextrano o coeficiente de partição diminui ao longo das séries de iões $\text{HPO}_4^{2-} > \text{SO}_4^{2-} > \text{F}^- > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^- > \text{SCN}^- > \text{ClO}_4^-$ e $\text{Li}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+$, verificando-se o contrário para proteínas com carga positiva.

Por outro lado, o aumento da força iónica produz um aumento do efeito hidrófobo. O aumento do número de iões em solução provoca uma diminuição do número de moléculas de água livres para a solvatação hidrófoba, o que origina uma maior tendência de agrupamento de solutos apolares. Será então de esperar um deslocamento dos solutos apolares para a fase rica no polímero mais hidrófobo (PEG).

A partição das proteínas é afectada pela diferença de potencial electroquímico entre as duas fases, mas também depende das propriedades de solvatação das fases, isto é, a alteração do carácter hidrofóbico e hidrofílico da proteína em solução.

Por exemplo, uma proteína hidrofílica como a lisozima, na presença de NaCl, seria de esperar que um aumento no comprimento da “tie-line” resultasse num aumento da hidrofiliidade da fase inferior, fazendo portanto dele um melhor solvente. Contudo, observa-se o contrário, a lisozima particiona-se para a fase superior. Isto pode ser devido a uma alteração na conformação da proteína quando é adicionado cloreto de sódio, isto é, os resíduos hidrofóbicos no interior da proteína podem ficar expostos à superfície e portanto torná-la mais hidrofóbica.

Assim, conclui-se que a diferença de potencial electrostático por si só não é suficiente para dirigir a partição, mas que outros factores tais como, as interações hidrofóbicas e possíveis associações de proteínas são também importantes (Hartounian, 1994).

Assim, escolheu-se o sistema 13% p/p Reppal, 7% p/p PEG6000, pH 7,0, para avaliar o efeito da introdução de 100 mM de vários sais nomeadamente, KI, Na_2SO_4 , KSCN, KCl e K_2SO_4 .

No caso da α -lactalbumina (Figura 3.5) verificou-se que, qualquer dos sais introduzidos promovia um decréscimo do coeficiente de partição, sendo este mais acentuado para as situações em que se usou KCl, KI e KSCN, como seria de esperar teoricamente.

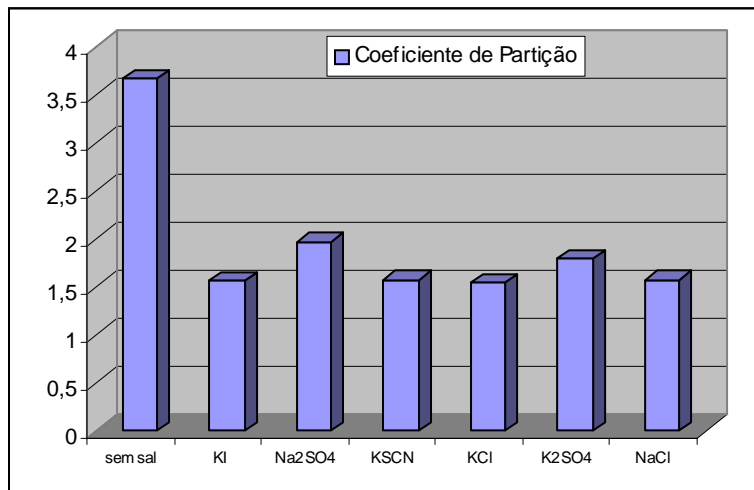


Figura 3.5 Efeito da adição de sais na partição da α -lactalbumina no sistema 13% p/p Reppal + 7% p/p PEG6000, pH 7,0.

Estes resultados estão de acordo com os apresentados por Albertsson (1971) com a ficoeritrina, ou seja, os coeficientes de partição mais elevados surgem na presença de sulfato de amónio e os mais baixos na presença de NaCl. De acordo com Melander e Horváth (1977) esta tendência resulta da variação de tensão interfacial, que é diferente para cada tipo de sal, e que altera as interações hidrofóbicas. Assim, o incremento da tensão superficial é maior para o sulfato de amónio e menor para o cloreto de sódio. Segundo estes autores, o aumento de concentração de sal presente provocaria também um aumento das interações hidrofóbicas. Este efeito de concentração do sal foi avaliado para o sulfato de potássio no mesmo sistema (Figura 3.6) as concentrações 100, 200 e 500 mM. Contudo, este efeito não se verificou pois o aumento das interações hidrofóbicas promove uma maior partição da proteína na fase rica em polímero hidrofóbico (PEG) e foi observado o contrário. Uma possível explicação para o sucedido poderá ser uma maior precipitação de proteína à medida que se aumenta a concentração de sal, proteína essa que se acumula na fase inferior ou na interface não sendo contabilizada.

Por outro lado, uma vez que a alteração na diferença de potencial electrostático entre as duas fases devido ao aumento da concentração de sal é baixo, a diminuição do coeficiente de partição da α -lactalbumina deve-se a outros efeitos.

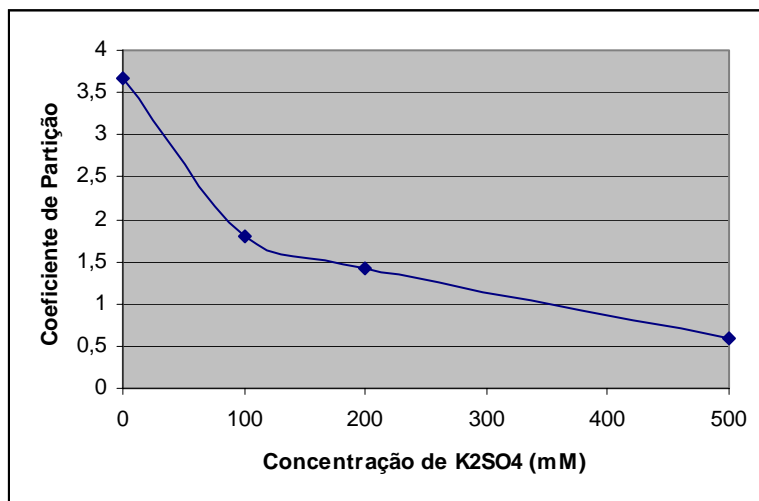


Figura 3.6 Efeito da concentração de sulfato de potássio na partição da α -lactalbumina no sistema 13% p/p Reppal + 7% p/p PEG6000, pH 7,0.

No caso da β -lactoglobulina verificou-se também que a introdução de sais promovia um decréscimo dos coeficientes de partição e a tendência observada para a α -lactalbumina não foi tão clara neste caso (Figura 3.7). Na realidade, a introdução de NaCl não provocou qualquer alteração e os sais KI, KCl e KSCN não provocaram o efeito previsto teoricamente, tendo em consideração que a este pH a proteína se apresenta com carga negativa.

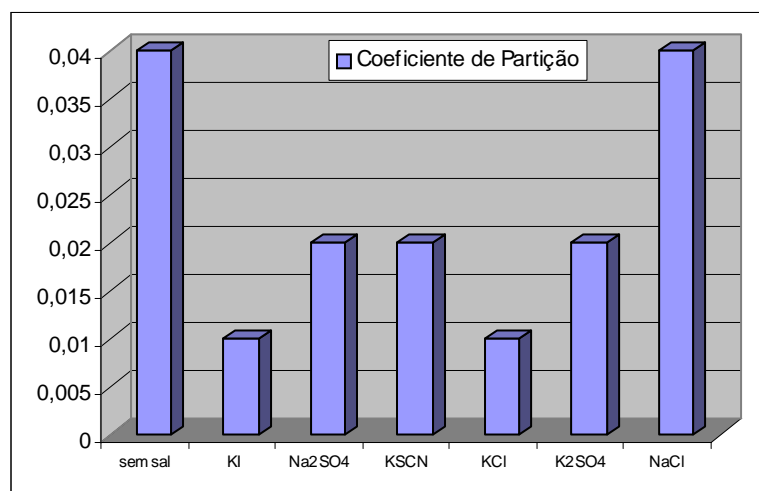


Figura 3.7 Efeito da adição de sais (100 mM) na partição da β -lactoglobulina no sistema 13% p/p Reppal + 7% p/p PEG6000, pH 7,0.

Relativamente ao efeito da concentração de sulfato de potássio no sistema 13% p/p Reppal, 7% p/p PEG6000, pH 7,0 tal como observado para a α -lactalbumina, verificou-se uma diminuição dos coeficientes de partição (Figura 3.8).

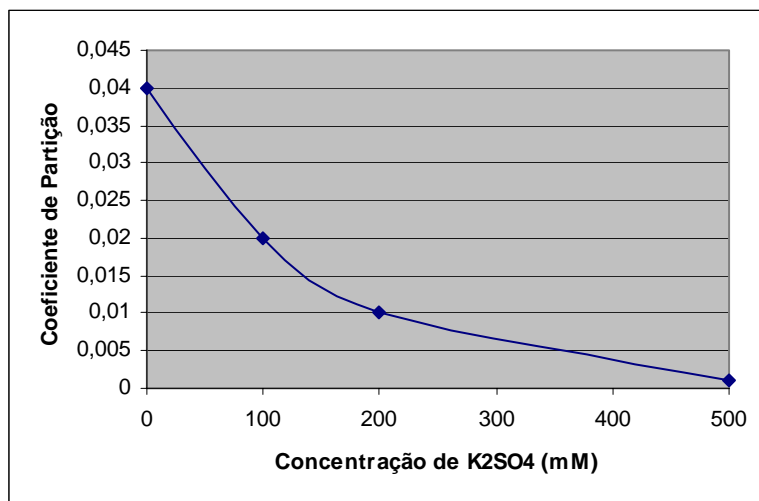


Figura 3.8 Efeito da concentração de sulfato de potássio na partição da β -lactoglobulina no sistema 13% p/p Reppal + 7% p/p PEG6000, pH 7,0.

De forma a completar o estudo deste sistema optou-se por fazer uma série de ensaios com PEG numa gama de pesos moleculares mais baixos (PEG 600, PEG 900 e PEG 1500), contudo, a composição destes sistemas teve que ser alterada, pois nesta gama de pesos moleculares é necessária uma quantidade maior de polímero para formar duas fases. Assim, estudaram-se sistemas com composições de PEG de 20% p/p, 22% p/p e 24% p/p e com 14% p/p Reppal.

Como o aumento da concentração do polímero pode por si só acarretar uma alteração na partição, o efeito do peso molecular nesta gama inferior de pesos moleculares não pode ser comparado com os resultados anteriores obtidos para a gama elevada de pesos moleculares. Assim, os resultados obtidos para ambas as proteínas nesta gama de pesos moleculares encontram-se reunidos nas Figuras 3.9 e 3.10.

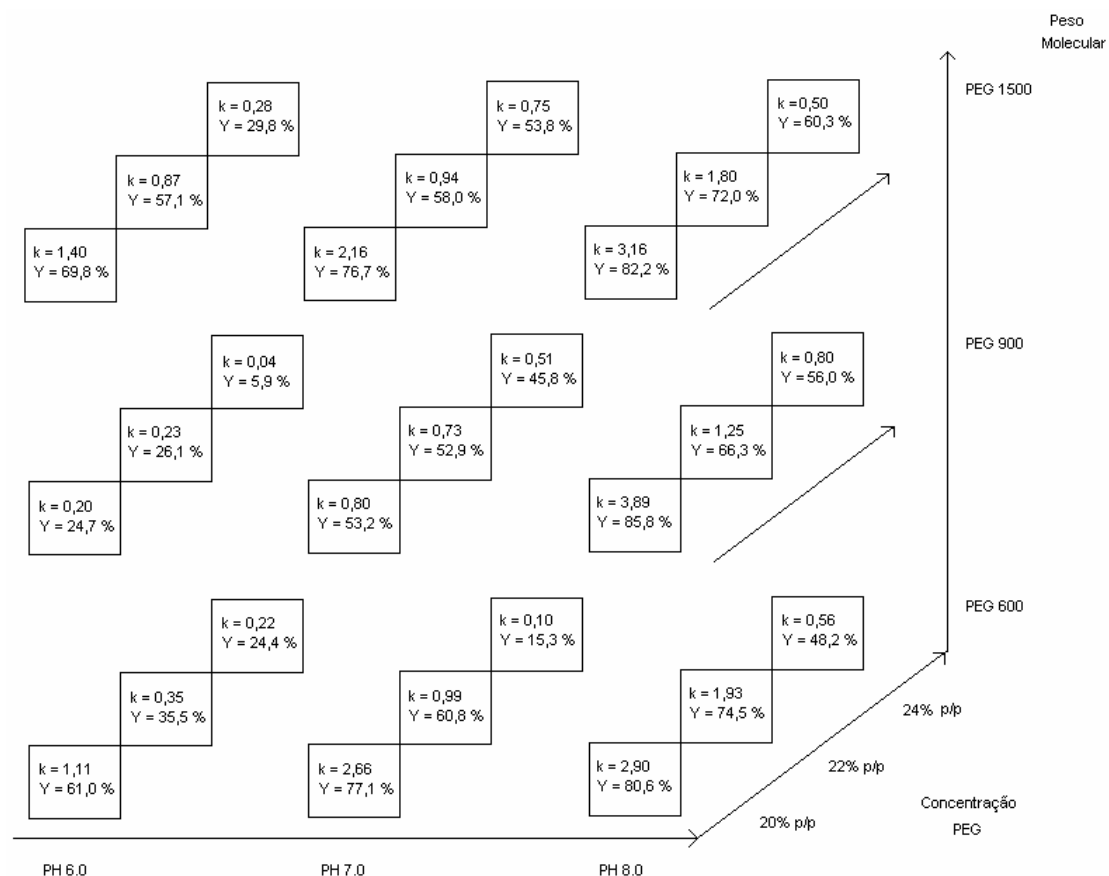


Figura 3.9 Sistemas compostos por PEG e Reppal PES 100 na gama de baixos pesos moleculares de PEG, na ausência de NaCl para purificar α -lactalbumina.

De um modo geral verificou-se que os valores dos coeficientes de partição são inferiores aos obtidos anteriormente na gama de elevados pesos moleculares de PEG, isto provavelmente deve-se ao facto de serem necessárias concentrações de PEG muito superiores para formar duas fases o que provoca uma maior precipitação de proteína, já que o PEG é vulgarmente utilizado como agente precipitante. Confirmam-se as tendências anteriormente verificadas, ou seja um aumento do coeficiente de partição com o pH e uma diminuição do coeficiente de partição com a concentração e peso molecular do PEG. Os melhores resultados em termos de partição da proteína para a fase superior são obtidos para pH 8,0 e 20% p/p PEG 900 + 14% p/p, contudo o melhor resultado em termos de rendimento é obtido para pH neutro e 20% p/p PEG1500. É de notar que estes sistemas estão muito sujeitos a precipitação proteica uma vez que são usadas concentrações muito elevadas de PEG.

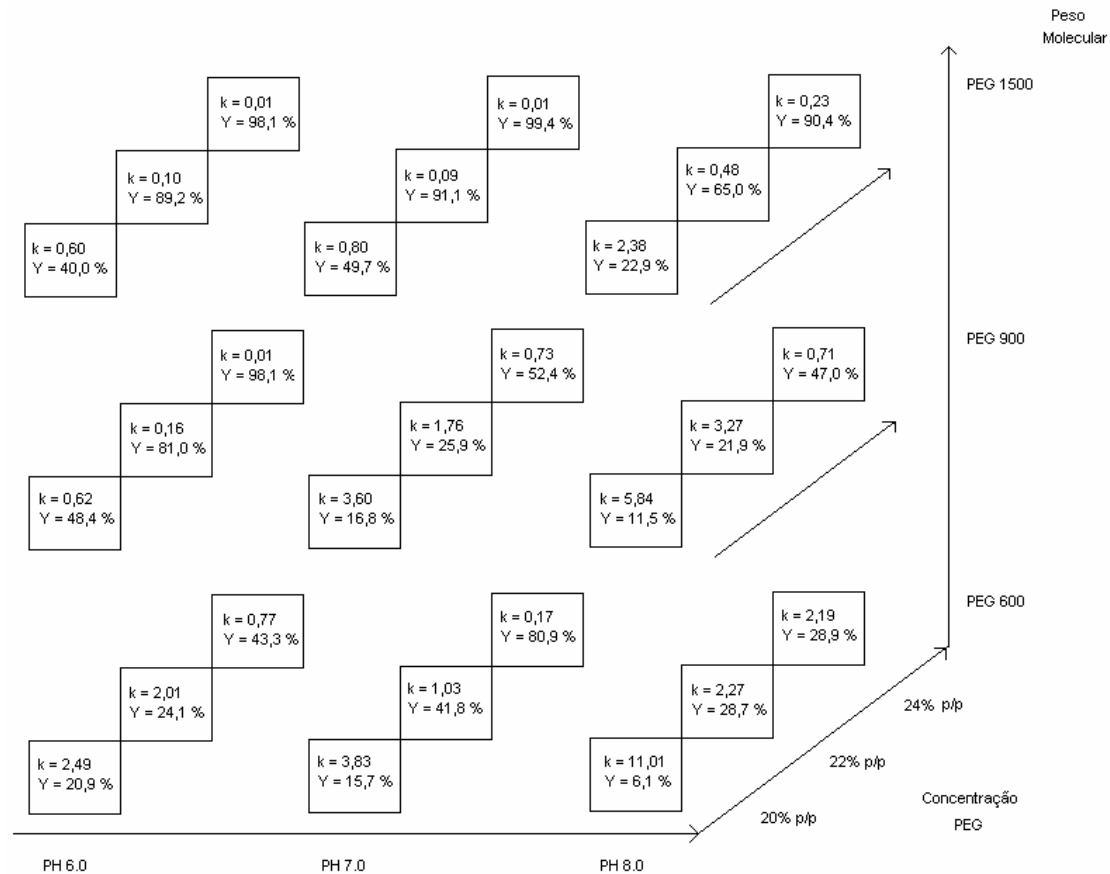


Figura 3.10 Sistemas compostos por PEG e Reppal PES 100 na gama de baixos pesos moleculares de PEG, na ausência de NaCl para purificar β -lactoglobulina.

Quando comparados com os valores anteriormente obtidos verifica-se que os coeficientes de partição são na sua grande maioria superiores, ou seja a β -lactoglobulina desloca-se para a fase superior, o que seria de esperar pois quanto menor o peso molecular do polímero, menor a densidade da fase superior, maior o volume livre e portanto maior a facilidade da proteína para se acomodar nessa fase. Verificou-se na maioria das situações que um aumento de pH promove um aumento do coeficiente de partição e, um aumento de peso molecular e concentração de polímero promove uma diminuição do coeficiente de partição. As melhores condições obtiveram-se para pH 6,0 uma vez que interessa obter a proteína na fase inferior do sistema, contudo, os melhores rendimentos obtêm-se para pH neutro. A situação ideal para maximizar a partição da β -lactoglobulina na fase inferior obtêm-se para 24% p/p PEG 1500 + 14% p/p Reppal e pH 7,0.

Comparando os resultados obtidos na gama de baixos pesos moleculares para ambas as proteínas conclui-se que dificilmente com um sistema destes se consegue efectuar a separação das duas proteínas num concentrado proteico, uma vez que os seus coeficientes de partição são muito semelhantes e próximos de 1 (proteína igualmente distribuída entre as duas fases).

Para o sistema 24% p/p PEG 1500 + 14% p/p Reppal, pH 7,0 obtém-se um coeficiente de partição de 0,75 para a α -lactalbumina e de 0,01 para a β -lactoglobulina, ou seja a diferença entre os dois coeficientes de partição não é suficientemente elevada para garantir uma separação eficaz das duas proteínas.

Estes resultados obtidos na gama de pesos moleculares inferiores, apresentam-se estranhos já que, a diminuição da gama de pesos moleculares deveria resultar num aumento dos coeficientes de partição para ambas as proteínas e tal só se verificou para a β -lactoglobulina.

3.1.2 Sistemas compostos por PEG e Sais

De entre os sistemas PEG-sais mais empregues na aplicação em grande escala destas técnicas de purificação destacam-se os sistemas PEG-fosfato e PEG-sulfato.

Os sistemas PEG-sais apresentam, no entanto, alguns problemas que limitam a sua aplicabilidade. Estes sistemas formam-se com elevadas concentrações de sal em ambas as fases, normalmente superiores a 1M, o que diminui a aplicação de técnicas de partição de afinidade e pode originar a desnaturação de materiais com actividade biológica.

Estes sistemas apresentam ainda o inconveniente de adicionarem elevadas concentrações de fosfatos e sulfatos aos efluentes industriais. Neste trabalho foram efectuados ensaios com o sistema PEG-fosfato (secção 3.1.2.1) e com o sistema PEG-sulfato (secção 3.1.2.2).

3.1.2.1 Sistemas compostos por PEG e Sais de Fosfato de Potássio

Estes sistemas não foram explorados tão exaustivamente como os restantes estudados uma vez que está descrito na literatura um trabalho bastante completo sobre a partição das proteínas em causa com este sistema na gama de baixos pesos moleculares por Chen, 1992.

A tabela 3.2 apresenta a composição dos sistemas bifásicos testados, em termos de percentagem de massa (100 x massa polímero/massa sistema bifásico) de cada componente.

Tabela 3.2 Composição dos sistemas PEG-Fosfato estudados

PEG (% p/p)	Fosfato de Potássio
14	14
16	14
18	14

Nestes sistemas foram utilizadas soluções de PEG com massas moleculares de 600, 900, 1500, 6000, 8000 e 10000. Os valores de pH testados foram 6,0, 7,0 e 8,0.

As Figuras 3.11 e 3.12 apresentam os resultados obtidos para o sistema PEG-fosfato na gama de baixos pesos moleculares para as proteína α -lactalbumina e β -lactoglobulina respectivamente.

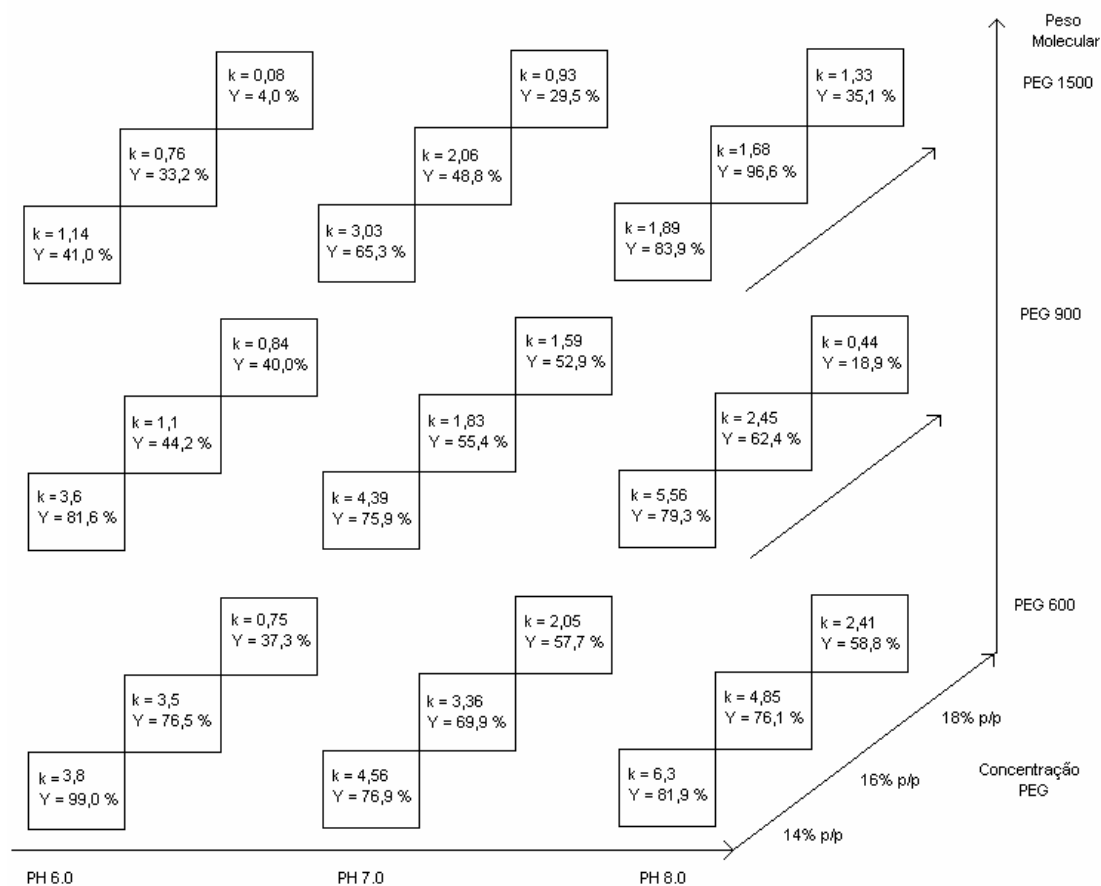


Figura 3.11 Sistemas compostos por PEG e Fosfato de potássio na gama de baixos pesos moleculares de PEG, na ausência de NaCl para purificar α -lactalbumina.

Os resultados obtidos estão de um modo geral de acordo com o publicado por Chen, 1992, sendo o melhor resultado a situação 14% p/p PEG600 + 14% p/p Fosfato, pH 8,0, com $K_{\alpha} = 6,30$ e $Y_{\alpha,S} = 81,9\%$.

Alguns autores defendem que a partição de uma proteína num sistema PEG-sal depende da hidrofobicidade da proteína, ou seja, proteínas com mais grupos apolares (maior conteúdo em resíduos de aminoácidos apolares) mostram uma maior afinidade para a fase superior rica em PEG (fase mais hidrofóbica).

A α -lactalbumina e a β -lactoglobulina têm uma hidrofobicidade média semelhante que é de 4,68 e 5,03 KJ/resíduo.

Os comportamentos destas proteínas nos sistemas PEG-Fosfato não podem ser interpretados portanto somente com base nas suas hidrofobicidades, uma vez que estas têm comportamentos distintos (Figura 3.11 e 3.12).

Uma melhor explicação para o observado pode ter a ver com o conteúdo em triptofano das proteínas. Dipéptidos contendo triptofano mostraram uma melhor partição para a fase rica em PEG em sistemas PEG-Sal.

Uma vez que o triptofano representa 5,2 mol% do total dos resíduos de aminoácidos na α -lactalbumina em contraste com 2,0 mol% na β -lactoglobulina, esta interação pode ter um papel determinante no comportamento das proteínas no sistema bifásico (Chen, 1992).

Efeito da massa molecular do polímero

O coeficiente de partição da α -lactalbumina diminui com o aumento do peso molecular (excepto para PEG 10000).

Baskir et al discutiram um modelo de partição de proteínas num sistema bifásico PEG-sal usando as equações de Melander e Horváth e os efeitos de volume excluído do PEG.

De acordo com este modelo, a proteína move-se para a fase rica em sal (inferior) com um aumento do peso molecular do polímero devido ao aumento do volume excluído de PEG com o seu peso molecular.

A influência do peso molecular de PEG na partição das proteínas pode ser atribuído ao aumento da proporção de grupos terminais hidrofílicos nas moléculas de

PEG com menor peso molecular (ou com comprimento de cadeia mais curto), o que reduz a hidrofobicidade da fase PEG.

Estas observações justificam então o facto do coeficiente de partição das proteínas diminuir à medida que se aumenta o peso molecular do PEG.

Efeito da concentração do polímero

Alguns investigadores tentaram explicar o efeito do comprimento da tie-line pela medição da alteração do volume livre. Baseados nas alterações de volume livre com a composição do sistema, concluiu-se que um aumento do comprimento da tie-line implica um aumento da concentração de sal na fase inferior e, conseqüentemente pode ocorrer o salting-out das proteínas uma vez atingido o seu limite de solubilidade.

Outros factores, como o efeito de exclusão podem ser mais importantes na determinação do coeficiente de partição da proteína, uma vez que se verificou que um aumento da concentração de PEG promove uma diminuição do coeficiente de partição.

Na realidade podem ocorrer os tipos de comportamento num sistema PEG-Sal, mas no caso da α -lactalbumina está a predominar o efeito de exclusão na determinação da sua partição.

Efeito do pH

O pH influenciará os grupos ionizáveis da proteína, que no final promoverá uma alteração das cargas superficiais da proteína e favorecerá a partição.

A manipulação do pH da solução foi explorada para obter uma partição diferencial das proteínas numa grande variedade de esquemas de purificação.

Verificou-se que o coeficiente de partição aumenta com o pH, independentemente do peso molecular do polímero.

Alguns investigadores sugerem que o PEG se comporta como se estivesse positivamente carregado. Os poliões, como por exemplo as proteínas, acima do seu ponto isoeléctrico serão melhor aceites na fase superior rica em PEG à medida que o pH aumenta.

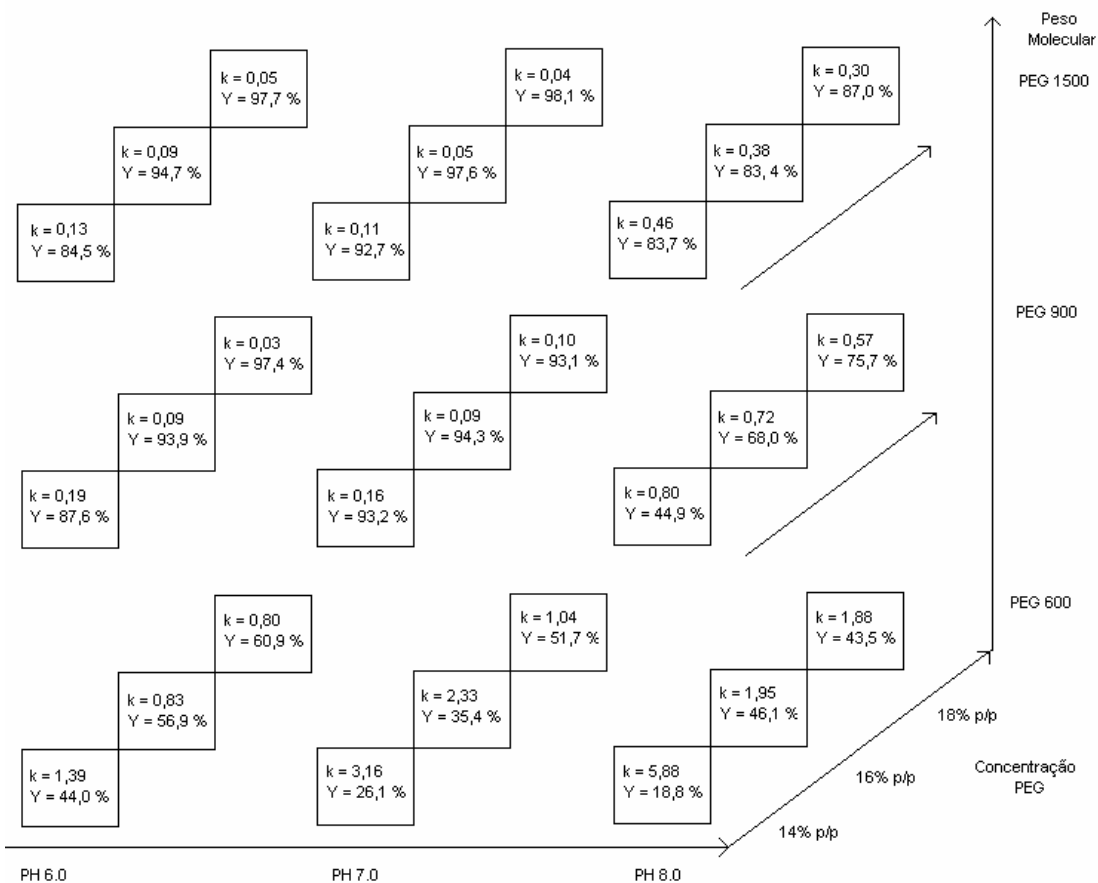


Figura 3.12 Sistemas compostos por PEG e Fosfato de potássio na gama de baixos pesos moleculares de PEG, na ausência de NaCl para purificar β -lactoglobulina.

Observando os resultados obtidos para a β -lactoglobulina, verifica-se que os coeficientes de partição são elevados para PEG 600, isto é a proteína encontra-se na fase superior do sistema e, são baixos para PEG 1500, ou seja a proteína desloca-se para a fase inferior.

Efeito da massa molecular do polímero

Verificou-se que à medida que aumenta o peso molecular do polímero a proteína tende a deslocar-se para a fase inferior do sistema, pelos mesmos motivos apresentados para a α -lactalbumina.

Efeito da concentração do polímero

O aumento da concentração do polímero promove também uma diminuição do coeficiente de partição da proteína, como seria de esperar.

Efeito do pH

Pelos mesmos motivos anteriormente apresentados, o aumento do pH promove um aumento no coeficiente de partição da β -lactoglobulina.

Assim, os melhores resultados nesta gama de pesos moleculares de PEG em termos da partição da β -lactoglobulina para a fase inferior foram obtidos a pH neutro e para uma concentração de 14% p/p e 18% p/p de PEG 1500.

O sistema mais indicado para separar as duas proteínas num concentrado proteico de soro, deverá ser efectuado a pH neutro e para um PEG com peso molecular 900.

De forma a esgotar todas as possibilidades dentro dos sistemas compostos por PEG e sais de fosfato de potássio foram efectuados ensaios numa gama de pesos moleculares de PEG mais elevada (PEG 6000/ PEG 8000/ PEG 10000).

De um modo geral e como seria previsível, os coeficientes de partição de ambas as proteínas diminuíram nesta gama de pesos moleculares uma vez que o efeito de exclusão é muito mais pronunciado.

Os resultados obtidos encontram-se reunidos nas Figuras 3.13 e 3.14 para as proteínas α -lactalbumina e β -lactoglobulina, respectivamente.

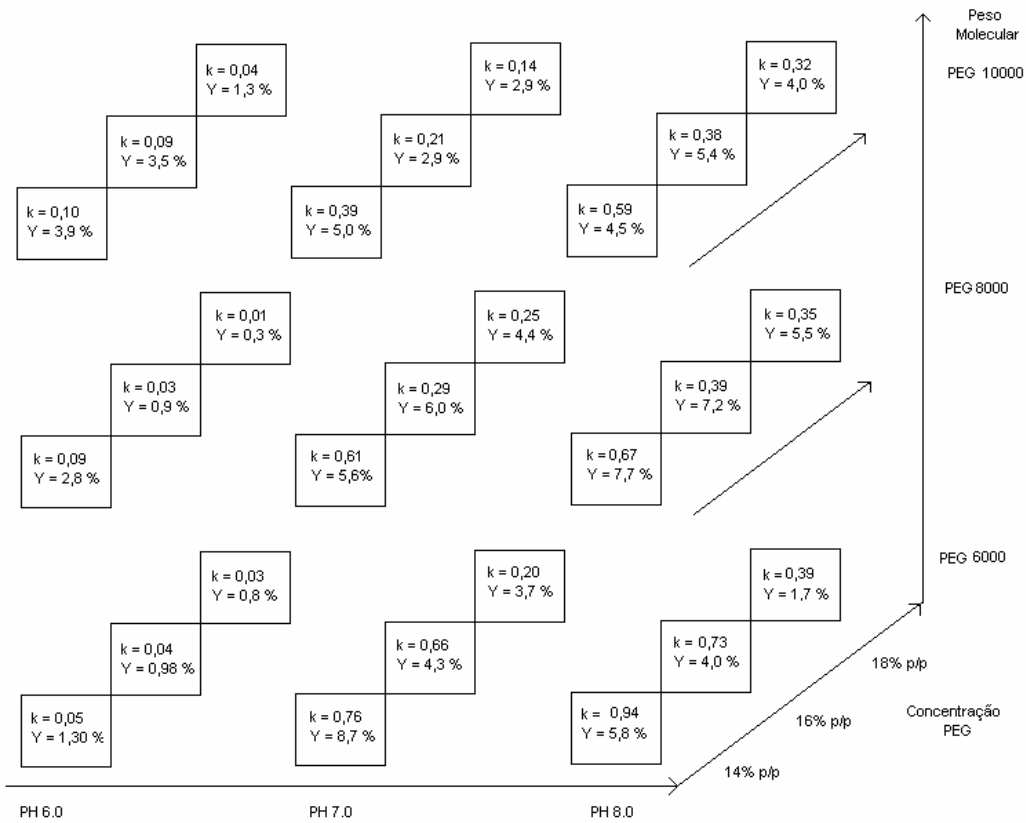


Figura 3.13 Sistemas compostos por PEG e Fosfato de potássio na gama de altos pesos moleculares de PEG, para purificar α -lactalbumina.

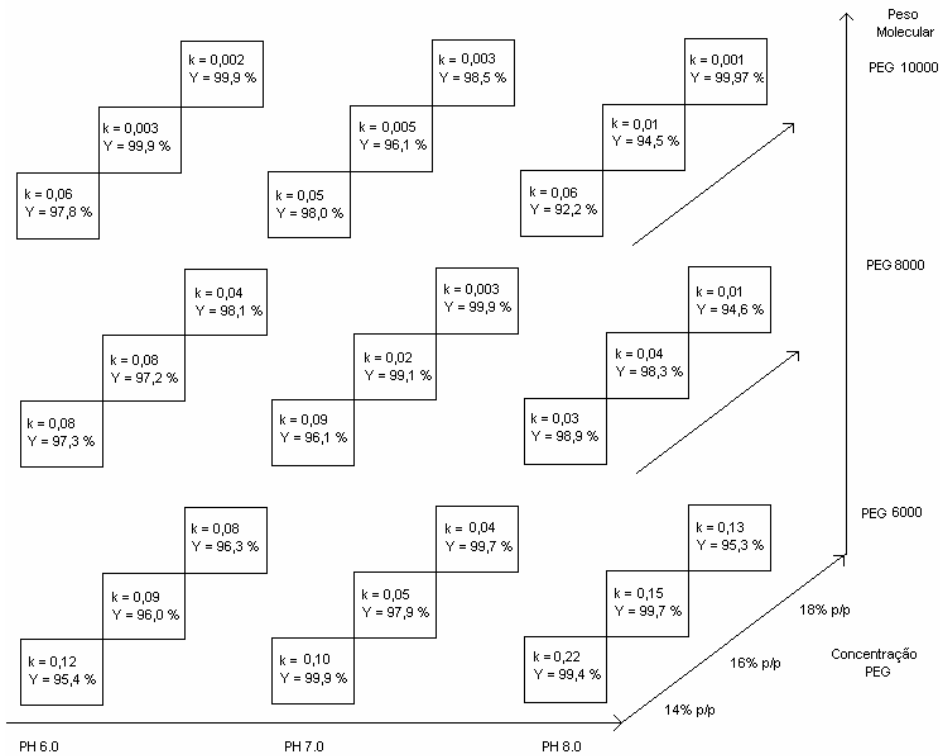


Figura 3.14 Sistemas compostos por PEG e Fosfato de potássio na gama de altos pesos moleculares de PEG, para purificar β -lactoglobulina.

Tal como se verificou em todos os sistemas anteriormente estudados, o coeficiente de partição diminui com o aumento do peso molecular e concentração de PEG e, aumenta com o aumento do pH.

Estes sistemas efectuados na gama mais elevada de pesos moleculares de PEG no sistema PEG-fosfato não se mostraram muito úteis para separar as duas proteínas, uma vez que ambas se deslocam para a fase inferior do sistema e os seus coeficientes de partição são muito próximos.

3.1.2.2 Sistemas compostos por PEG e Sulfato de amónio

A tabela 3.3 apresenta a composição dos sistemas bifásicos testados, em termos de percentagem de massa (100 x massa polímero/massa sistema bifásico) de cada componente.

Tabela 3.3 Composição dos sistemas PEG-Sulfato estudados

PEG (% p/p)	Sulfato de amónio
14	14
16	14
18	14

Nestes sistemas foram utilizadas soluções de PEG com massas moleculares de 600, 900, 1500, 6000, 8000 e 10000. Os valores de pH testados foram 6,0, 7,0 e 8,0.

Em ambos as gamas de peso molecular de PEG foram avaliados os efeitos do tipo de iões em solução e da força iónica.

As Figuras 3.15 e 3.16 apresentam os resultados obtidos para o sistema PEG-sulfato na gama de baixos pesos moleculares para as proteínas α -lactalbumina e β -lactoglobulina respectivamente.

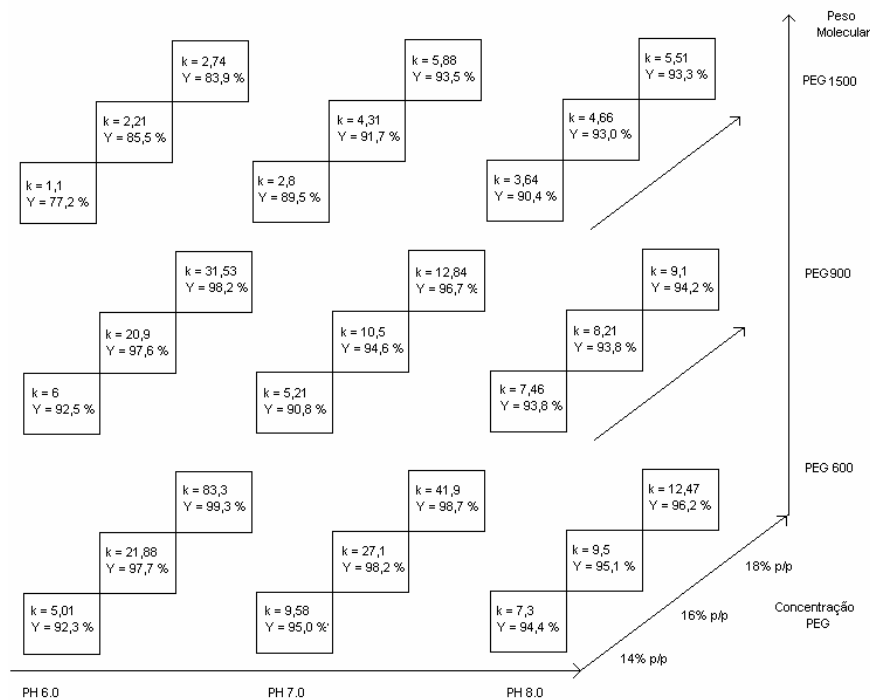


Figura 3.15 Sistemas compostos por PEG e sulfato de amônio na gama de baixos pesos moleculares de PEG, na ausência de NaCl para purificar α -lactalbumina.

Da análise da Figura 3.15 é possível verificar que a α -lactalbumina se distribui preferencialmente na fase superior sendo os coeficientes de partição claramente superiores a 1.

Existem algumas variações impostas a nível da massa molecular e concentração do polímero que permitem obter condições de purificação atraentes, ou seja, concentrações de α -lactalbumina na fase superior superiores às da fase inferior.

Os melhores resultados foram obtidos para pH 6,0 e 7,0 com 18 % p/p de PEG 600.

Segue-se uma análise mais detalhada das variáveis em estudo resultantes das alterações impostas aos três parâmetros.

Efeito do pH

A variação do coeficiente de partição com o pH é significativa, não se conseguindo contudo verificar uma tendência geral.

Verifica-se de um modo geral um aumento do coeficiente de partição com o aumento do pH até pH 7,0 e uma diminuição para pH 8,0.

Aos valores de pH testados a carga da proteína é sempre negativa, pelo que seria de esperar que esta se dirigisse para a fase superior PEG à medida que se aumenta o pH, contudo isto não se verificou para pH 8,0. Pensa-se que poderá ter ocorrido precipitação da proteína a este pH, e portanto esta não terá sido contabilizada no cálculo do coeficiente de partição.

Efeito da massa molecular do polímero

O sistema PEG-sulfato é sensível à variação do peso molecular do polímero nesta gama de pesos moleculares.

Verificou-se que à medida que se aumenta o peso molecular do polímero o coeficiente de partição da proteína vai diminuindo.

Efeito da concentração de PEG

Verificou-se um aumento do coeficiente de partição à medida que se aumenta a concentração de PEG. Um aumento da concentração de polímero implica uma concentração de sal na fase inferior, deste modo, esta concentração elevada de sal vai promover o salting out da proteína uma vez atingido o seu limite de solubilidade, e portanto esta vai dirigir-se para a fase superior. Neste caso o efeito salting-out sobrepõe-se ao efeito de exclusão geralmente promovido com o aumento da concentração do polímero.

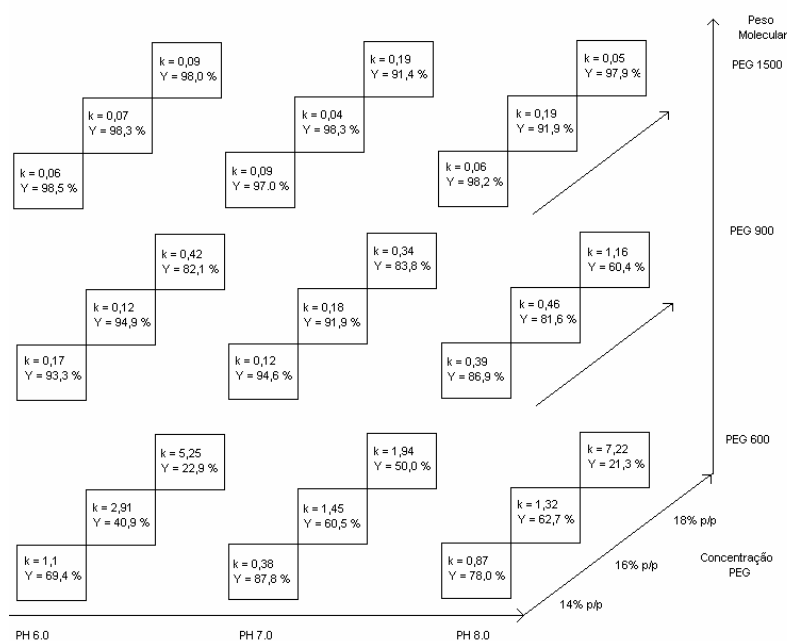


Figura 3.16 Sistemas compostos por PEG e sulfato de amónio na gama de baixos pesos moleculares de PEG, na ausência de NaCl para purificar β -lactoglobulina.

Da análise da Figura 3.16 é possível verificar que à exceção dos ensaios efectuados com PEG 600, em que os coeficientes de partição são muito superiores a 1 o que significa que a proteína está na fase superior, os restantes pesos moleculares permitem dirigir a proteína para a fase inferior do sistema.

Verificou-se, especialmente para PEG 1500 que a β -lactoglobulina se particiona preferencialmente para a fase inferior do sistema. Pelo que, os melhores resultados foram obtidos para pH 7,0 com 14% p/p PEG 1500 + 14% p/p Sulfato.

Segue-se uma análise mais detalhada das variáveis em estudo resultantes das variações impostas aos três parâmetros.

Efeito do pH

Tal como para a α -lactalbumina não é possível identificar uma tendência geral com a variação do pH. Nos ensaios efectuados com PEG 1500 não se verifica uma diferença significativa dos coeficientes de partição, de pH para pH. Mas para PEG 600 e PEG 900 já se podem observar algumas diferenças, contudo, não são as que seria de esperar já que um aumento de pH geralmente promove um aumento do coeficiente de partição e neste caso isso não se verifica.

Efeito da massa molecular do polímero

Também neste caso se observa uma diminuição do coeficiente de partição com o aumento do peso molecular pelos motivos já apresentados anteriormente. Para PEG 1500 praticamente toda a proteína se encontra na fase inferior do sistema bifásico.

Efeito da concentração de PEG

Tal como se observou para a α -lactalbumina também neste caso o aumento da concentração de PEG provoca um aumento do coeficiente de partição da proteína, pelos motivos anteriormente apresentados.

Apesar de, para a α -lactalbumina com PEG 600 se conseguir uma maior concentração de proteína na fase superior, para a β -lactoglobulina consegue-se concentrar mais proteína na fase inferior com PEG1500. Deste modo, de forma a obter

um equilíbrio deverá optar-se pelo uso de PEG 900 para separar as duas proteínas num concentrado proteico de soro, o pH a utilizar deverá ser neutro, uma vez que a pH 8,6 começa a ocorrer a desnaturação irreversível da β -lactoglobulina.

A adição de sais ao sistema PEG-sulfato vai ter influência em termos de volume livre.

A adição de sais a sistemas bifásicos aquosos pode ser usada efectivamente para alterar a partição das proteínas como já foi referido anteriormente.

Assim, os sais testados nestes sistemas foram KSCN, K_2SO_4 e NaCl com uma concentração de 200 mM num sistema 14% p/p Sulfato, 16% p/p PEG 900, pH 7,0.

Para a α -lactalbumina os resultados obtidos encontram-se reunidos na Figura 3.17.

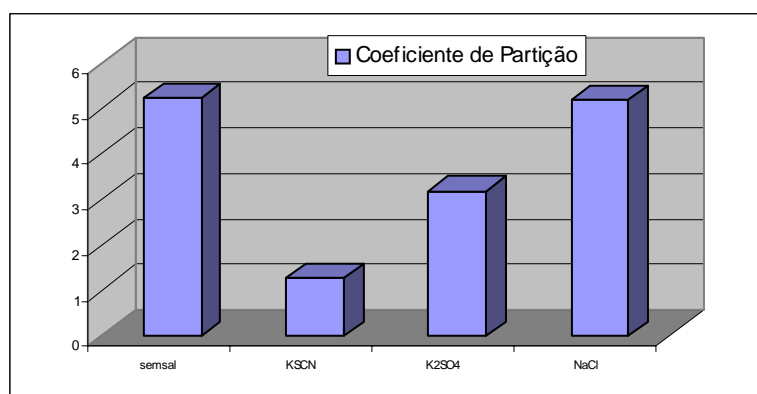


Figura 3.17 Efeito da introdução de sais no sistema PEG-sulfato na gama de baixos pesos moleculares de polímero, para a purificação da α -lactalbumina

Verificou-se que qualquer dos sais adicionados promove a diminuição do coeficiente de partição, sendo esta diminuição mais acentuada para KSCN como seria de esperar. A adição de NaCl deveria ter um efeito mais pronunciado que K_2SO_4 , mas isso não se verificou.

Foi também avaliado neste sistema o efeito da força iónica no mesmo sistema, para tal foi introduzido NaCl em concentrações diferentes (200 e 500 mM), os resultados obtidos encontram-se na Figura 3.18.

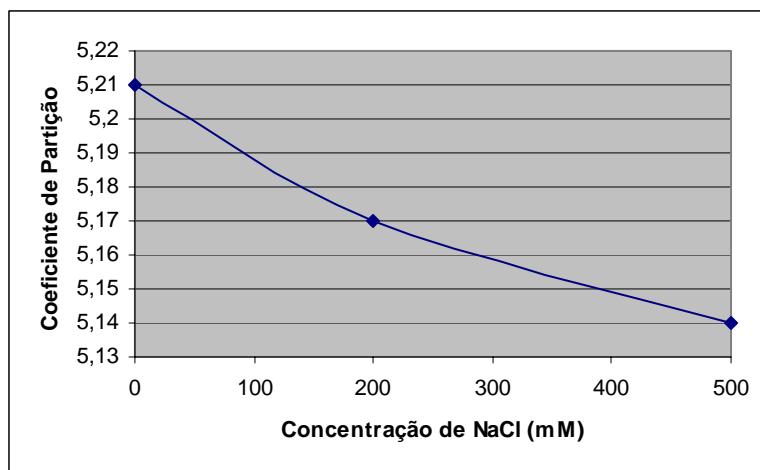


Figura 3.18 Efeito da da força iônica no sistema PEG-sulfato na gama de baixos pesos moleculares de polímero, para a purificação da α -lactalbumina

Verificou-se que o efeito da força iônica não é muito pronunciado embora a tendência seja para uma diminuição do coeficiente de partição com o aumento da concentração de sal.

Sabe-se que o aumento da força iônica promove um aumento das interações hidrofóbicas pelo que a proteína deveria deslocar-se para a fase rica no polímero apolar, contudo, isto não se verificou. Provavelmente a tendência decrescente observada tem a ver com uma desnaturação crescente resultante do aumento da concentração de sal.

Para a β -lactoglobulina os resultados obtidos com a adição de sais encontram-se na Figura 3.19 e estão de acordo com o esperado.

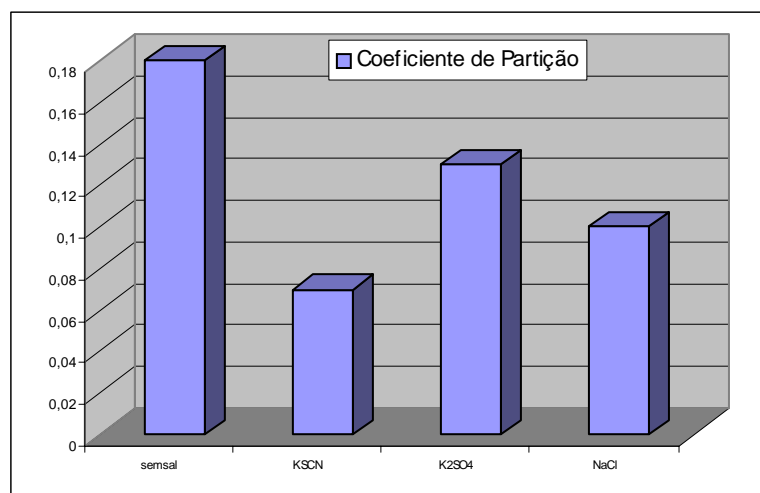


Figura 3.19 Efeito da introdução de sais no sistema PEG-sulfato na gama de baixos pesos moleculares de polímero, para a purificação da β -lactoglobulina.

Tal como para a α -lactalbumina foi avaliado o efeito da força iónica introduzindo no sistema concentrações crescentes de cloreto de sódio. Verificou-se que, o aumento da concentração de sal promove também uma diminuição do coeficiente de partição (Figura 3.20).

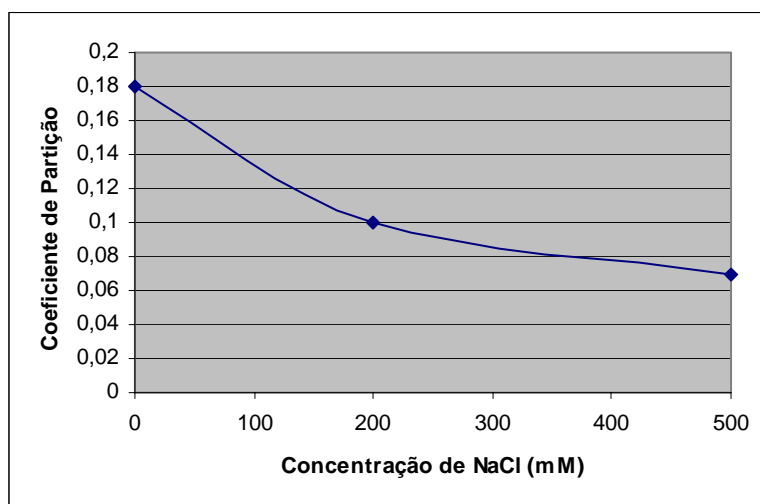


Figura 3.20 Efeito da da força iónica no sistema PEG-sulfato na gama de baixos pesos moleculares de polímero, para a purificação da β -lactoglobulina.

À semelhança daquilo que foi feito para a gama de pesos moleculares de PEG inferiores, irá ser apresentada uma análise detalhada dos resultados obtidos para cada proteína em função dos parâmetros variados numa gama de pesos moleculares de PEG mais elevados.

À partida, é possível verificar que para ambas as proteínas, os coeficientes de partição obtidos nesta gama de pesos moleculares de PEG são inferiores aos anteriormente obtidos, o que seria de esperar pois um aumento do peso molecular do polímero promove uma diminuição do volume livre e de um modo geral, a uma diminuição do coeficiente de partição.

Os resultados obtidos nesta gama de pesos moleculares encontram-se reunidos nas Figuras 3.21 e 3.22.

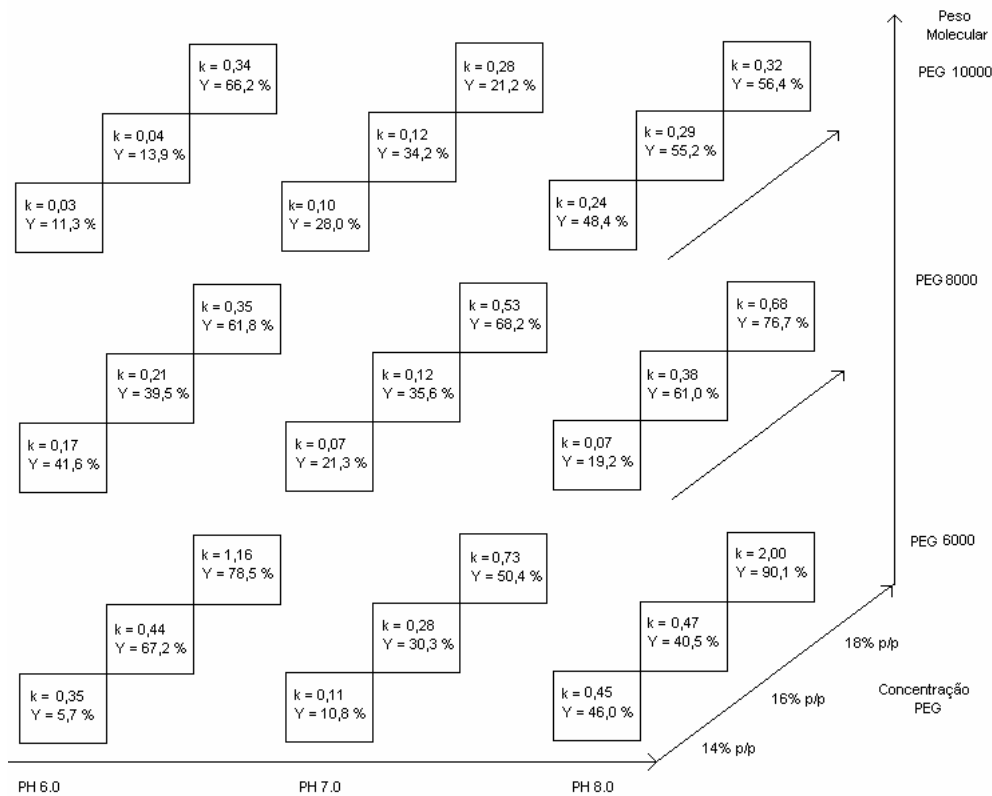


Figura 3.21 Sistemas compostos por PEG e sulfato de amônio na gama de altos pesos moleculares de PEG, na ausência de NaCl para purificar α -lactalbumina.

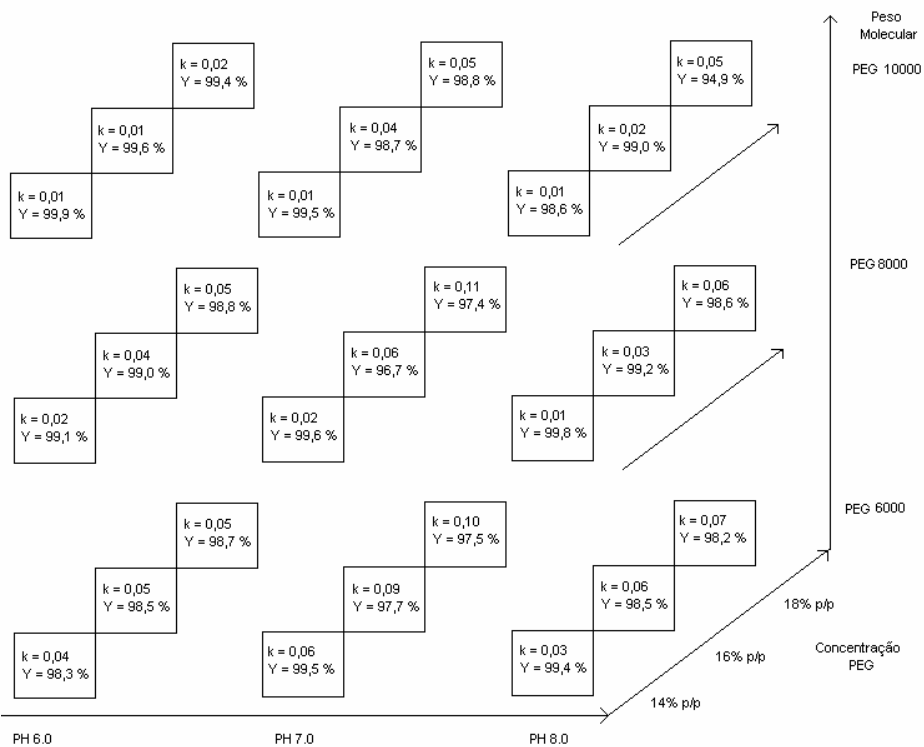


Figura 3.22 Sistemas compostos por PEG e sulfato de amônio na gama de altos pesos moleculares de PEG, na ausência de NaCl para purificar β -lactoglobulina.

De um modo geral as tendências verificadas na gama de pesos moleculares inferiores mantêm-se.

Analisando a Figura 3.21 verifica-se que os valores obtidos são todos muito semelhantes e que, a proteína se desloca para a fase inferior do sistema.

Por outro lado, também a proteína β -lactoglobulina se desloca para a fase inferior (Figura 3.22).

A variação dos parâmetros pH, concentração de PEG e pH não produzem grandes variações dos coeficientes de partição de ambas as proteínas pelo que se conclui que esta gama de pesos moleculares do polímero não é indicada para separar as duas proteínas num concentrado proteico de soro.

De qualquer modo, de forma a avaliar uma possível melhoria em termos de separação foram efectuados ensaios com diferentes sais e com diferentes forças iónicas, tal como para a gama de pesos moleculares inferiores.

Os resultados obtidos com a introdução de diferentes sais, num sistema 14% p/p Sufato + 14% p/p PEG8000, pH 7,0 para a α -lactalbumina encontram-se na Figura 3.23.

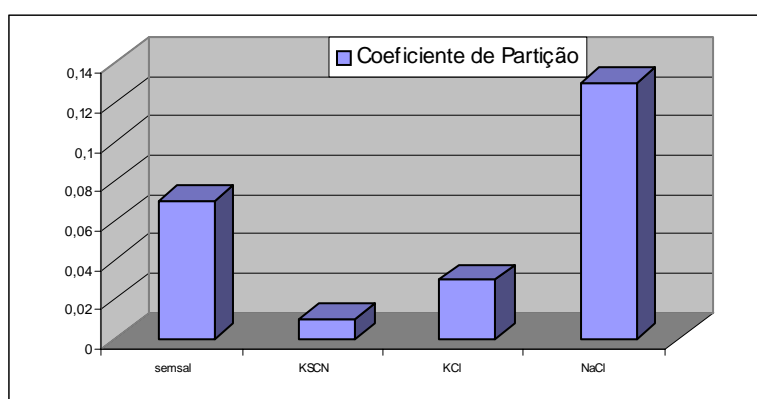


Figura 3.23 Efeito da introdução de sais no sistema PEG-sulfato na gama de altos pesos moleculares de polímero, para a purificação da α -lactalbumina.

Os resultados obtidos (Figura 3.23) encontram-se dentro do que estava previsto, contudo não promovem uma melhoria da separação.

A adição de diferentes concentrações de cloreto de sódio promove um aumento do coeficiente de partição da proteína (Figura 3.24), mas também nesta situação não se observam melhorias em termos de separação das duas proteínas.

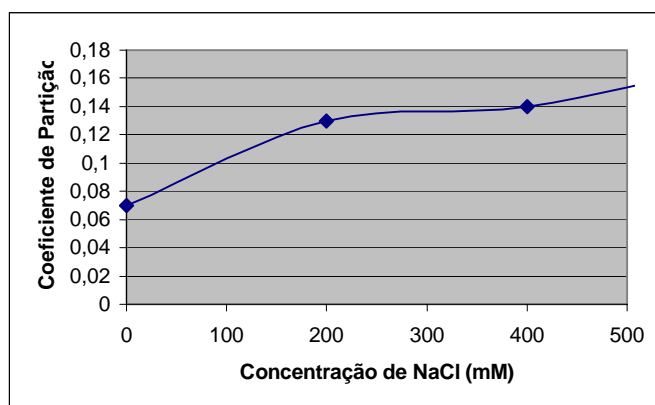


Figura 3.24 Efeito da da força iónica no sistema PEG-sulfato na gama de altos pesos moleculares de polímero, para a purificação da α -lactalbumina.

Para a β -lactoglobulina com o mesmo sistema, os resultados encontram-se nas Figuras 3.25 e 3.26.

Neste caso a introdução de diferentes sais promoveu um aumento do coeficiente de partição embora este não seja significativo uma vez que a proteína continua a deslocar-se para a fase inferior.

Relativamente à força iónica verifica-se uma ligeira tendência crescente embora também não seja significativa.

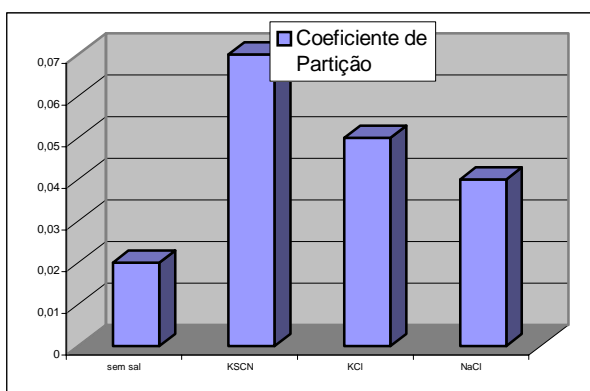


Figura 3.25 Efeito da introdução de sais no sistema PEG-sulfato na gama de altos pesos moleculares de polímero, para a purificação da β -lactoglobulina.

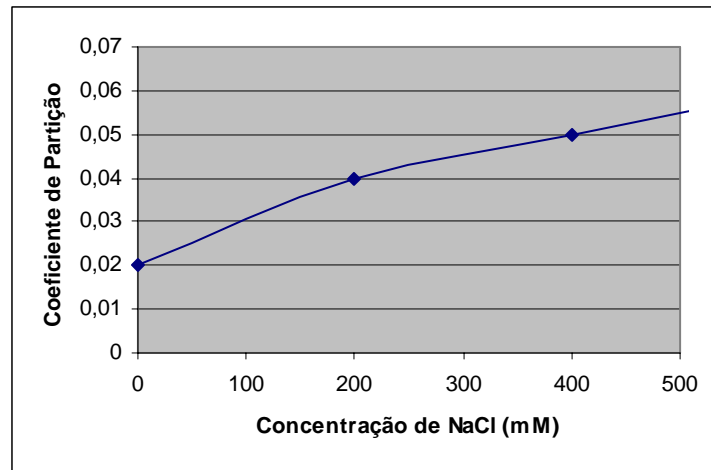


Figura 3.26 Efeito da da força iónica no sistema PEG-sulfato na gama de altos pesos moleculares de polímero, para a purificação da β -lactoglobulina.

Pela observação dos resultados obtidos nesta gama de pesos moleculares é possível concluir que não se reúnem condições que permitam a separação de ambas as proteínas uma vez que, ambas se dirigem para a fase inferior do sistema mesmo manipulando parâmetros como o pH, concentração de PEG, introdução de diferentes sais ou força iónica, não se consegue uma alteração significativa dos coeficientes de partição.

3.1.3 Comparação dos Sistemas PEG-Reppal e PEG-Sais para a partição de α -lactalbumina e β -lactoglobulina.

Pretendia-se com estes estudos seleccionar o sistema que permitisse uma melhor separação de α -lactalbumina e β -lactoglobulina quando aplicado num concentrado proteico de soro.

Da análise dos resultados anteriormente apresentados verificou-se que no sistema PEG-Reppal a gama de baixo peso molecular de PEG não é eficaz para separar as duas proteínas, pois ambas apresentam nesta gama de pesos moleculares, um coeficiente de partição muito próximo de 1, ou seja uma partição semelhante em ambas as fases do sistema.

Do mesmo modo, para os sistemas PEG-Sais verificou-se, mas desta vez na gama de elevados pesos moleculares de PEG, quer para o sistema PEG-Fosfato, quer para o sistema PEG-Sulfato, que não se consegue obter condições que permitam a

separação das duas proteínas (maioritárias no soro de queijo), isto porque ambas se deslocam preferencialmente para a fase inferior do sistema bifásico.

Assim, no sistema PEG-Reppal e na gama de elevados pesos moleculares de PEG, as melhores condições de separação são a pH 7,0, com 13% p/p de Reppal PES100 e 5% p/p de PEG 6000, tendo-se obtido um $k_{\alpha} = 3,67$ e $k_{\beta} = 0,04$, com rendimentos de 81,1% ($Y_{\alpha,S}$) e 99,2% ($Y_{\beta,I}$) respectivamente, com recuperações de 38,4% (RA) e 48,4% (RB) respectivamente, e purezas de 95,9% (PA) e 95,7% (PB) respectivamente. Neste sistema, é possível partindo de 0,5 mg/ml de proteína total no sistema, concentrar e purificar a α -lactalbumina na fase superior do sistema (0,6 mg/ml), embora para a β -lactoglobulina não se consiga fazer a sua concentração na fase inferior (0,3 mg/ml). Ou ainda, para pH 7,0, com 13% p/p de Reppal PES 100 e 5% p/p de PEG 20000, tendo-se obtido um $k_{\alpha} = 3,80$ e $k_{\beta} = 0,03$, com rendimentos de 84,4% ($Y_{\alpha,S}$) e 99,7% ($Y_{\beta,I}$) respectivamente, com recuperações de 41% (RA) e 52,1 % respectivamente, e purezas de 98,5% (PA) e 96,5% (PB). Neste sistema, tal como no anterior consegue-se concentrar a α -lactalbumina na fase superior (0,8 mg/ml), mas não se consegue concentrar a β -lactoglobulina (0,3 mg/ml).

No sistema PEG-Fosfato e na gama de baixos pesos moleculares de PEG as melhores condições de separação consistem em usar um sistema a pH 7,0, com 14% p/p de Fosfato e 14 % p/p de PEG 900, tendo-se obtido nesta situação um $k_{\alpha} = 4,39$ e $k_{\beta} = 0,16$, com rendimentos de 75,9% ($Y_{\alpha,S}$) e 93,2% ($Y_{\beta,I}$) respectivamente, com recuperações de 81,1% (RA) e 80,3% (RB) respectivamente, e purezas de 72,3% (PA) e 94,3% (PB) respectivamente. Este sistema permite, partindo de 0,25 mg/ml de proteína total no sistema, obter 0,49 mg/ml de α -lactalbumina na fase superior e, 0,33 mg/ml de β -lactoglobulina na fase inferior.

No sistema PEG-Sulfato e na gama de baixos pesos moleculares de PEG as melhores condições de separação consistem em usar um sistema a pH 7,0, com 14% p/p de Fosfato e 18 % p/p de PEG 900, tendo-se obtido nesta situação um $k_{\alpha} = 12,80$ e $k_{\beta} = 0,34$ com rendimentos de 96,7% ($Y_{\alpha,S}$) e 83,8% ($Y_{\beta,I}$) respectivamente, com recuperações de 61,2% (RA) e 74,1% (RB) respectivamente, e purezas de 58,2% (PA) e 99,1% (PB) respectivamente. Este sistema permite, partindo de 0,25 mg/ml de

proteína total no sistema, obter 0,46 mg/ml de α -lactalbumina na fase superior e, 0,27 mg/ml de β -lactoglobulina na fase inferior.

Ensaio realizado por Chen (1992), utilizando um sistema PEG-Fosfato de Potássio, permitiram purificar parcialmente α -lactalbumina na fase superior e β -lactoglobulina na fase inferior, de um soro de queijo tipo Cheddar.

A utilização de PEG de baixo peso molecular (PEG 1000 ou PEG 1500) e elevadas concentrações de fosfato de potássio (20 % p/p) permitiu obter β -lactoglobulina essencialmente pura e 84% de α -lactalbumina pura, num único passo de extração usando sistemas de partição bifásica aquosa.

Comparando os resultados publicados por Chen (1992) com os obtidos neste trabalho, verifica-se que não são muito diferentes, apesar de se terem obtido graus de pureza inferiores para α -lactalbumina, obteve-se a β -lactoglobulina praticamente pura na fase inferior dos sistemas.

Escolhidas as melhores condições em cada um dos sistemas testados, estas foram ensaiadas utilizando um concentrado proteico de soro a fim de avaliar se se consegue obter a separação das duas proteínas, como se observou nos ensaios com as proteínas comerciais puras.

Estes resultados encontram-se reunidos na subsecção 3.2.

3.2 Separação das proteínas α -lactalbumina e β -lactoglobulina de um concentrado proteico de soro.

Após a caracterização dos sistemas bifásicos aquosos para as proteínas puras - α -lactalbumina e β -lactoglobulina – foram escolhidas algumas das situações mais vantajosas em termos de separação das duas proteínas para ensaiar num concentrado proteico de soro. Assim, segue-se uma análise detalhada dos resultados obtidos para cada uma das situações escolhidas de cada um dos sistemas testados.

3.2.1 Sistemas compostos por PEG e Reppal PES 100

Com as proteínas puras verificou-se que de um modo geral, é a pH 7,0 que se observam os melhores resultados em termos de partição diferenciada das proteínas. Foi também para a concentração de 7% p/p de PEG 20000 que se verificou a maior diferença entre os coeficientes de partição obtidos. Contudo, trabalhar com PEG 20000 é complicado dada a sua elevada viscosidade, pelo que se optou por trabalhar com polímero de pesos moleculares inferiores.

Assim, com concentrado proteico de soro foram ensaiadas as seguintes situações: 7%p/p PEG6000+13%p/p Reppal, pH 7,0; 7% p/p PEG8000+13%p/p Reppal, pH 7,0 e 7%p/p PEG10000+13%p/p Reppal, pH 7,0. Os cromatogramas obtidos por FPLC para as fases superior e inferior de cada sistema encontram-se reunidos nas figuras abaixo.

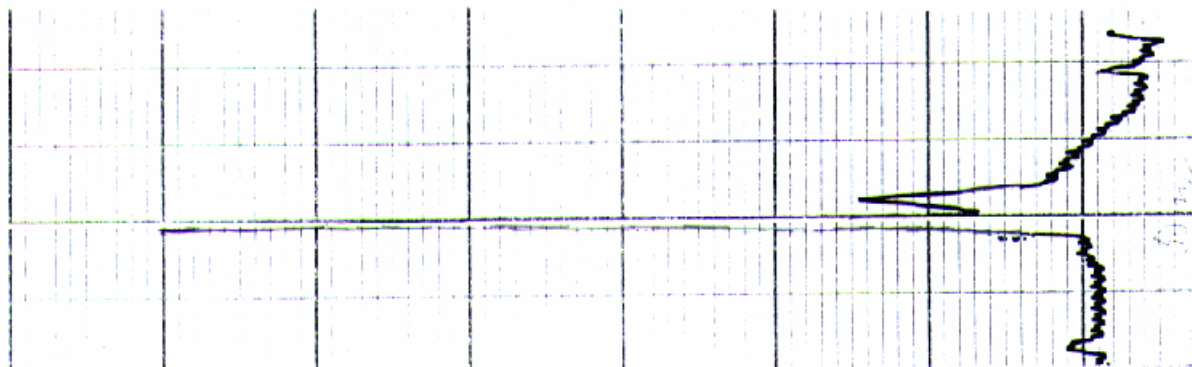


Figura 3.27 Cromatograma FPLC obtido para a FASE SUPERIOR de um sistema 13%p/p Reppal + 7%p/p PEG6000, pH 7.0. Foi utilizada uma mistura de proteínas padrão (2 g/l). Condições de separação:

TA – Tris/HCl 20 mM pH 8.0, TB – TA + 1M NaCl, resina: Macro-Prep High Q Anion Exchange Support.

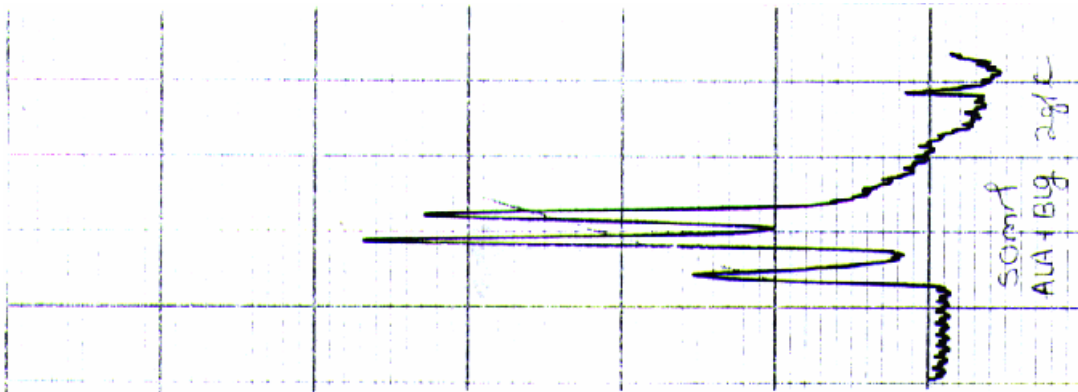


Figura 3.28 Cromatograma FPLC obtido para a FASE INFERIOR de um sistema 13%p/p Reppal + 7%p/p PEG6000, pH 7.0.

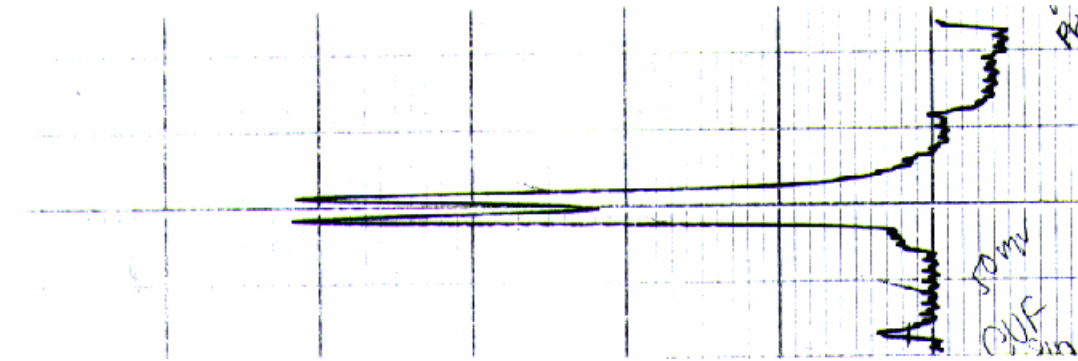


Figura 3.29 Cromatograma FPLC obtido para a FASE SUPERIOR de um sistema 13%p/p Reppal + 7%p/p PEG6000, pH 7.0. Neste ensaio foi utilizado concentrado proteico 5%p/p.

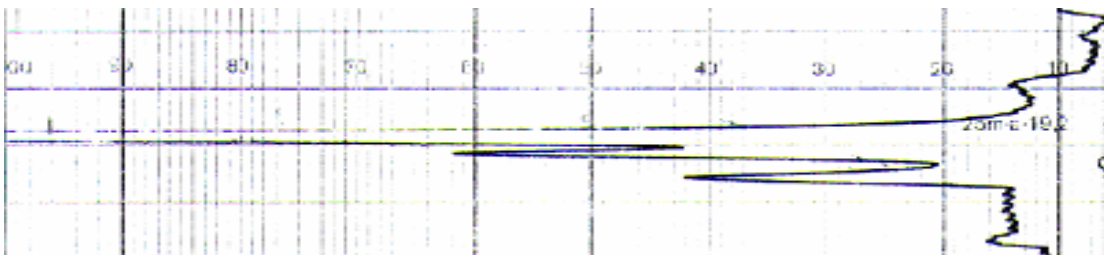


Figura 3.30 Cromatograma FPLC obtido para a FASE INFERIOR de um sistema 13%p/p Reppal + 7%p/p PEG6000, pH 7.0. Neste ensaio foi utilizado concentrado proteico 5%p/p.

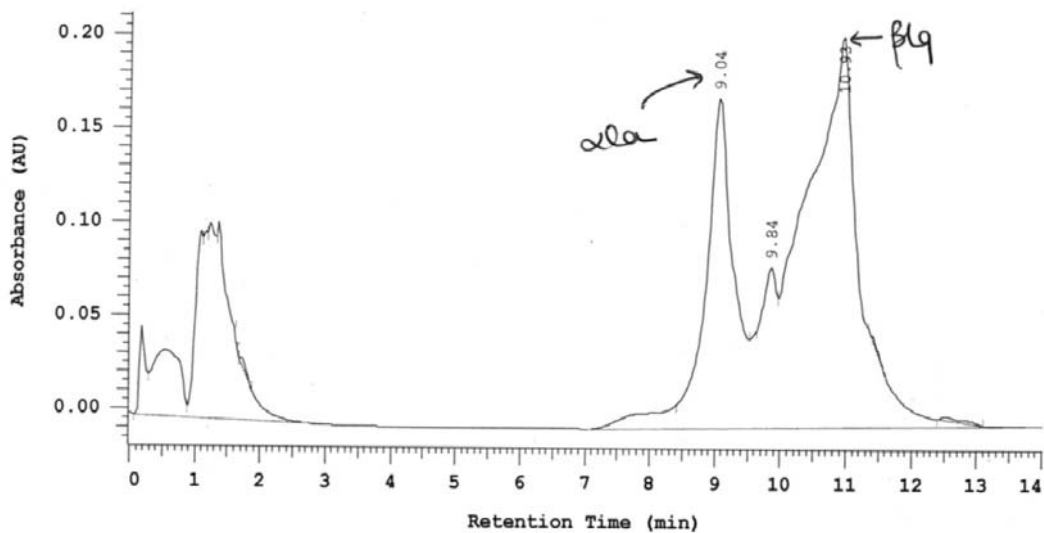


Figura 3.31 Cromatograma FPLC obtido para a FASE SUPERIOR de um sistema 13% p/p Reppal + 7% p/p PEG8000, pH 7.0. Neste ensaio foi utilizado concentrado proteico 10% p/p. Condições de separação: TA – Tris/HCl 20 mM pH 8.0, TB – TA + 1M NaCl, coluna: MonoQ HR5/5 Pharmacia.

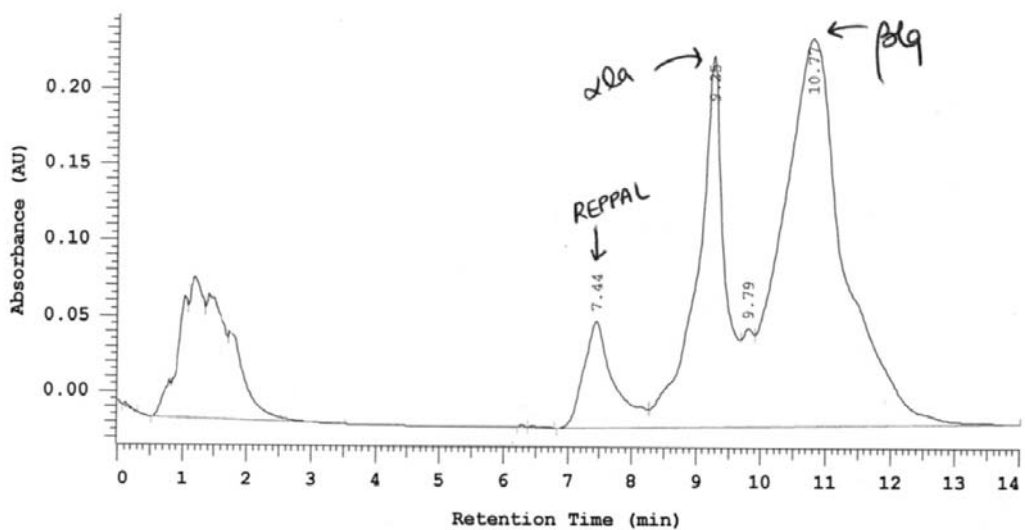


Figura 3.32 Cromatograma FPLC obtido para a FASE INFERIOR de um sistema 13% p/p Reppal + 7% p/p PEG8000, pH 7.0. Neste ensaio foi utilizado concentrado proteico 10% p/p.

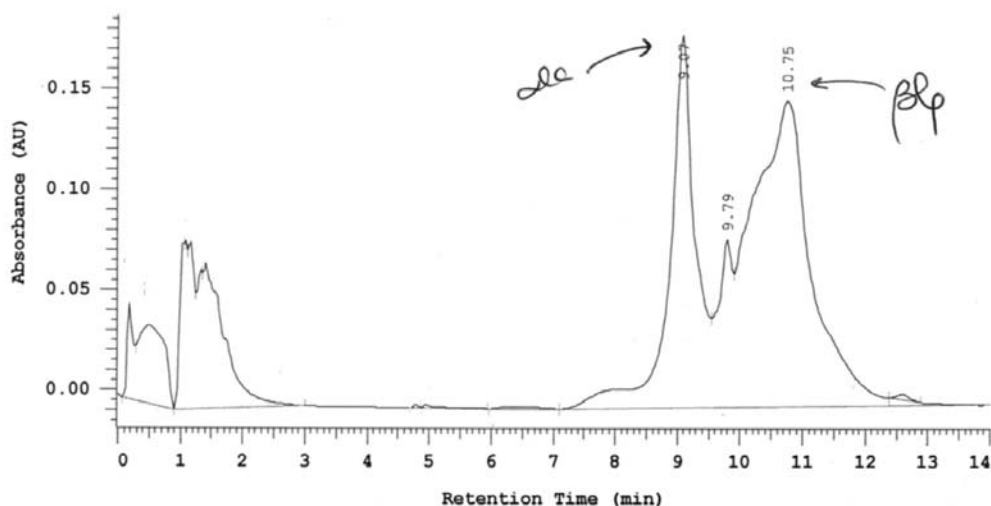


Figura 3.33 Cromatograma FPLC obtido para a FASE SUPERIOR de um sistema 13%p/p Reppal + 7%p/p PEG10000, pH 7.0. Neste ensaio foi utilizado concentrado proteico 10%p/p.

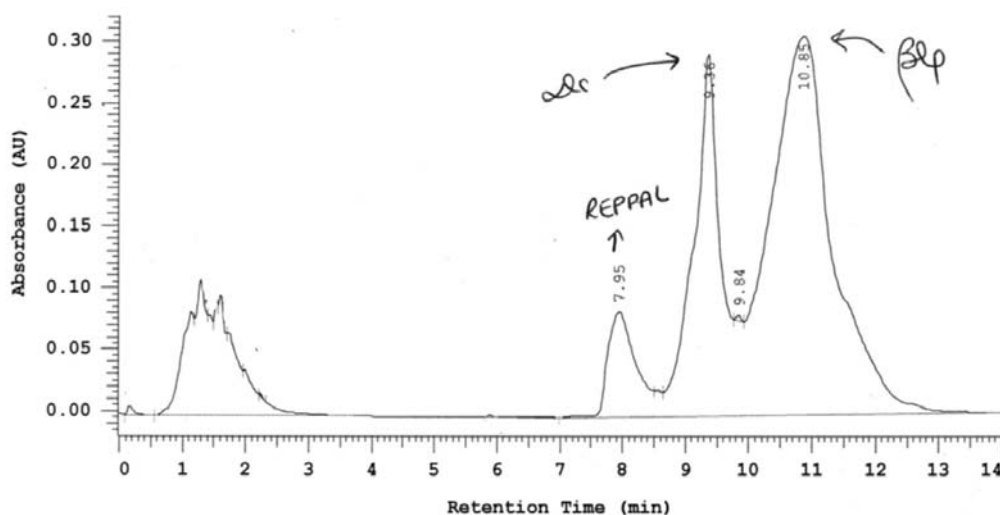


Figura3.34 Cromatograma FPLC obtido para a FASE INFERIOR de um sistema 13%p/p Reppal + 7%p/p PEG10000, pH 7.0. Neste ensaio foi utilizado concentrado proteico 10%p/p.

Nos ensaios efectuados com concentrado proteico de soro verificou-se em todos os casos que as duas proteínas se deslocam preferencialmente para a fase inferior do sistema, isto seria de esperar pois para pesos moleculares superiores de PEG, menor é o volume livre na fase superior pelo que as proteínas são excluídas para a fase inferior. Contudo, esta tendência não se verificou com as proteínas puras pelo que, a avaliar pelos resultados anteriormente obtidos seria de esperar que as duas proteínas se distribuíssem diferencialmente pelas duas fases, como se pode observar na Tabela 3.4

onde se encontram os coeficientes de partição das proteínas puras e das proteínas do concentrado proteico de soro para um mesmo sistema ensaiado. A diferença dos resultados obtidos com as proteínas puras e com o concentrado proteico de soro podem ter a ver com possíveis interferências de outros componentes do soro proteicos ou não proteicos, ou de associações das proteínas entre si ou com lactose alterando as suas propriedades e características de partição.

Tabela 3.4 Coeficientes de partição das proteínas puras e das proteínas do concentrado proteico de soro na gama elevada de pesos moleculares.

Sistema	$\kappa\alpha$ la pura	k β lg pura	$\kappa\alpha$ la CP	k β lg CP
7%p/p PEG6000+13%p/p Reppal, pH 7,0	2,45	0,04	0,81	0,42
7%p/p PEG8000+13%p/p Reppal, pH 7,0	2,56	0,02	0,75	0,83
7%p/p PEG10000+13%p/p Reppal, pH 7,0	2,24	0,04	0,60	0,48

De forma a confirmar os resultados foram realizadas duas electroforeses SDS PAGE no sistema PEG-Reppal, sendo uma na gama de altos pesos moleculares do polímero e outra, na gama de baixos pesos moleculares do polímero. Os géis encontram-se nas Figuras 3.35 e 3.36.

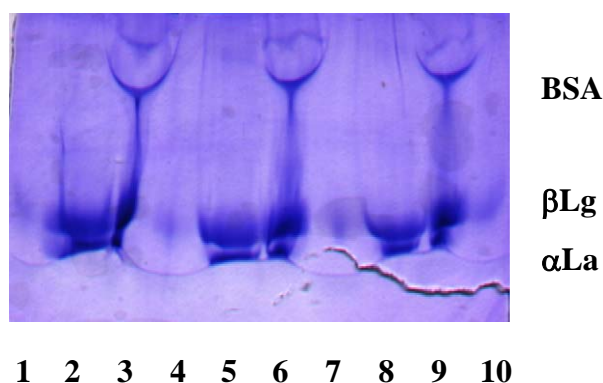


Figura 3.35 Electroforese SDS PAGE. Linha 2/3 – Sistema 7%p/p PEG6000 + 13% p/p Reppal, pH 7,0 (fase superior e inferior respectivamente). Linha 5/6 - Sistema 7%p/p PEG8000 + 13% p/p Reppal, pH 7,0 (fase superior e inferior respectivamente). Linha 8/9 - Sistema 7%p/p PEG10000 +13 % p/p Reppal, pH 7,0 (fase superior e inferior respectivamente).

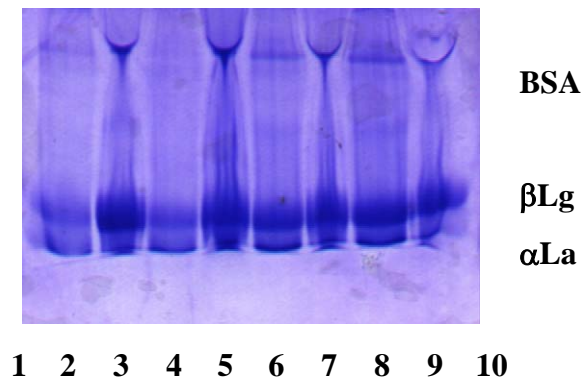


Figura 3.36 Electroforese SDS PAGE. Linha 2/3 – Sistema 24%p/p PEG1500 + 14% p/p Reppal, pH 8,0 (fase superior e inferior respectivamente). Linha 4/5 – Sistema 20%p/p PEG1500 + 14% p/p Reppal, pH 6,0 (fase superior e inferior respectivamente). Linha 6/7 - Sistema 22%p/p PEG900 + 14% p/p Reppal, pH 8,0. Linha 8/9 – Sistema 20%p/p PEG900 + 14%p/p Reppal, pH 8,0 (fase superior e inferior respectivamente).

Observando os géis de electroforese SDS PAGE verifica-se que na gama de altos pesos moleculares de PEG as proteínas apesar de se encontrarem ambas nas duas fases estão mais concentradas na fase inferior do sistema. Na gama de baixos pesos moleculares de PEG a distribuição das proteínas é mais equilibrada, estando ambas presentes nas duas fases em concentrações mais ou menos semelhantes à excepção das duas primeiras situações em que se observa que a β -lactoglobulina está mais concentrada na fase inferior do sistema. Nos ensaios efectuados na gama de baixos pesos moleculares com as proteínas comerciais puras tinha-se verificado que as proteínas se deslocavam para a fase superior, o que seria de esperar pois quanto menor o peso molecular do polímero maior a facilidade para a proteína se acomodar nessa fase (fase superior).

Ao contrário do que se tinha constatado para as proteínas puras em que, dificilmente a gama de baixos pesos moleculares de PEG permitiria uma separação das duas proteínas, no caso da utilização destes mesmos sistemas com concentrado proteico verificou-se que a gama de baixos pesos moleculares é melhor que a gama mais elevada apesar de não se encontrar nenhuma situação óptima para a separação.

3.2.2 Sistemas compostos por PEG e Sais

3.2.2.1 Sistemas compostos por PEG e Fosfato

Nos ensaios efectuados anteriormente com as proteínas puras verificou-se que a gama de pesos moleculares de PEG mais elevada não permite separar as duas proteínas pois estas têm tendência para se deslocar para a fase inferior do sistema. Esta tendência foi confirmada por electroforese SDS PAGE (Figura 3.37) para ensaios realizados com concentrado proteico de soro. Os sistemas testados foram 18% p/p PEG6000 + 14% p/p Fosfato, pH 7,0; 16% p/p PEG8000 + 14% p/p Fosfato, pH 8,0 e 14% p/p PEG8000 + 14% p/p Fosfato, pH 8,0.

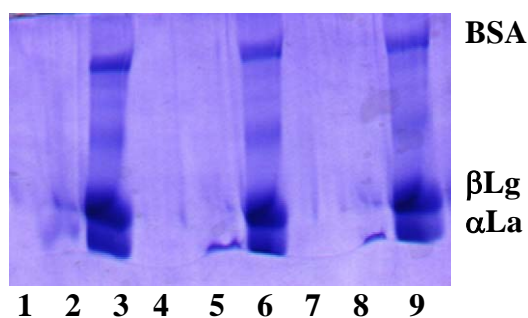


Figura 3.37 Electroforese SDS PAGE. Linha 2/3 – Sistema 18% p/p PEG6000 + 14% p/p Fosfato, pH 7,0 (fase superior e inferior respectivamente). Linha 5/6 – 16% p/p PEG8000 + 14% p/p Fosfato, pH 8,0 (fase superior e inferior respectivamente). Linha 8/9 - Sistema 14% p/p PEG8000 + 14% p/p Fosfato, pH 8,0 (fase superior e inferior respectivamente).

Na gama de baixos pesos moleculares de PEG verificou-se nos ensaios com proteínas puras que para PEG1500 consegue-se obter a β -lactoglobulina praticamente toda na fase inferior e, para PEG600 a α -lactalbumina praticamente toda na fase superior. Nos ensaios com concentrado proteico foram testadas as seguintes situações: 16% p/p PEG600 + 14% p/p Fosfato, pH 6,0; 16% p/p PEG1500 + 14% p/p Fosfato, pH 8,0; 14% p/p PEG900 + 14% p/p Fosfato, pH 6,0; 12% p/p PEG1500 + 20% p/p Fosfato, pH 7,0 e 12% p/p PEG1500 + 20% p/p Fosfato + 0,6M NaCl, pH 7,0. Os cromatogramas obtidos encontram-se reunidos nas Figuras 3.38 a 3.47.

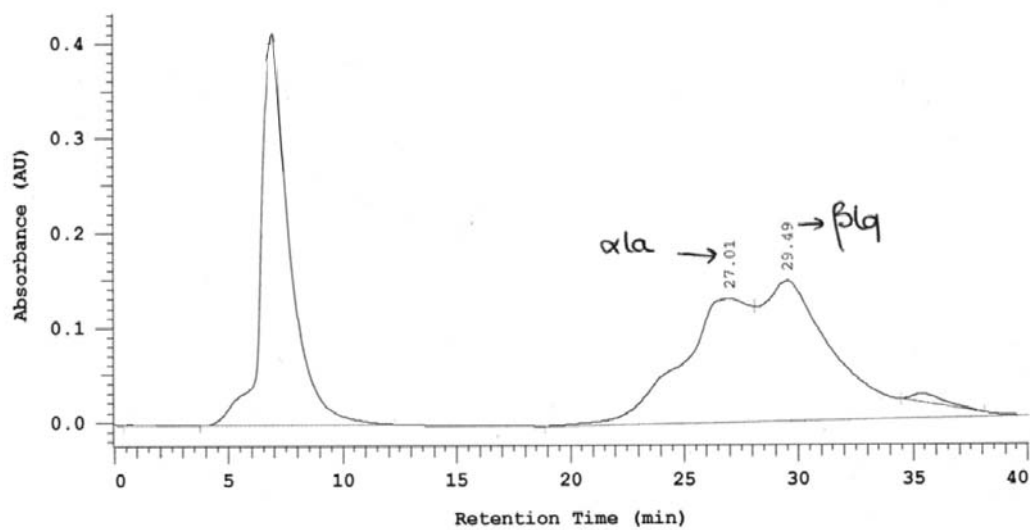


Figura 3.38 Cromatograma FPLC obtido para a FASE SUPERIOR de um sistema 16% p/p PEG600 + 14% p/p Fosfato, pH 6.0. Neste ensaio foi utilizado concentrado proteico 10% p/p. Condições de separação: TA – Tris/HCl 20 mM pH 8.0, TB – TA + 1M NaCl, coluna: MonoQ HR5/5 Pharmacia.

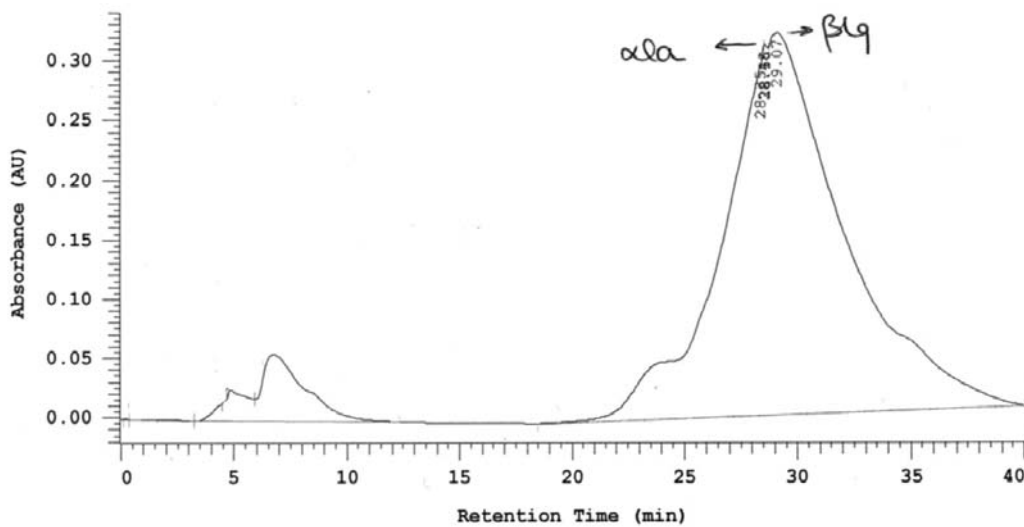


Figura 3.39 Cromatograma FPLC obtido para a FASE INFERIOR de um sistema 16% p/p PEG600 + 14% p/p Fosfato, pH 6.0. Neste ensaio foi utilizado concentrado proteico 10% p/p. Condições de separação: TA – Tris/HCl 20 mM pH 8.0, TB – TA + 1M NaCl, coluna: MonoQ HR5/5 Pharmacia.

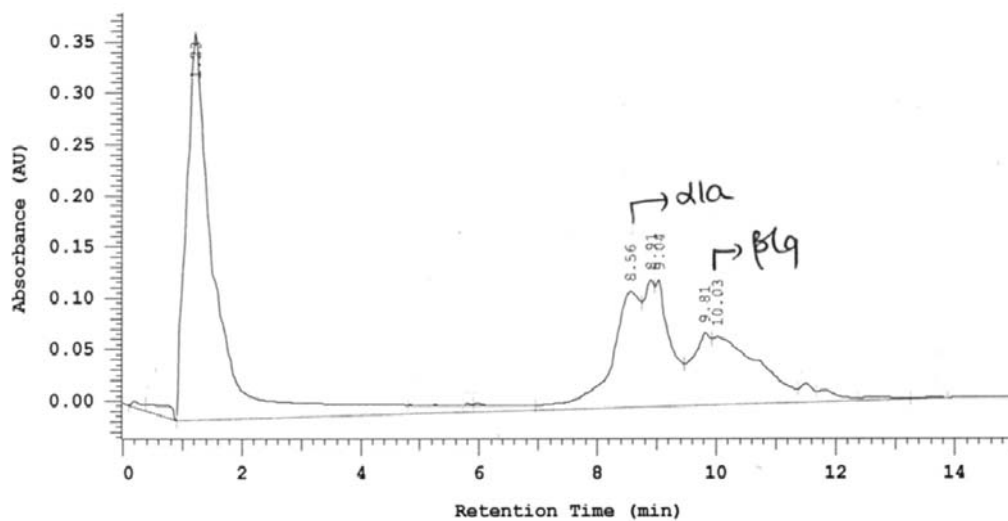


Figura 3.40 Cromatograma FPLC obtido para a FASE SUPERIOR de um sistema 16%p/p PEG1500 + 14%p/p Fosfato, pH 8.0. Neste ensaio foi utilizado concentrado proteico 10%p/p. Condições de separação: TA – Tris/HCl 20 mM pH 8.0, TB – TA + 1M NaCl, coluna: MonoQ HR5/5 Pharmacia.

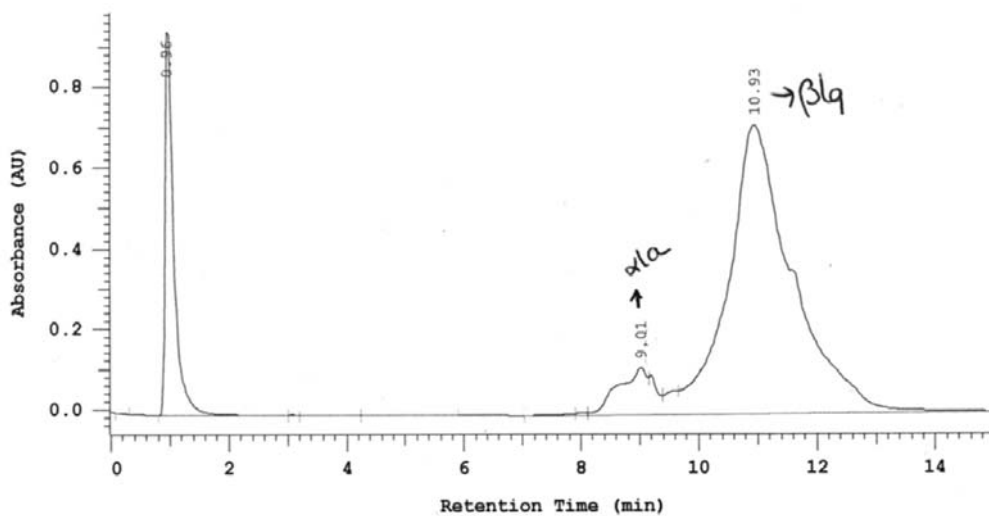


Figura 3.41 Cromatograma FPLC obtido para a FASE INFERIOR de um sistema 16%p/p PEG1500 + 14%p/p Fosfato, pH 8.0. Neste ensaio foi utilizado concentrado proteico 10%p/p. Condições de separação: TA – Tris/HCl 20 mM pH 8.0, TB – TA + 1M NaCl, coluna: MonoQ HR5/5 Pharmacia.

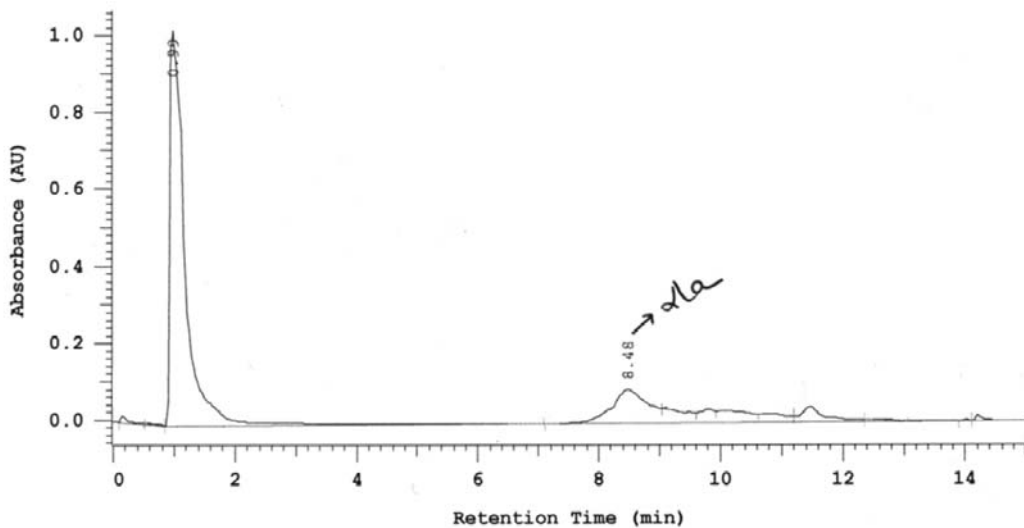


Figura 3.42 Cromatograma FPLC obtido para a FASE SUPERIOR de um sistema 14%p/p PEG900 + 14%p/p Fosfato, pH 6.0. Neste ensaio foi utilizado concentrado proteico 10%p/p. Condições de separação: TA – Tris/HCl 20 mM pH 8.0, TB – TA + 1M NaCl, coluna: MonoQ HR5/5 Pharmacia.

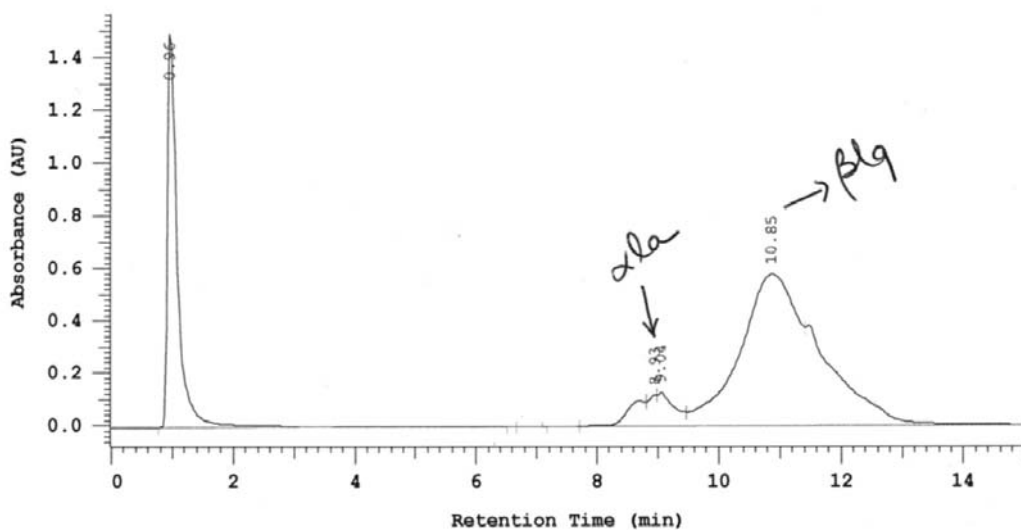


Figura 3.43 Cromatograma FPLC obtido para a FASE INFERIOR de um sistema 14%p/p PEG900 + 14%p/p Fosfato, pH 6.0. Neste ensaio foi utilizado concentrado proteico 10%p/p. Condições de separação: TA – Tris/HCl 20 mM pH 8.0, TB – TA + 1M NaCl, coluna: MonoQ HR5/5 Pharmacia.

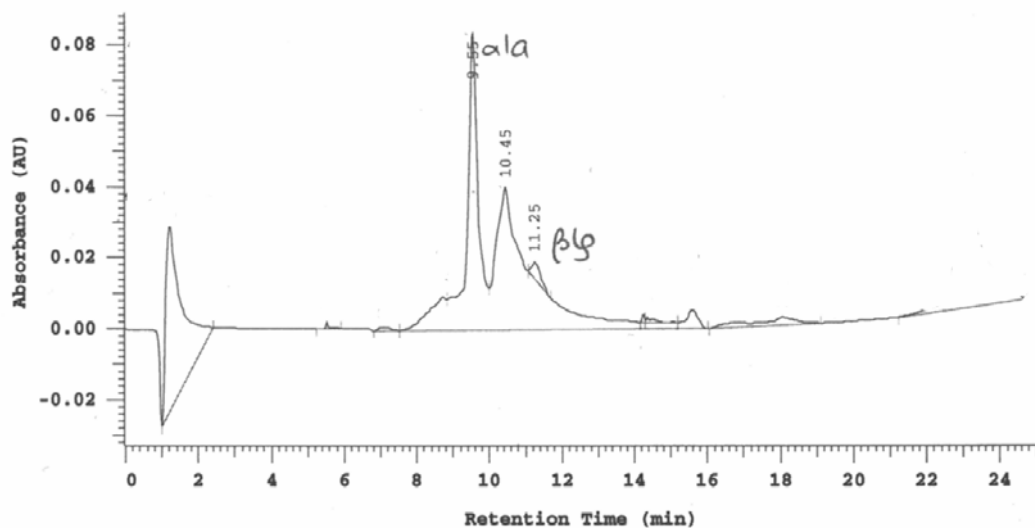


Figura 3.44 Cromatograma FPLC obtido para a FASE SUPERIOR de um sistema 12%p/p PEG1500 + 20%p/p Fosfato, pH 7.0. Neste ensaio foi utilizado concentrado proteico 10%p/p. Condições de separação: TA – Tris/HCl 20 mM pH 8.0, TB – TA + 1M NaCl, coluna: MonoQ HR5/5 Pharmacia.

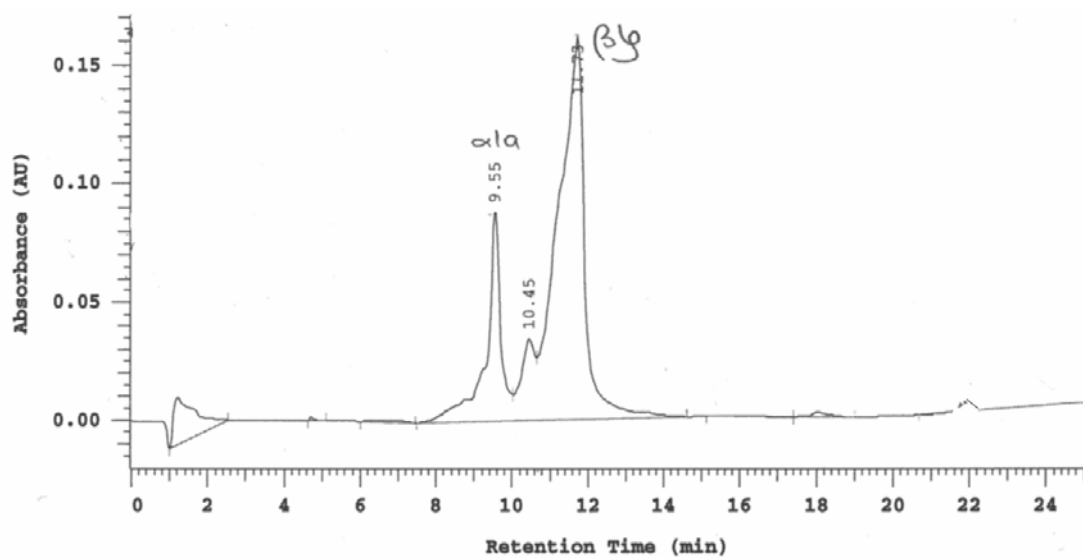


Figura 3.45 Cromatograma FPLC obtido para a FASE INFERIOR de um sistema 12%p/p PEG1500 + 20%p/p Fosfato, pH 7.0. Neste ensaio foi utilizado concentrado proteico 10%p/p. Condições de separação: TA – Tris/HCl 20 mM pH 8.0, TB – TA + 1M NaCl, coluna: MonoQ HR5/5 Pharmacia.

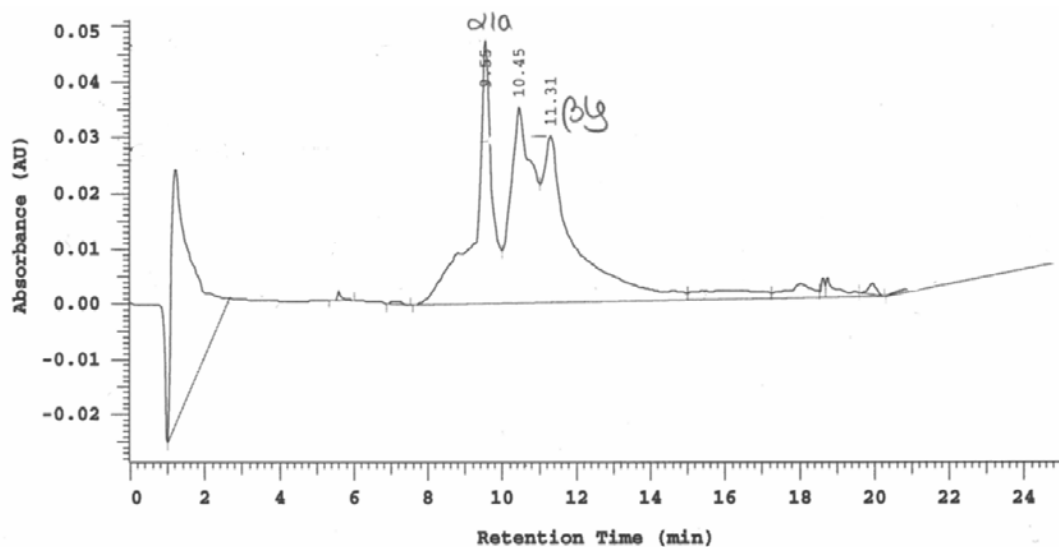


Figura 3.46 Cromatograma FPLC obtido para a FASE SUPERIOR de um sistema 12%p/p PEG1500 + 20%p/p Fosfato, 0,6M NaCl, pH 7.0. Neste ensaio foi utilizado concentrado proteico 10%p/p. Condições de separação: TA – Tris/HCl 20 mM pH 8.0, TB – TA + 1M NaCl, coluna: MonoQ HR5/5 Pharmacia.

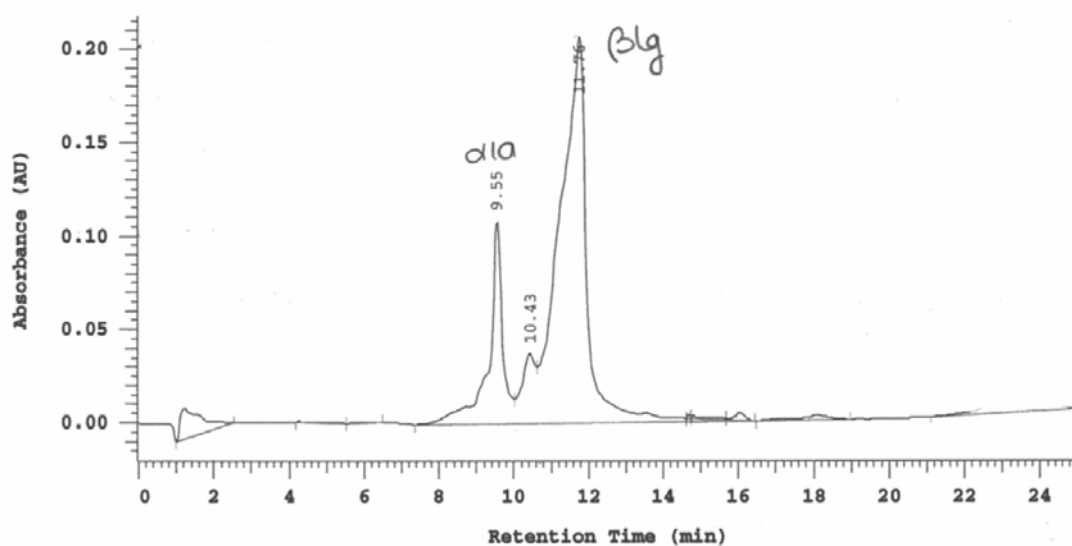


Figura 3.47 Cromatograma FPLC obtido para a FASE INFERIOR de um sistema 12%p/p PEG1500 + 20%p/p Fosfato, 0,6M NaCl, pH 7.0. Neste ensaio foi utilizado concentrado proteico 10%p/p. Condições de separação: TA – Tris/HCl 20 mM pH 8.0, TB – TA + 1M NaCl, coluna: MonoQ HR5/5 Pharmacia.

De um modo geral verificou-se que os valores obtidos com concentrado proteico de soro são bastante diferentes dos obtidos com as proteínas puras (Tabela 3.5) e, à excepção da situação 14% p/p PEG900 +14% p/p Fosfato, pH 6,0, em que se obtém a β -lactoglobulina toda na fase inferior e a α -lactalbumina igualmente distribuída nas duas fases, todas as outras situações não permitem uma separação efectiva das duas proteínas (Figuras 3.48 e 3.49).

Tabela 3.5 Coeficientes de partição das proteínas puras e das proteínas do concentrado proteico de soro na gama de baixos pesos moleculares, no sistema PEG-Fosfato.

Sistema	α La pura	β Lg pura	α La CP	β Lg CP
16% p/p PEG600 +14% p/p Fosfato, pH 6,0	3,50	0,83	0,38	0,46
16% p/p PEG1500 +14% p/p Fosfato, pH 8,0	1,68	0,38	1,20	0,09
14% p/p PEG900 +14% p/p Fosfato, pH 6,0	3,80	1,39	1,00	0
12% p/p PEG1500 + 20% p/p Fosfato, pH 7.0	-	-	0,93	0,24
12% p/p PEG1500 + 20% p/p Fosfato, 0,6M NaCl, pH 7.0	-	-	0,45	0,17

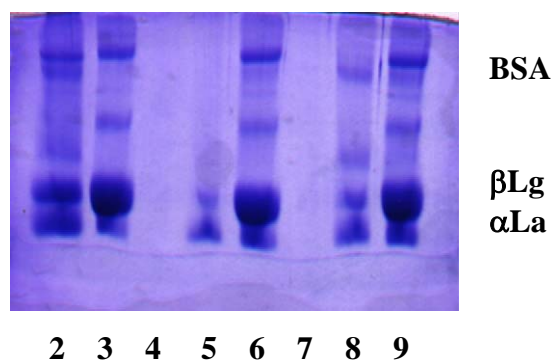


Figura 3.48 Electroforese SDS PAGE. Linha 2/3 – Sistema 16% p/p PEG600 +14% p/p Fosfato, pH 6,0 (fase superior e inferior respectivamente). Linha 5/6 – 16% p/p PEG1500 +14% p/p Fosfato, pH 8,0 (fase superior e inferior respectivamente). Linha 8/9 - Sistema 14% p/p PEG900 +14% p/p Fosfato, pH 6,0 (fase superior e inferior respectivamente).

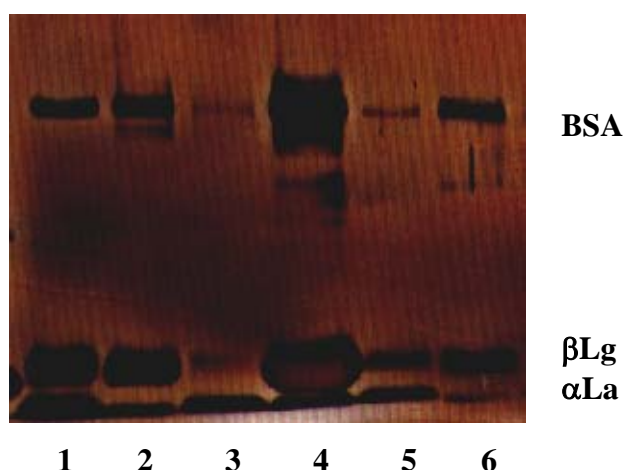


Figura 3.49 Electroforese SDS PAGE. Linha 1/2 – Sistema 12%w/w PEG1500 + 20% w/w Fosfato (fase superior e inferior respectivamente).

3.2.2.2 Sistemas compostos por PEG e Sulfato

O sistema PEG–Sulfato foi aquele que, à partida permitiu uma melhor separação das proteínas puras.

Tal como para o sistema PEG-Fosfato, nos ensaios efectuados anteriormente com as proteínas puras verificou-se que a gama de pesos moleculares de PEG mais elevada não permite separar as duas proteínas pois estas têm tendência para se deslocar para a fase inferior do sistema. Esta tendência foi confirmada por electroforese SDS PAGE (Figura 3.50) para ensaios realizados com concentrado proteico de soro. Os sistemas testados foram 18%p/p PEG6000 + 14% p/p Sulfato, pH 7,0; 14% p/p PEG6000 + 14% p/p Sulfato, pH 8,0 e 16% p/p PEG6000 + 14% p/p Sulfato, pH 8,0.

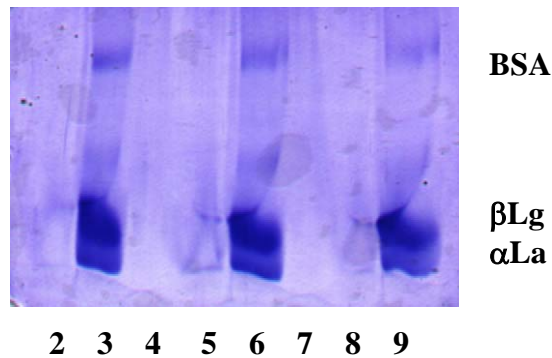


Figura 3.50 Electroforese SDS PAGE. Linha 2/3 – Sistema 18%p/p PEG6000 + 14% p/p Sulfato, pH 7,0 (fase superior e inferior respectivamente). Linha 5/6 – 14% p/p PEG6000 + 14% p/p Sulfato, pH 8,0 (fase superior e inferior respectivamente). Linha 8/9 - Sistema 16% p/p PEG6000 + 14% p/p Sulfato, pH 8,0 (fase superior e inferior respectivamente).

Na gama de baixos pesos moleculares de PEG verificou-se nos ensaios com proteínas puras que para PEG1500 consegue-se obter a β-lactoglobulina praticamente toda na fase inferior e, para PEG600 a α-lactalbumina praticamente toda na fase superior. Nos ensaios com concentrado proteico foram testadas as seguintes situações:

- 16% p/p PEG600 + 16% p/p Sulfato + 200 mM NaCl, pH 7,5
- 14% p/p PEG1500 + 14% p/p Sulfato + 200 mM NaCl, pH 7,5
- 16% p/p PEG900 + 15% p/p Sulfato, pH 7,5
- 16% p/p PEG900 + 15% p/p Sulfato + 200 mM K₂SO₄, pH 7,5
- 16% p/p PEG900 + 15% p/p Sulfato + 200 mM NaCl, pH 7,5
- 16% p/p PEG600 + 16% p/p Sulfato, pH 7,5
- 16% p/p PEG600 + 16% p/p Sulfato + 200 mM K₂SO₄, pH 7,5
- 12% p/p PEG1500 + 20% p/p Sulfato, pH 7,0
- 12% p/p PEG1500 + 20% p/p Sulfato + 0,6M NaCl, pH 7,0
- 18% p/p PEG900 + 14% p/p Sulfato, pH 6,0
- 14% p/p PEG900 + 14% p/p Sulfato, pH 7,0
- 16% p/p PEG600 + 14% p/p Sulfato, pH 6,0

Os cromatogramas obtidos encontram-se reunidos nas Figuras 3.51 até 3.74.

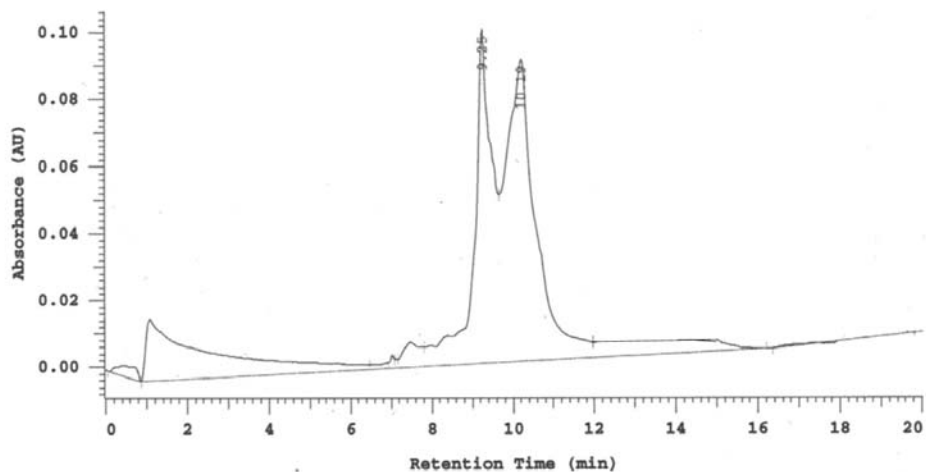


Figura 3.51 Cromatograma FPLC obtido para a FASE SUPERIOR de um sistema 16%p/p PEG600 + 16%p/p Sulfato, pH 7.5. Neste ensaio foi utilizado concentrado proteico 10%p/p. Condições de separação: TA – Tris/HCl 20 mM pH 8.0, TB – TA + 1M NaCl, coluna: MonoQ HR5/5 Pharmacia.

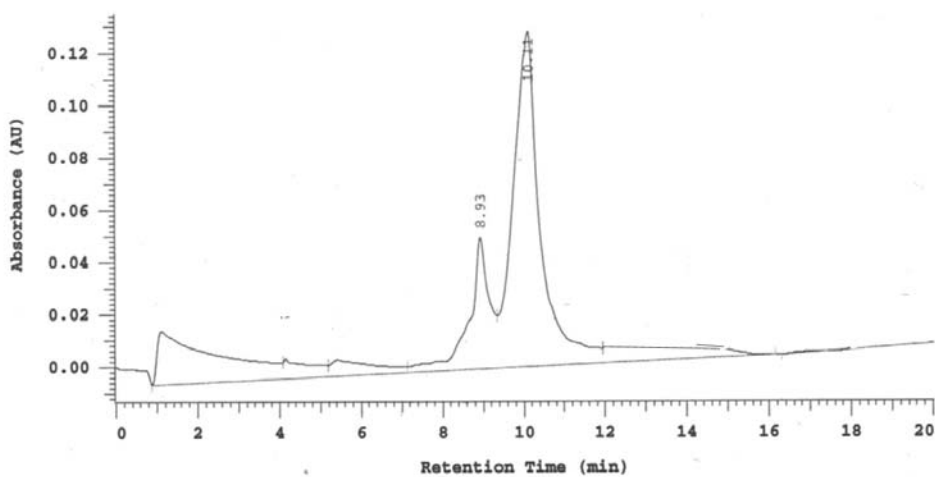


Figura 3.52 Cromatograma FPLC obtido para a FASE INFERIOR de um sistema 16%p/p PEG600 + 16%p/p Sulfato, pH 7.5. Neste ensaio foi utilizado concentrado proteico 10%p/p. Condições de separação: TA – Tris/HCl 20 mM pH 8.0, TB – TA + 1M NaCl, coluna: MonoQ HR5/5 Pharmacia.

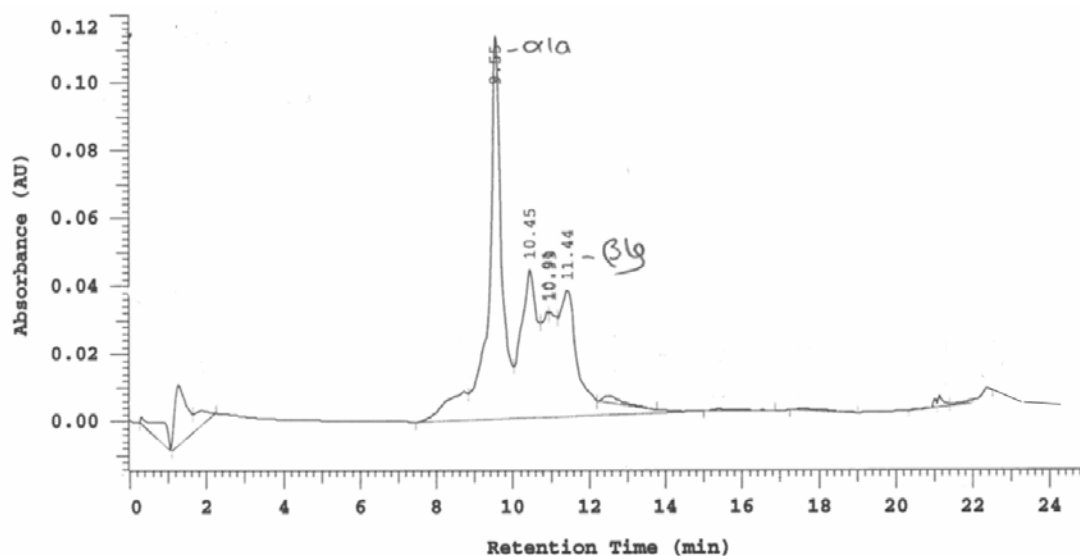


Figura 3.53 Cromatograma FPLC obtido para a FASE SUPERIOR de um sistema 16% p/p PEG600 + 16% p/p Sulfato, 200mM NaCl, pH 7.5. Neste ensaio foi utilizado concentrado proteico 5% p/p. Condições de separação: TA – Tris/HCl 20 mM pH 8.0, TB – TA + 1M NaCl, coluna: MonoQ HR5/5 Pharmacia.

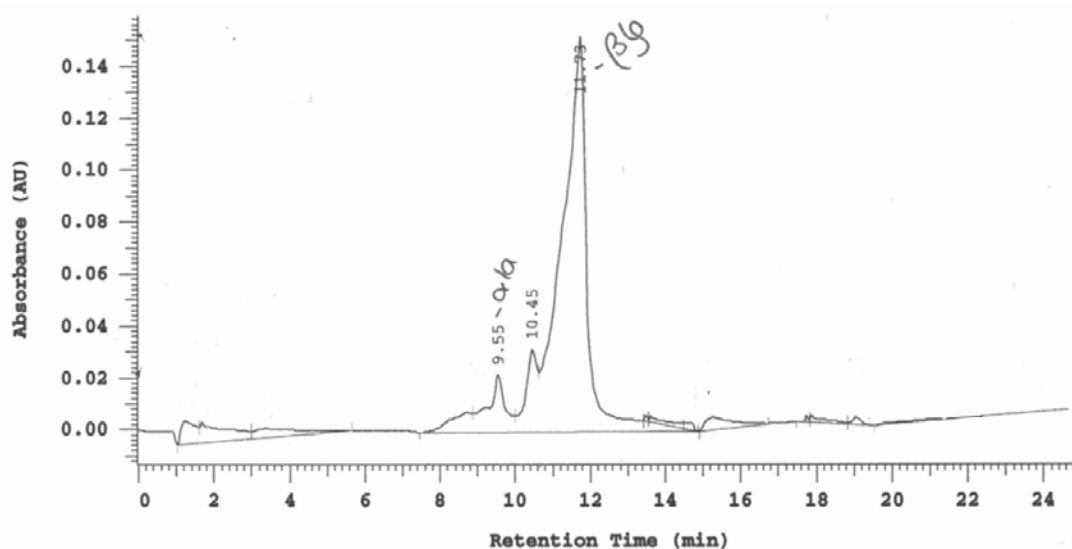


Figura 3.54 Cromatograma FPLC obtido para a FASE INFERIOR de um sistema 16% p/p PEG600 + 16% p/p Sulfato, 200mM NaCl, pH 7.5. Neste ensaio foi utilizado concentrado proteico 5% p/p. Condições de separação: TA – Tris/HCl 20 mM pH 8.0, TB – TA + 1M NaCl, coluna: MonoQ HR5/5 Pharmacia.

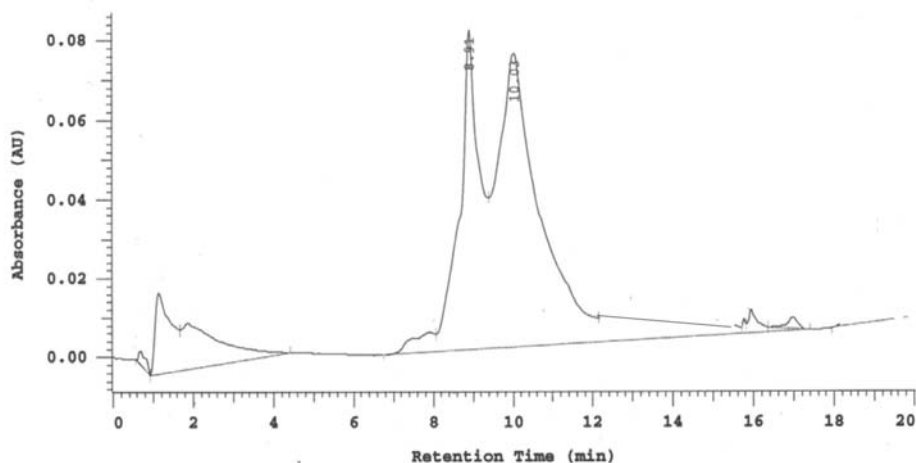


Figura 3.55 Cromatograma FPLC obtido para a FASE SUPERIOR de um sistema 16% p/p PEG600 + 16% p/p Sulfato, 200 mM K_2SO_4 . Neste ensaio foi utilizado concentrado proteico 10 % p/p. Condições de separação: TA – Tris/HCl 20 mM pH 8.0, TB – TA + 1M NaCl, coluna: MonoQ HR5/5 Pharmacia.

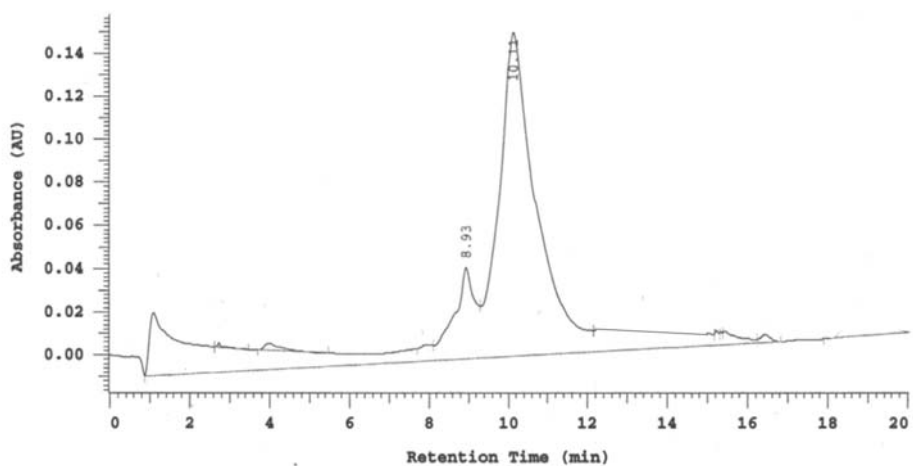


Figura 3.56 Cromatograma FPLC obtido para a FASE INFERIOR de um sistema 16% p/p PEG600 + 16% p/p Sulfato, 200 mM K_2SO_4 . Neste ensaio foi utilizado concentrado proteico 10 % p/p. Condições de separação: TA – Tris/HCl 20 mM pH 8.0, TB – TA + 1M NaCl, coluna: MonoQ HR5/5 Pharmacia.

Verificou-se que a introdução de sais no sistema promove uma diminuição dos coeficientes de partição e, embora este sistema permita separar as duas proteínas, verificaram-se ao longo deste estudo outras situações mais favoráveis em termos de separação.

No sistema em que se introduziu 200 mM de NaCl verificou-se que os resultados obtidos com concentrado de ultrafiltração permitem obter resultados semelhantes aos

obtidos com as proteínas puras, consegue-se uma concentração de α -lactalbumina na fase superior ($k_{\alpha la} = 5,70$) e de β -lactoglobulina na fase inferior ($k_{\beta lg} = 0,263$).

Este mesmo sistema com 200 mM de cloreto de sódio foi testado com PEG 1500 e os cromatogramas obtidos encontram-se nas Figuras 3.57 e 3.58.

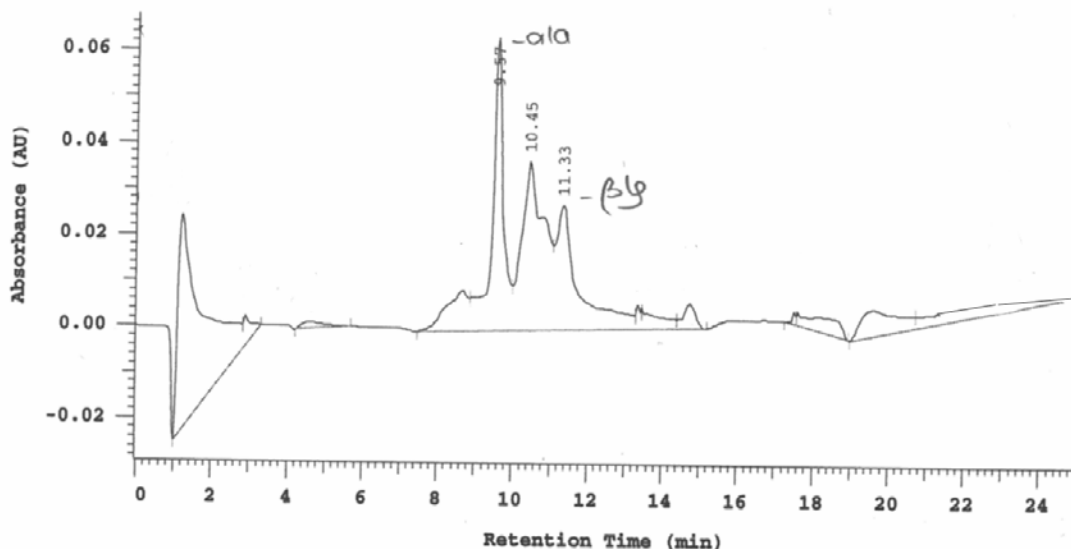


Figura 3.57 Cromatograma FPLC obtido para a FASE SUPERIOR de um sistema 14%p/p PEG1500 + 14%p/p Sulfato, 200mM NaCl, pH 7.5. Neste ensaio foi utilizado concentrado proteico 5%p/p. Condições de separação: TA – Tris/HCl 20 mM pH 8.0, TB – TA + 1M NaCl, coluna: MonoQ HR5/5 Pharmacia.

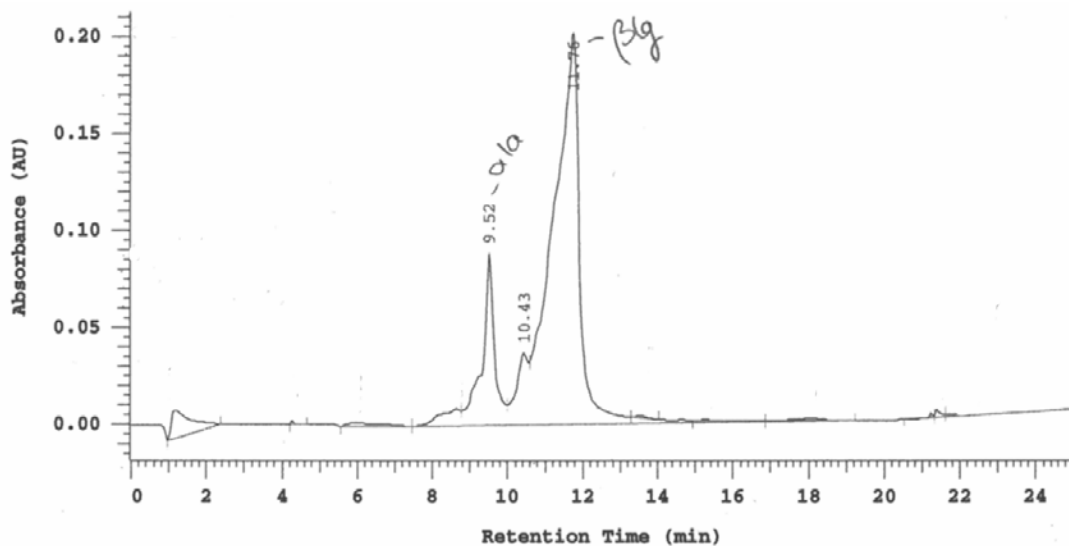


Figura 3.58 Cromatograma FPLC obtido para a FASE INFERIOR de um sistema 14%p/p PEG1500 + 14%p/p Sulfato, 200mM NaCl, pH 7.5. Neste ensaio foi utilizado concentrado proteico 5%p/p. Condições de separação: TA – Tris/HCl 20 mM pH 8.0, TB – TA + 1M NaCl, coluna: MonoQ HR5/5 Pharmacia.

Observando as Figuras 3.57 e 3.58 é possível verificar que com PEG1500 ambas as proteínas se deslocam para a fase inferior do sistema e não se consegue separar as proteínas, tendo-se obtido um $k_{\alpha Ia} = 0,73$ um $k_{\beta Ig} = 0,14$.

Outro sistema testado com o concentrado proteico de soro foi 16% p/p PEG900 + 15% p/p Sulfato, pH 7,50, sem sal, com 200 mM de K_2SO_4 e com 600 mM de NaCl.

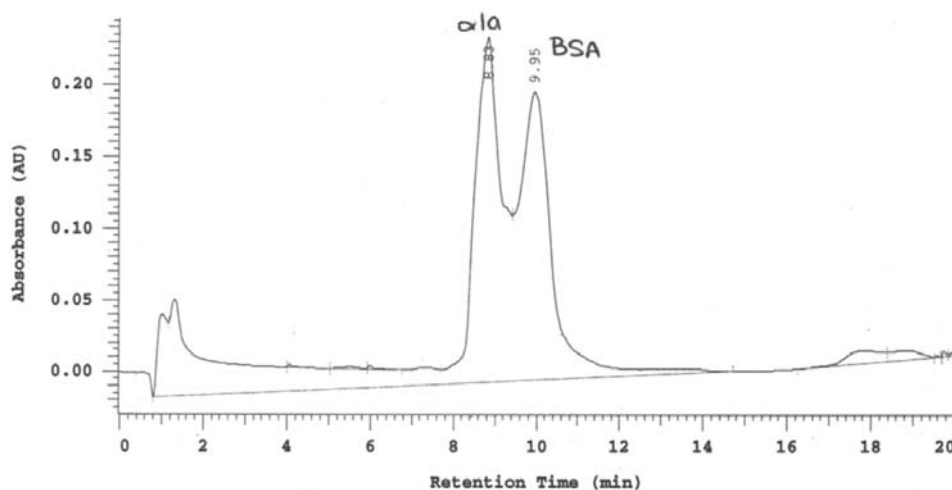


Figura 3.59 Cromatograma FPLC obtido para a FASE SUPERIOR de um sistema 16% p/p PEG900 + 15% p/p Sulfato, pH 7.5. Neste ensaio foi utilizado concentrado proteico 10% p/p. Condições de separação: TA – Tris/HCl 20 mM pH 8.0, TB – TA + 1M NaCl, coluna: MonoQ HR5/5 Pharmacia.

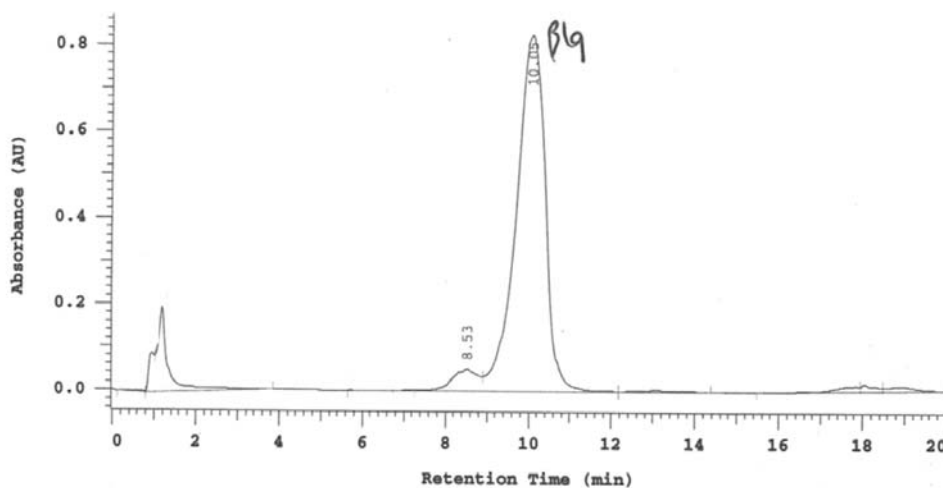


Figura 3.60 Cromatograma FPLC obtido para a FASE INFERIOR de um sistema 16% p/p PEG900 + 15% p/p Sulfato, pH 7.5. Neste ensaio foi utilizado concentrado proteico 5% p/p. Condições de separação: TA – Tris/HCl 20 mM pH 8.0, TB – TA + 1M NaCl, coluna: MonoQ HR5/5 Pharmacia.

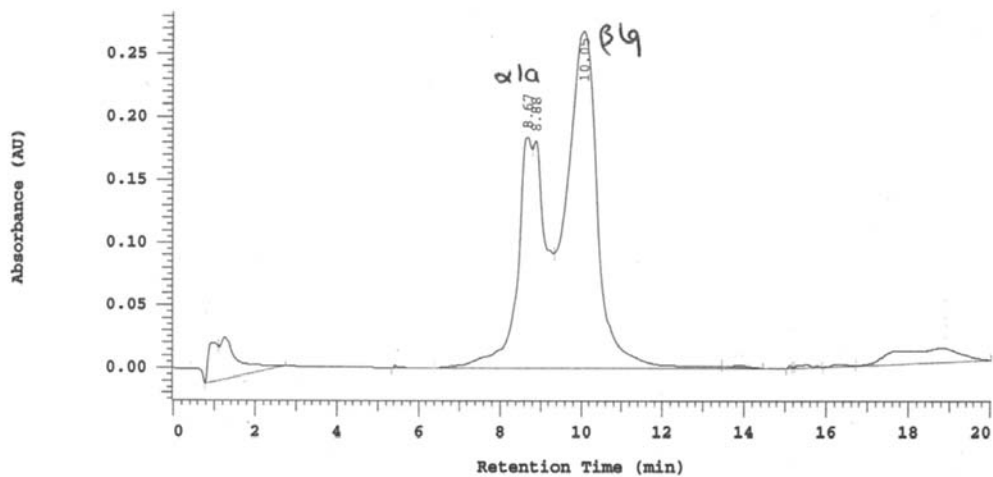


Figura 3.61 Cromatograma FPLC obtido para a FASE SUPERIOR de um sistema 16% p/p PEG900 + 15% p/p Sulfato, 200 mM K_2SO_4 , pH 7,50. Neste ensaio foi utilizado concentrado proteico 10 % p/p. Condições de separação: TA – Tris/HCl 20 mM pH 8,0, TB – TA + 1M NaCl, coluna: MonoQ HR5/5 Pharmacia.

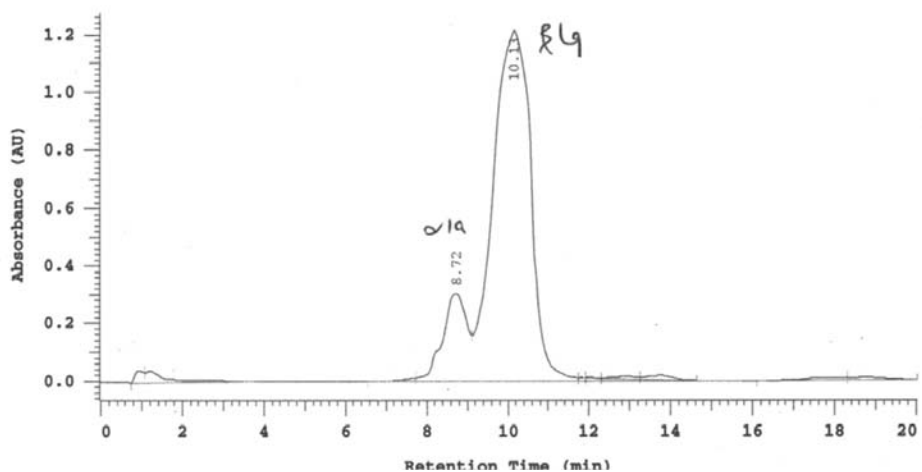


Figura 3.62 Cromatograma FPLC obtido para a FASE INFERIOR de um sistema 16% p/p PEG900 + 15% p/p Sulfato, 200 mM K_2SO_4 , pH 7,50. Neste ensaio foi utilizado concentrado proteico 10 % p/p. Condições de separação: TA – Tris/HCl 20 mM pH 8,0, TB – TA + 1M NaCl, coluna: MonoQ HR5/5 Pharmacia.

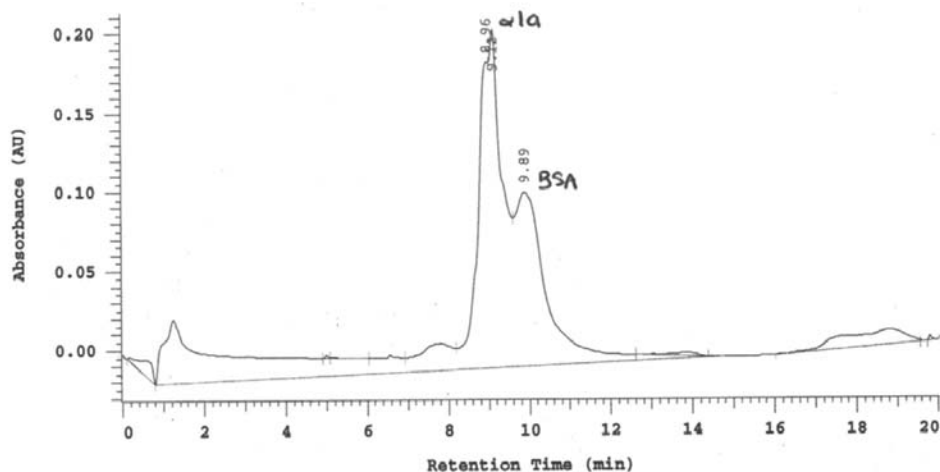


Figura 3.63 Cromatograma FPLC obtido para a FASE SUPERIOR de um sistema 16% p/p PEG900 + 15% p/p Sulfato, 600 mM NaCl, pH 7,50. Neste ensaio foi utilizado concentrado proteico 10 % p/p. Condições de separação: TA – Tris/HCl 20 mM pH 8,0, TB – TA + 1M NaCl, coluna: MonoQ HR5/5 Pharmacia.

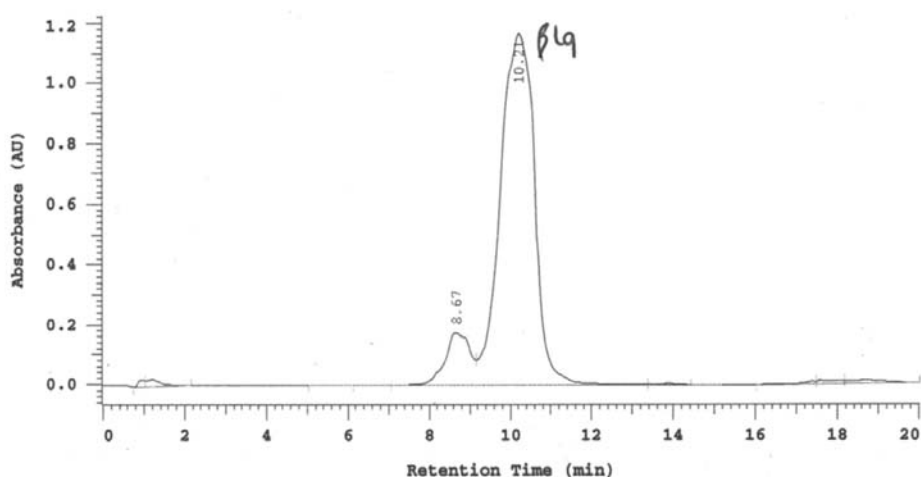


Figura 3.64 Cromatograma FPLC obtido para a FASE INFERIOR de um sistema 16% p/p PEG900 + 15% p/p Sulfato, 600 mM NaCl, pH 7,50. Neste ensaio foi utilizado concentrado proteico 10 % p/p. Condições de separação: TA – Tris/HCl 20 mM pH 8,0, TB – TA + 1M NaCl, coluna: MonoQ HR5/5 Pharmacia.

Verificou-se tal como anteriormente que, os sais promovem uma diminuição do coeficiente de partição da α -lactalbumina, e no caso da β -lactoglobulina verificou-se que, com sulfato de potássio alguma proteína se desloca para a fase superior. Este sistema, na ausência de sais permite obter toda a β -lactoglobulina na fase inferior ($k_{\beta lg} = 0$) e, grande parte da α -lactalbumina na fase superior ($k_{\alpha la} = 4,60$).

O sistema 12% p/p PEG1500 + 20% p/p Sulfato, pH 7,0 foi também estudado e, para o mesmo se apresentam os cromatogramas e gel de electroforese SDS PAGE obtidos. Este sistema foi testado na ausência e na presença de 0,6 M de NaCl.

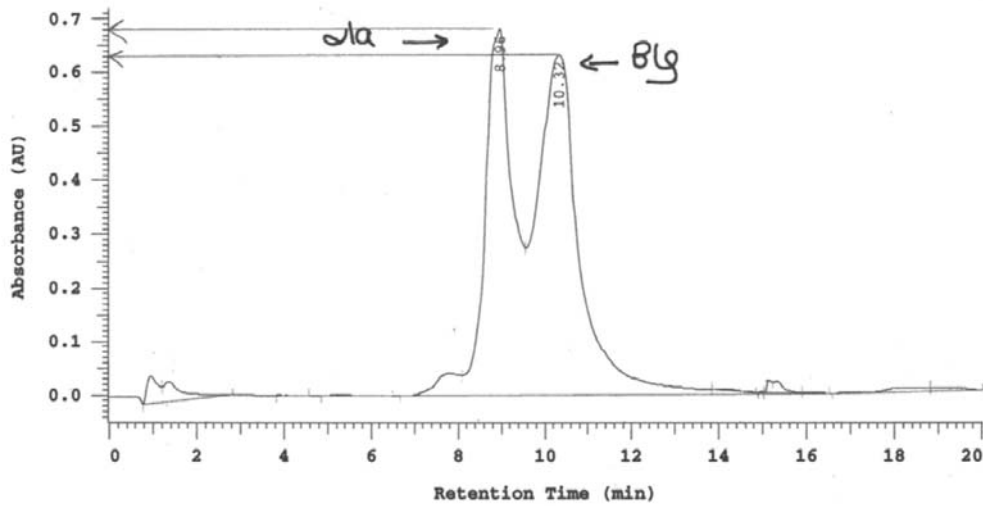


Figura 3.65 Cromatograma FPLC obtido para a FASE SUPERIOR de um sistema 12%p/p PEG1500 + 20%p/p Sulfato, pH 7,0. Neste ensaio foi utilizado concentrado proteico 10 % p/p. Condições de separação: TA – Tris/HCl 20 mM pH 8,0, TB – TA + 1M NaCl, coluna: MonoQ HR5/5 Pharmacia.

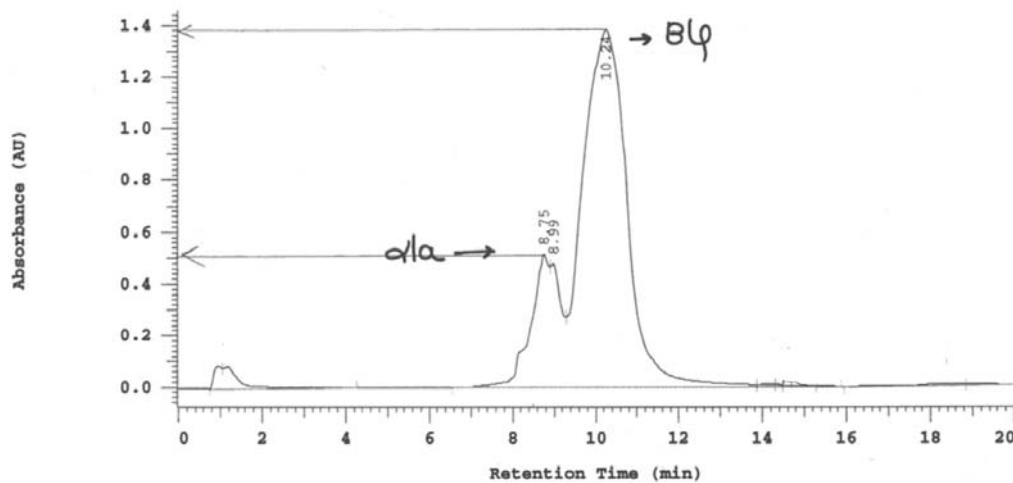


Figura 3.66 Cromatograma FPLC obtido para a FASE INFERIOR de um sistema 12%p/p PEG1500 + 20%p/p Sulfato, pH 7,0. Neste ensaio foi utilizado concentrado proteico 10 % p/p. Condições de separação: TA – Tris/HCl 20 mM pH 8,0, TB – TA + 1M NaCl, coluna: MonoQ HR5/5 Pharmacia.

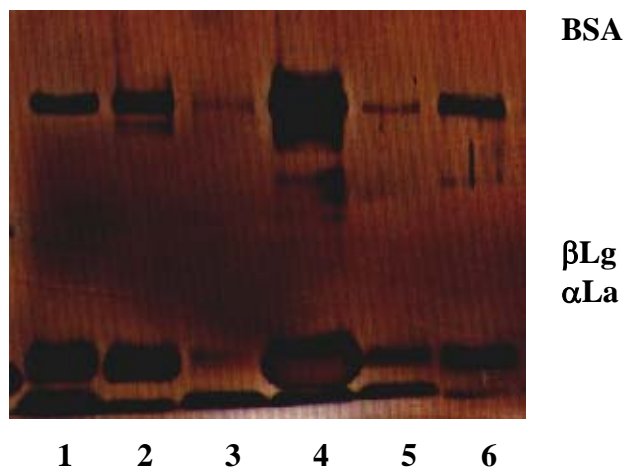


Figura 3.67 Electroforese SDS PAGE. Linha 3/4 - Sistema 12%p/p PEG1500 + 20% p/p Sulfato (fase superior e inferior respectivamente). Linha 5/6 - Sistema 12%p/p PEG1500 + 20% p/p Sulfato + 0.6 M NaCl (fase superior e inferior respectivamente).

Verificou-se que, embora se consigam separar as duas proteínas, existem situações mais favoráveis anteriormente apresentadas e que, mais uma vez a introdução de NaCl não foi favorável à separação das proteínas, como se pode observar pela comparação das linhas 3/4 e 5/6 do gel de electroforese SDS PAGE.

Finalmente foram estudados os sistemas 18% p/p PEG900 + 14% p/p Sulfato, pH 6,0; 14% p/p PEG900 + 14% p/p Sulfato, pH 7,0 e 16% p/p PEG600 + 14% p/p Sulfato, pH 6,0 (Figuras 3.68 até 3.63).

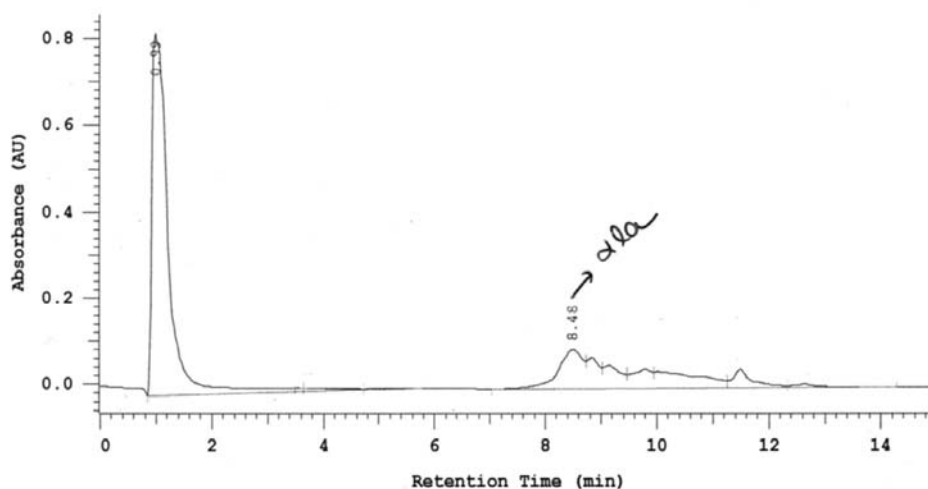


Figura 3.68 Cromatograma FPLC obtido para a FASE SUPERIOR de um sistema 18% p/p PEG900 + 14% p/p Sulfato, pH 6,0. Neste ensaio foi utilizado concentrado proteico 10 % p/p. Condições de separação: TA – Tris/HCl 20 mM pH 8,0, TB – TA + 1M NaCl, coluna: MonoQ HR5/5 Pharmacia.

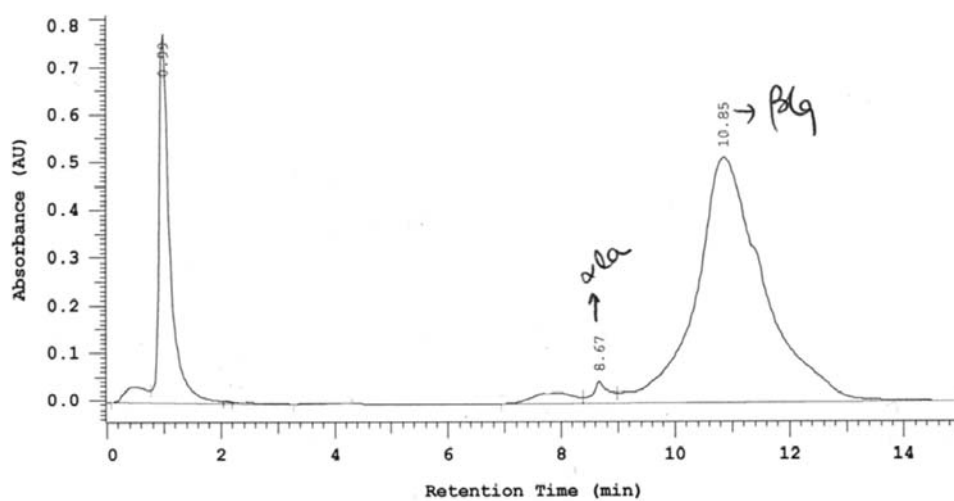


Figura 3.69 Cromatograma FPLC obtido para a FASE INFERIOR de um sistema 18% p/p PEG900 + 14% p/p Sulfato, pH 6,0. Neste ensaio foi utilizado concentrado proteico 10 % p/p. Condições de separação: TA – Tris/HCl 20 mM pH 8.0, TB – TA + 1M NaCl, coluna: MonoQ HR5/5 Pharmacia.

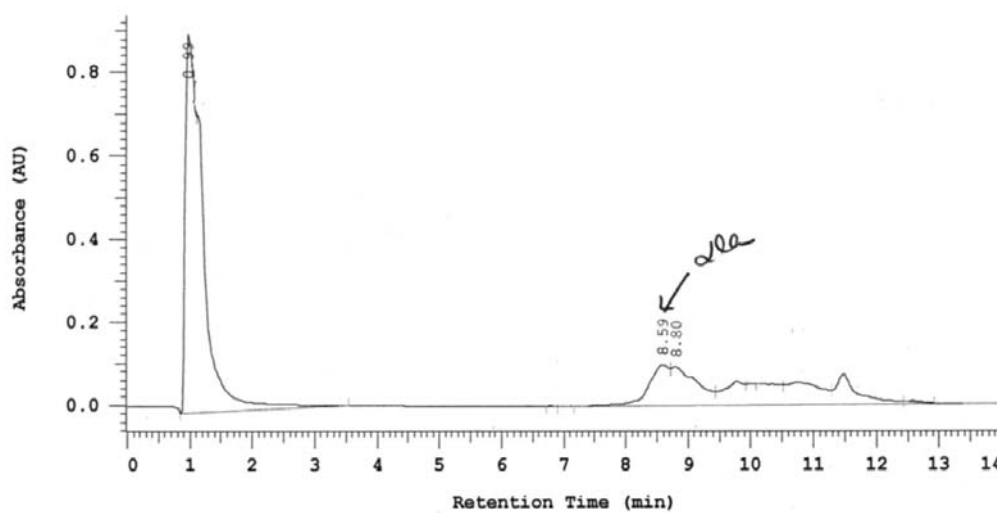


Figura 3.70 Cromatograma FPLC obtido para a FASE SUPERIOR de um sistema 14% p/p PEG900 + 14% p/p Sulfato, pH 7,0. Neste ensaio foi utilizado concentrado proteico 10 % p/p. Condições de separação: TA – Tris/HCl 20 mM pH 8.0, TB – TA + 1M NaCl, coluna: MonoQ HR5/5 Pharmacia.

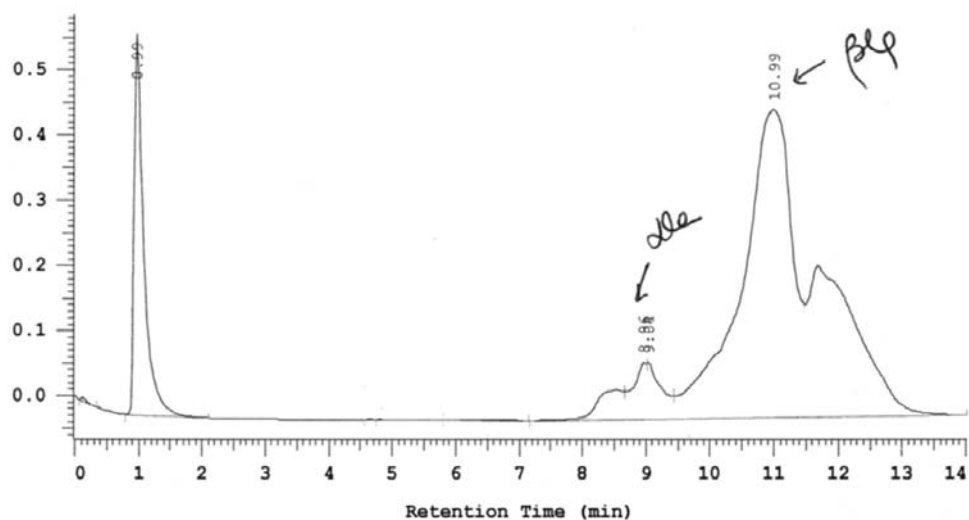


Figura 3.71 Cromatograma FPLC obtido para a FASE INFERIOR de um sistema 14% p/p PEG900 + 14% p/p Sulfato, pH 7,0. Neste ensaio foi utilizado concentrado proteico 10 % p/p. Condições de separação: TA – Tris/HCl 20 mM pH 8.0, TB – TA + 1M NaCl, coluna: MonoQ HR5/5 Pharmacia.

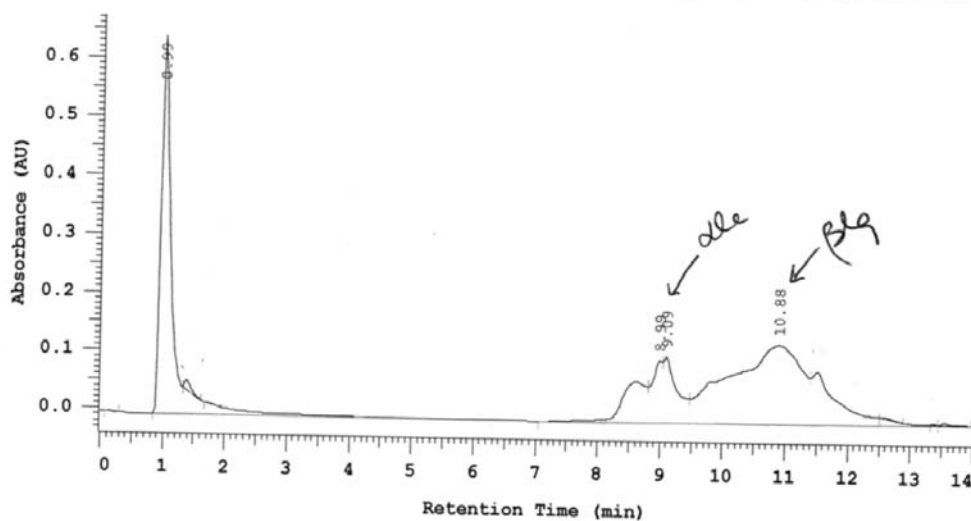


Figura 3.72 Cromatograma FPLC obtido para a FASE SUPERIOR de um sistema 16% p/p PEG600 + 14% p/p Sulfato, pH 6,0. Neste ensaio foi utilizado concentrado proteico 10 % p/p. Condições de separação: TA – Tris/HCl 20 mM pH 8.0, TB – TA + 1M NaCl, coluna: MonoQ HR5/5 Pharmacia.

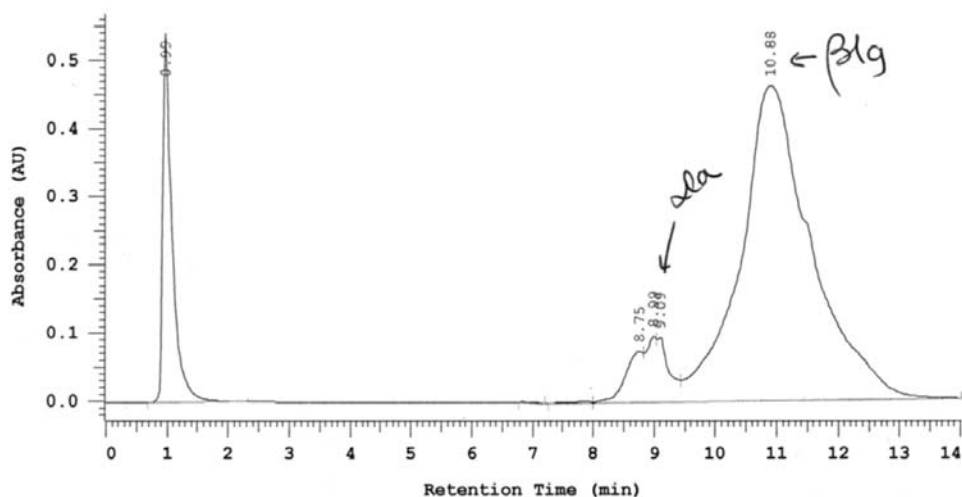


Figura 3.73 Cromatograma FPLC obtido para a FASE INFERIOR de um sistema 16% p/p PEG600 + 14% p/p Sulfato, pH 6,0. Neste ensaio foi utilizado concentrado proteico 10 % p/p. Condições de separação: TA – Tris/HCl 20 mM pH 8,0, TB – TA + 1M NaCl, coluna: MonoQ HR5/5 Pharmacia.

Destes três sistemas testados verificou-se que o último é o menos eficiente em termos de separação, enquanto que os dois primeiros permitem obter toda a β -lactoglobulina na fase inferior do sistema, sendo o sistema efectuado a pH 7,0 o melhor.

De forma a confirmar os resultados obtidos correu-se um gel de electroforese SDS PAGE (Figura 3.74) com alguns dos sistemas testados e verificou-se que as tendências observadas anteriormente para as proteínas puras se mantêm para o concentrado proteico de soro.

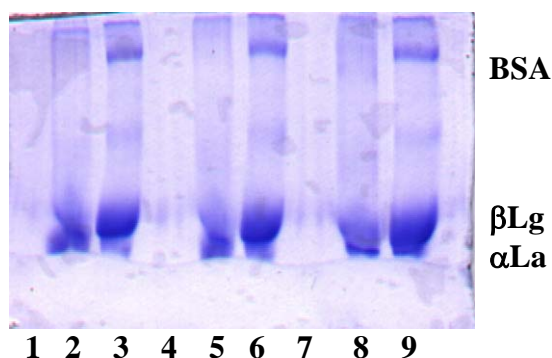


Figura 3.74 Electroforese SDS PAGE. Linha 2/3 - Sistema 18%p/p PEG900 + 14% p/p Sulfato, pH 6,0 (fase superior e inferior respectivamente). Linha 5/6 - Sistema 14%p/p PEG900 + 14% p/p Sulfato, pH 7,0 (fase superior e inferior respectivamente). Linha 8/9 - Sistema 16%p/p PEG600 + 14% p/p Sulfato, pH 6,0 (fase superior e inferior respectivamente).

Tal como para o sistema PEG-Fosfato verificou-se que os valores obtidos com o concentrado proteico de soro são diferentes dos obtidos com as proteínas puras (Tabela 3.6).

Tabela 3.6 Coeficientes de partição das proteínas puras e das proteínas do concentrado proteico de soro na gama de baixos pesos moleculares, no sistema PEG-Sulfato.

Sistema	$\kappa\alpha$ pura	$\kappa\beta$ lg pura	$\kappa\alpha$ CP	$\kappa\beta$ lg CP
16% p/p PEG600 +16% p/p Sulfato, 200 mM NaCl, pH 7,5	-	-	5,70	0,26
14% p/p PEG1500 +14% p/p Sulfato, 200 mM NaCl, pH 7,5	-	-	0,73	0,14
16% p/p PEG900 +15% p/p Sulfato, pH 7,5	5,00	0,26	4,60	0
16% p/p PEG900 +15% p/p Sulfato, 200 mM K ₂ SO ₄ , pH 7,5	3,53	0,19	0,61	0,22
16% p/p PEG900 +15% p/p Sulfato, 600 mM NaCl, pH 7,5	5,73	0,20	1,25	0
16% p/p PEG600 +16% p/p Sulfato, pH 7,5	2,71	1,52	2,00	0,69
16% p/p PEG600 +16% p/p Sulfato, 200 mM K ₂ SO ₄ , pH 7,5	-	-	2,05	0,51
12% p/p PEG1500 +20% p/p Sulfato, pH 7,0	-	-	1,36	0,46
18% p/p PEG900 +14% p/p Sulfato, pH 6,0	31,53	0,42	2,00	0
14% p/p PEG900 +14% p/p Sulfato, pH 7,0	5,21	0,12	2,00	0
16% p/p PEG600 +14% p/p Sulfato, pH 6,0	21,88	2,91	1,25	0,22

Assim, para este sistema as melhores condições ensaiadas foram: 14% p/p PEG900 + 14% p/p Sulfato, pH 7,0 e, 16% p/p PEG900 + 15% p/p Sulfato, pH 7,50, em que se consegue a concentração da β -lactoglobulina na fase inferior, uma vez que esta se desloca exclusivamente para a fase inferior dos sistemas. Com estes sistemas é ainda possível purificar a α -lactalbumina, uma vez que a β -lactoglobulina está toda na fase inferior.

Em qualquer dos sistemas PEG-Reppal ou PEG-sais ensaiados com concentrado proteico verificou-se uma diferença razoável dos coeficientes de partição quando

comparados com os obtidos para as proteínas puras. Essa diferença poderá ser devida a uma maior precipitação das proteínas com os componentes do sistema, ou ainda, devido a uma baixa solubilidade do concentrado como consequência do processo de secagem do mesmo.

Contudo, os resultados obtidos com concentrado proteico mantêm a tendência verificada anteriormente com as proteínas puras sendo possível concentrar a β -lactoglobulina na fase inferior e purificar a α -lactalbumina na fase superior dos sistemas.

3.3 Partição do Componente PP3 extraído do concentrado proteico de soro

O aquecimento de leite desnatado (95°C, 30 minutos) seguido de acidificação (pH 4,6) provoca a desnaturação das proteínas do soro e a sua co-precipitação com as caseínas. Apesar destas condições drásticas, uma fracção heterogénea composta por fosfoglicoproteínas permanece solúvel, esta fracção denomina-se de fracção PP (proteose peptonas) (Nejjar et al, 1990; Girardet, 1996).

A fracção PP foi então caracterizada como sendo uma mistura de glicoproteínas estáveis ao calor e ácido e corresponde a 10% da proteína total do soro (Ng et al, 1990; Paquet, 1989).

Os seus principais componentes foram designados como componentes 3, 5, 8 slow e 8 fast de acordo com as suas mobilidades electroforéticas ascendentes.

Neste trabalho foi dada especial relevância ao componente PP3 da fracção PP. A razão do interesse neste componente prende-se com as suas propriedades específicas (nomeadamente propriedades espumantes e emulsificantes, e inibição da actividade lipolítica entre outras) e devido ao seu carácter extremamente hidrofóbico, o que constitui uma característica a explorar em termos de separação por sistemas bifásicos aquosos, dado o carácter hidrofóbico do polímero constituinte dos sistemas - PEG.

Assim, o componente PP3 foi utilizado em dois sistemas distintos, PEG-Reppal e PEG-Fosfato, de forma a seleccionar um deles para prosseguir o estudo em termos de variação de uma série de parâmetros.

Foi testado o sistema 25% p/p PEG 20000 + 10% p/p Fosfato a pH 7,0, uma vez que, sendo este componente extremamente hidrofóbico, seria de esperar que se deslocasse para a fase superior rica em PEG; contudo isto não se verificou. Na realidade o componente PP3 apresenta neste sistema um coeficiente de partição de 0,49 com um rendimento de 90%, ou seja preferencialmente encontra-se na fase inferior. Isto poderia ser explicado pelo facto de se estar a trabalhar com um polímero com um peso molecular e concentração muito elevados, pelo que provavelmente o efeito de exclusão sobrepõe-se ao efeito hidrófobo, diminuindo o volume livre e consequentemente dificultando a partição do componente PP3 para a fase superior.

Por outro lado foi testado o sistema 16% p/p PEG 4000 + 16% p/p Reppal a pH 7,0, uma vez que neste sistema predominam as interacções hidrofóbicas. Os resultados obtidos apontam para uma partição do componente PP3 preferencialmente para a fase superior com um coeficiente de partição de 12,3 e um rendimento entre 80-90%.

Analisando os resultados obtidos nos dois sistemas optou-se por aprofundar os estudos no sistema PEG-Reppal tendo sido avaliada a influência dos seguintes parâmetros: peso molecular do PEG (4000/6000/8000/10000); concentração de polímero (12, 14 e 16% p/p); força iónica (0 e 0.5 M de NaCl); pH (3.0; 5.0; 7.0 e 9.0) e concentração de Reppal (12, 14 e 16% p/p).

Utilizando o sistema 12% p/p Reppal + 12% p/p PEG a pH 7,0 variou-se o peso molecular do polímero de forma a avaliar a sua influência no coeficiente de partição do componente PP3. Assim, os resultados obtidos encontram-se reunidos na Figura 3.75.

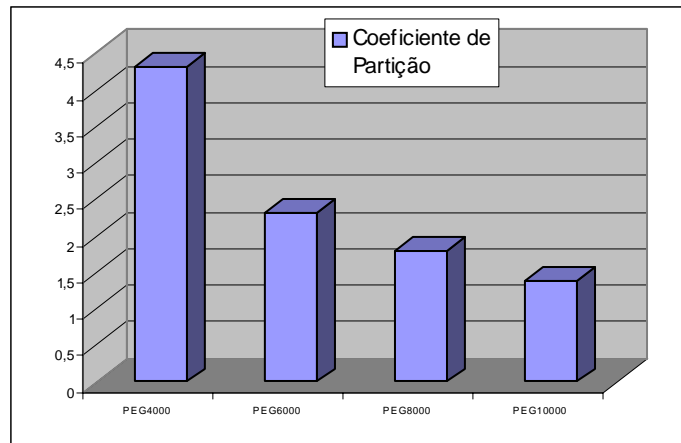


Figura 3.75 Influência do peso molecular de PEG na partição do componente PP3 no sistema 12% p/p Reppal + 12% PEG, pH 7,0.

Como seria de esperar o aumento do peso molecular provoca uma diminuição do coeficiente de partição devido a um efeito de exclusão.

A partir destes resultados optou-se pelo sistema PEG 4000 + 12% p/p Reppal, pH 7,0 para estudar a influência da concentração de PEG na partição do componente PP3 (Figura 3.76)

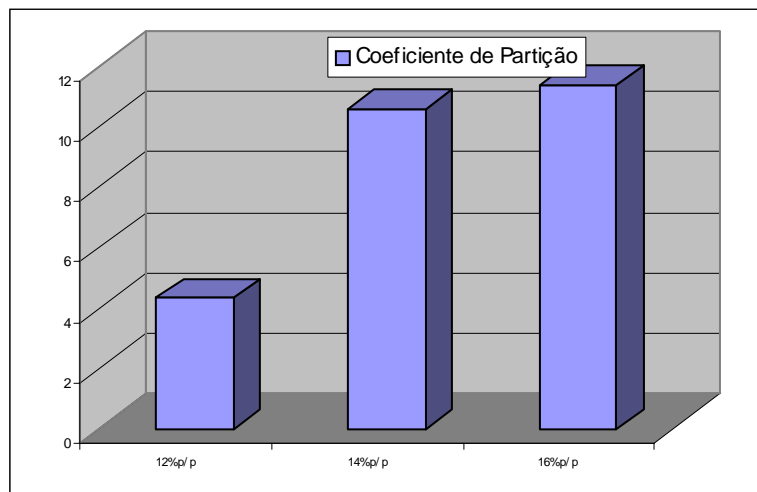


Figura 3.76 Influência da concentração de PEG na partição do componente PP3 no sistema 12% p/p Reppal + PEG4000, pH 7,0.

Verificou-se um aumento do coeficiente de partição, que se pode justificar por um aumento do efeito hidrófobo que provavelmente se sobrepõe ao efeito de exclusão. O aumento da concentração de polímero implica um aumento das interações hidrofóbicas na fase rica em polímero apolar ou seja, o componente PP3 desloca-se para a fase rica em PEG.

Para avaliar a influência da força iónica foi usado o mesmo sistema que na situação anterior e os resultados obtidos encontram-se na Figura 3.77.

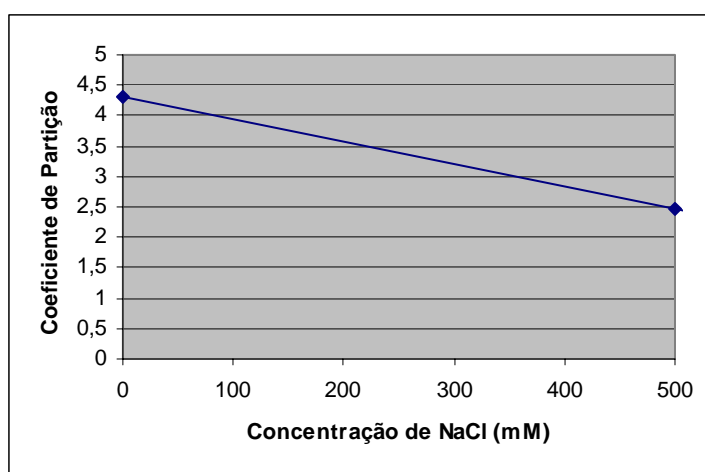


Figura 3.77 Influência da força iónica na partição do componente PP3 no sistema 12% p/p Reppal + 12% p/p PEG4000, pH 7,0.

Verificou-se que o aumento da força iónica promove a diminuição do coeficiente de partição do componente PP3, isto poderá justificar-se por um aumento da precipitação que ocorre quando se aumenta a concentração de sal e portanto, a proteína contabilizada na fase superior é menor e consequentemente o coeficiente de partição é também inferior.

Conclui-se que a manipulação da força iónica do sistema não produz um efeito benéfico na partição do componente PP3 para a fase superior.

Finalmente, também no sistema 12% p/p Reppal + 12% p/p PEG4000 foi avaliada a influência do pH no coeficiente de partição. Os resultados relativos à variação do pH encontram-se na Figura 3.78.

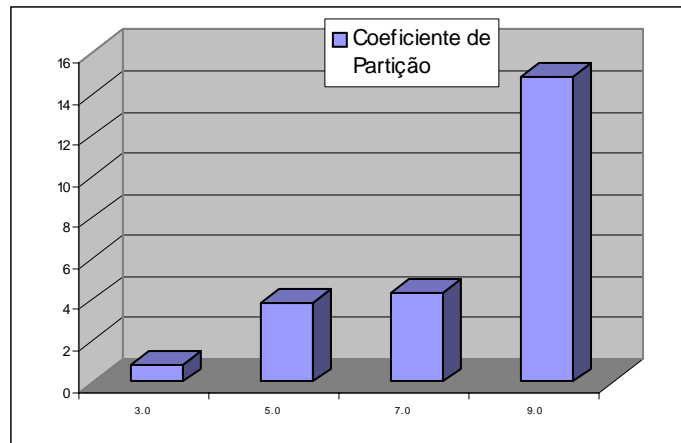


Figura 3.78 Influência do pH na partição do componente PP3 no sistema 12% p/p Reppal + 12% p/p PEG4000, pH 7,0.

Verificou-se um aumento do coeficiente de partição com o aumento de pH. O aumento do pH influencia os grupos ionizáveis da proteína alterando a sua carga superficial e influenciando também a “carga” do polímero, que à medida que o pH aumenta se torna cada vez mais positivo assim, é de esperar que a um pH inferior ao ponto isoeléctrico a proteína esteja positivamente carregada e portanto seja repelida para a fase inferior. Pelo contrário a pH superior ao ponto isoeléctrico a proteína tem carga negativa e é atraída para a fase superior, como é possível verificar pela observação da Figura 3.78. Pensa-se que o ponto isoeléctrico do componente PP3 está compreendido entre 4,90 e 6,10 (Girardet, 1991)

É de notar que à medida que o pH aumenta também aumenta a precipitação proteica, assim, optou-se por trabalhar a pH neutro prevenindo deste modo a desnaturação.

Os resultados relativos à variação da concentração de Reppal encontram-se na Figura 3.79. Estes ensaios foram efectuados com o sistema 12% p/p PEG4000 + Reppal a pH 7,0.

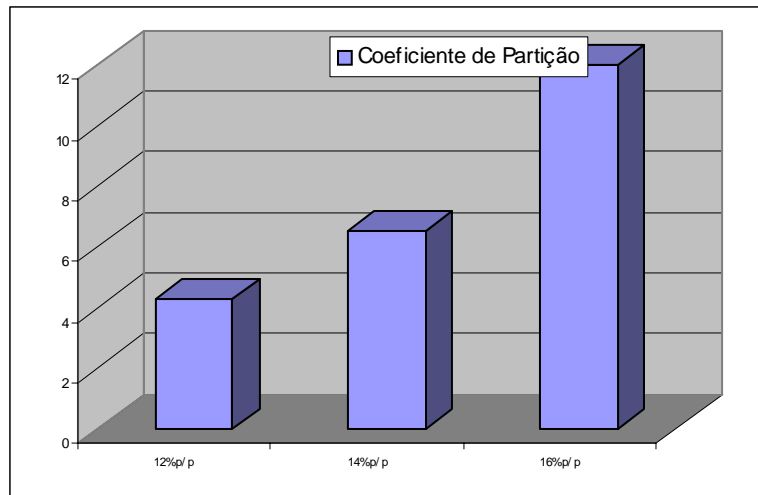


Figura 3.79 Influência da concentração de Reppal na partição do componente PP3 no sistema Reppal + 12% p7p PEG4000, pH 7,0.

À medida que aumenta a concentração de Reppal aumenta o coeficiente de partição do componente PP3 o que, pode ser explicado por uma diminuição de volume livre na fase inferior com consequente partição da proteína na fase superior.

Assim, e após todos os estudos efectuados com o sistema PEG-Reppal chega-se às seguintes condições óptimas para a purificação do componente PP3:

- PEG 4000
- Concentração de PEG 16% p/p
- 0 M NaCl
- pH 7,0
- Concentração de Reppal 16% p/p

Seria interessante testar pesos moleculares de PEG numa gama inferior (600/900/1500) e ainda, uma vez obtidas as melhores condições de purificação, testá-las na fracção PP inteira e verificar se se mantém a partição do componente PP3 para a fase

superior e, se se consegue separar este componente dos restantes componentes hidrofílicos da fracção PP (PP5 e PP8).

Os resultados obtidos no sistema PEG-Fosfato, apesar deste sistema não ter sido mais explorado, permitem considerar este sistema como uma possibilidade para recuperar posteriormente a proteína da fase PEG do sistema PEG-Reppal.

4. CONCLUSÕES

Pretendia-se numa primeira fase deste trabalho seleccionar o sistema que permitisse uma melhor separação de α -lactalbumina e β -lactoglobulina quando aplicado num concentrado proteico de soro.

Da análise dos resultados obtidos verificou-se que no sistema PEG-Reppal a gama de baixo peso molecular de PEG não é eficaz para separar as duas proteínas, pois ambas apresentam nesta gama de pesos moleculares, um coeficiente de partição muito próximo de 1, ou seja uma partição semelhante em ambas as fases do sistema.

Do mesmo modo, para os sistemas PEG-Sais verificou-se, mas desta vez na gama de elevados pesos moleculares de PEG, quer para o sistema PEG-Fosfato, quer para o sistema PEG-Sulfato, que não se consegue obter condições que permitam a separação das duas proteínas (maioritárias no soro de queijo), isto porque ambas se deslocam preferencialmente para a fase inferior do sistema bifásico.

Assim, no sistema PEG-Reppal, para proteínas puras e na gama de elevados pesos moleculares de PEG, as melhores condições de separação são a pH 7,0, com 13% p/p de Reppal PES100 e 5% p/p de PEG 6000, tendo-se obtido um $k_{\alpha} = 3,67$ e $k_{\beta} = 0,04$, com rendimentos de 81,1% ($Y_{\alpha,S}$) e 99,2% ($Y_{\beta,I}$) respectivamente, com recuperações de 38,4% (RA) e 48,4% (RB) respectivamente, e purezas de 95,9% (PA) e 95,7% (PB) respectivamente. Ou ainda, para pH 7,0, com 13% p/p de Reppal PES 100 e 5% p/p de PEG 20000, tendo-se obtido um $k_{\alpha} = 3,80$ e $k_{\beta} = 0,03$, com rendimentos de 84,4% ($Y_{\alpha,S}$) e 99,7% ($Y_{\beta,I}$) respectivamente, com recuperações de 41% (RA) e 52,1 % respectivamente, e purezas de 98,5% (PA) e 96,5% (PB). Verificou-se que apesar de se obterem bons rendimentos e grau de pureza para ambas as proteínas, a sua recuperação é muito baixa o que poderá ser um indicio de precipitação proteica. Consegue-se com este sistema PEG-Reppal a concentração da α -lactalbumina na fase superior do sistema e a deslocação preferencial da β -lactoglobulina para a fase inferior.

No sistema PEG-Fosfato e na gama de baixos pesos moleculares de PEG as melhores condições de separação consistem em usar um sistema a pH 7,0, com 14% p/p de Fosfato e 14 % p/p de PEG 900, tendo-se obtido nesta situação um $k_{\alpha} = 4,39$ e $k_{\beta} = 0,16$, com rendimentos de 75,9% ($Y_{\alpha,S}$) e 93,2% ($Y_{\beta,I}$) respectivamente,

com recuperações de 81,1% (RA) e 80,3% (RB) respectivamente, e purezas de 72,3% (PA) e 94,3% (PB) respectivamente. Neste caso conseguiu-se obter recuperações das proteínas mais elevadas, contudo os rendimentos e grau de pureza são inferiores. Este sistema PEG-Fosfato permite concentrar ambas as proteínas em fases distintas do sistema bifásico aquoso.

No sistema PEG-Sulfato e na gama de baixos pesos moleculares de PEG as melhores condições de separação consistem em usar um sistema a pH 7,0, com 14% p/p de Sulfato e 18 % p/p de PEG 900, tendo-se obtido nesta situação um $k_{\alpha} = 12,80$ e $k_{\beta} = 0,34$ com rendimentos de 96,7% ($Y_{\alpha,S}$) e 83,8% ($Y_{\beta,I}$) respectivamente, com recuperações de 61,2% (RA) e 74,1% (RB) respectivamente, e purezas de 58,2% (PA) e 99,1% (PB) respectivamente. Apesar de se obter um bom rendimento, verificou-se que a recuperação e grau de pureza, especialmente para a α -lactalbumina são baixos. Este sistema PEG-Sulfato permite concentrar ambas as proteínas em fases distintas do sistema bifásico aquoso.

Escolhidas as melhores condições em cada um dos sistemas testados, estas foram ensaiadas utilizando um concentrado proteico de soro a fim de avaliar se se consegue obter a separação das duas proteínas, como se observou nos ensaios com as proteínas comerciais puras.

No sistema PEG-Reppal, nos ensaios efectuados com concentrado proteico de soro na gama de elevados pesos moleculares de PEG, verificou-se em todos os casos que as duas proteínas se deslocam preferencialmente para a fase inferior do sistema, isto seria de esperar pois para pesos moleculares superiores de PEG, menor é o volume livre na fase superior pelo que as proteínas são excluídas para a fase inferior. Contudo, esta tendência não se verificou com as proteínas puras pelo que, a avaliar pelos resultados anteriormente obtidos seria de esperar que as duas proteínas se distribuíssem diferencialmente pelas duas fases,. A diferença dos resultados obtidos com as proteínas puras e com o concentrado proteico de soro podem ter a ver com possíveis interferências de outros componentes do soro proteicos ou não proteicos, ou de associações das proteínas entre si ou com lactose alterando as suas propriedades e características de partição.

Ao contrário do que se tinha constatado para as proteínas puras em que, dificilmente a gama de baixos pesos moleculares de PEG permitiria uma separação das duas proteínas, no caso da utilização dos mesmos sistemas com concentrado proteico verificou-se que a gama de baixos pesos moleculares é melhor que a gama mais elevada apesar de não se encontrar nenhuma situação óptima para a separação.

Nos sistemas PEG-Fosfato, na gama de baixos pesos moleculares de PEG, de um modo geral verificou-se que os valores obtidos com concentrado proteico de soro são bastante diferentes dos obtidos com as proteínas puras e, à excepção da situação 14% p/p PEG900 + 14% p/p Fosfato, pH 6,0, em que se obtém a β -lactoglobulina toda na fase inferior e a α -lactalbumina igualmente distribuída nas duas fases, todas as outras situações não permitem uma separação efectiva das duas proteínas.

No sistema PEG-Sulfato, na gama de baixos pesos moleculares de PEG, verificou-se que a introdução de sais no sistema promove uma diminuição dos coeficientes de partição. Assim, para este sistema as melhores condições ensaiadas foram: 14% p/p PEG900 + 14% p/p Sulfato, pH 7,0 e, 16% p/p PEG900 + 15% p/p Sulfato, pH 7,50, conseguindo-se com estes sistemas obter toda a β -lactoglobulina na fase inferior e grande parte da α -lactalbumina na fase superior do sistema.

Devido às propriedades funcionais, fisiológicas e biológicas específicas de cada uma das proteínas do soro, tem havido um crescente interesse no seu fraccionamento, pois muitas vezes estas características não se fazem notar nos concentrados proteicos devido a interacções de outros componentes (Bramaud et al, 1997).

A β -lactoglobulina tem uma maior capacidade de gelificação que a α -lactalbumina. Por outro lado, o leite humano não contém β -lactoglobulina (é a proteína que causa mais reacções alérgicas), e por esse motivo a α -lactalbumina é mais adequada para a formulação de alimentos para crianças, do que os concentrados proteicos do soro (Zydney, 1998).

Assim, e dependendo da utilização a que se destinam é de todo o interesse obter as duas proteínas separadas e com o maior grau de pureza possível.

Os sistemas PEG-sal ensaiados com concentrado proteico permitem a concentração da β -lactoglobulina na fase inferior, e a purificação da α -lactalbumina na fase superior, uma vez que toda a β -lactoglobulina se dirige para a fase inferior do sistema bifásico aquoso. Os resultados obtidos com estes sistemas estão de acordo com o estudo publicado por Chen (1992).

A utilização de sistemas bifásicos PEG-Sal parece ser mais adequados para separar as duas proteínas maioritárias do soro de queijo, pois apesar de não permitirem uma separação efectiva das duas proteínas, permitem uma boa concentração de ambas em fases distintas.

Quanto ao sistema PEG-Reppal, seria interessante introduzir um ligando hidrofóbico no PEG de forma a conseguir uma partição por afinidade. Uma distribuição em contracorrente de soro na presença de PEG-palmitato e ião cálcio, num sistema PEG-dextrano, permite a extracção de β -lactoglobulina num só passo e aparentemente livre de contaminações (Ortin et al, 1992).

No que respeita à segunda fase deste trabalho, pretendia-se por sistemas bifásicos aquosos promover a purificação do componente PP3, da fracção proteose peptonas do soro de queijo.

Assim, o componente PP3 foi utilizado em dois sistemas distintos, PEG-Reppal e PEG-Fosfato, de forma a seleccionar um deles para prosseguir o estudo em termos de variação de uma série de parâmetros.

Foi testado o sistema 25% p/p PEG 20000 + 10% p/p Fosfato a pH 7,0, uma vez que, sendo este componente extremamente hidrofóbico, seria de esperar que se

deslocasse para a fase superior rica em PEG; contudo isto não se verificou. Na realidade o componente PP3 apresenta neste sistema um coeficiente de partição de 0,49 com um rendimento de 90%, ou seja preferencialmente encontra-se na fase inferior. Isto poderia ser explicado pelo facto de se estar a trabalhar com um polímero com um peso molecular e concentração muito elevados, pelo que provavelmente o efeito de exclusão sobrepõe-se ao efeito hidrófobo, diminuindo o volume livre e consequentemente dificultando a partição do componente PP3 para a fase superior.

Por outro lado foi testado o sistema 16% p/p PEG 4000 + 16% p/p Reppal a pH 7,0, uma vez que neste sistema predominam as interacções hidrofóbicas. Os resultados obtidos apontam para uma partição do componente PP3 preferencialmente para a fase superior com um coeficiente de partição de 12,3 e um rendimento entre 80-90%.

Analisando os resultados obtidos nos dois sistemas optou-se por aprofundar os estudos no sistema PEG-Reppal tendo sido avaliada a influência dos seguintes parâmetros: peso molecular do PEG (4000/6000/8000/10000); concentração de polímero (12, 14 e 16% p/p); força iónica (0 e 0.5 M de NaCl); pH (3.0; 5.0; 7.0 e 9.0) e concentração de Reppal (12, 14 e 16% p/p).

Assim, e após todos os estudos efectuados com o sistema PEG-Reppal chega-se às seguintes condições óptimas para a purificação do componente PP3:

- PEG 4000
- Concentração de PEG 16% p/p
- 0 M NaCl
- pH 7,0
- Concentração de Reppal 16% p/p

Seria interessante testar pesos moleculares de PEG numa gama inferior (600/900/1500) e ainda, uma vez obtidas as melhores condições de purificação, testá-las na fracção PP inteira e verificar se se mantém a partição do componente PP3 para a fase

superior e, se se consegue separar este componente dos restantes componentes hidrofílicos da fracção PP (PP5 e PP8).

Os resultados obtidos no sistema PEG-Fosfato, apesar deste sistema não ter sido mais explorado, permitem considerar este sistema como uma possibilidade para recuperar posteriormente a proteína da fase PEG do sistema PEG-Reppal.

5. NOMENCLATURA

- γ - Tensão superficial
- $\Delta\phi$ - Diferença de potencial electrostático
- ΔG° - Energia livre de Gibbs
- CBO5 – Carência bioquímica de oxigénio
- Conc – Concentração
- CP – Concentrado proteico
- CQO – Carência química de oxigénio
- F – Constante de Faraday
- IP – Isolado proteico
- k – Coeficiente de partição (razão entre a concentração de proteína na fase superior e inferior do sistema bifásico aquoso)
- k_{α} – Coeficiente de partição da α -lactalbumina
- k_{β} – Coeficiente de partição da β -lactoglobulina
- P – Factor de purificação
- PA – Factor de purificação da α -lactalbumina
- PB – Factor de purificação da β -lactoglobulina
- PEG – Polietileno glicol
- PM – Peso molecular
- PP – Fracção proteose peptonas do soro de queijo
- PP3 – Componente PP3 da fracção proteose peptonas do soro de queijo
- R – Constante dos gases ideais
- RA – Recuperação de α -lactalbumina relativamente à introduzida no sistema bifásico aquoso
- RB - Recuperação de β -lactoglobulina relativamente à introduzida no sistema bifásico aquoso
- Reppal - Reppal®PES100 (hidroxipropil amido purificado)
- SBA – Sistema bifásico aquoso
- STL – Declive da “tie-line”
- T – Temperatura absoluta
- TLL – Comprimento da “tie-line”
- V – Volume

V_s e V_i – Volumes das fases superior e inferior do sistema bifásico

Y_A – Rendimento percentual de α -lactalbumina na fase superior do sistema bifásico

Y_B – Rendimento percentual de β -lactoglobulina na fase inferior do sistema bifásico

z - carga da proteína

6. BIBLIOGRAFIA

Albertsson, P.-A. *Chromatography and partition of cells and cell fragments*. Acta Chem.Scand. 10 :148, 1956

Albertsson, P.-A. *Chromatography and partition of cells and cell fragments*. Nature 177 : 711-774, 1956

Albertsson, P.-A. *Particle fractionation in liquid two-phase systems. The composition of some phase systems and the behaviour of some model particles in them. Application to the isolation of cell walls for microorganisms*. Biochim. Biophys. Acta 27 : 378-395, 1958

Albertsson, P.-A. *Partition of cell particles and macromolecules*. 3rd ed. John Wiley & Sons, New York, 1985

Albertsson, P.-A. *Partition of proteins in liquid polymer –polymer two-phase systems*. Nature (London) 182 :709-711, 1958

Albertsson, P.-A., Nyns, E.J. *Counter current distribution of proteins in aqueous polymer phase systems*. Nature 184 :1465-1468, 1959

Albertsson, P.-A., Frick, C. *Partition of virus particles in a liquid two-phase system*. Biochim. Biophys. Acta 37 :230-237, 1959

Albertsson, P.-A., Hanzon, V., Tosch, G. *Isolation of ribonucleoprotein particles from rat brain microsomes by liquid two-phase systems*. J. Ultrastructure Res. 2 : 366-372, 1959

Ananthapadmanabhan, K.P., Goddard, E.D. (1987). *Aqueous biphasic formation in polyethyleneoxide-inorganic salt systems*. Langmuir 3: 25-31, 1987

Anderson, M. *Inhibition of lipolysis in bovine milk by proteose peptone*. Journal of Dairy Research 48: 247, 1981

Andrews, A.T., Alichanidis, E. *Proteolysis of caseins and the proteose peptone fraction of bovine milk*. Journal of Dairy Research 50: 275, 1983

Bailey, J. E., Ollis, D. F. *Biochemical Engineering Fundamentals*. McGraw-Hill International Editions, 1986

Banks, J. M. *Cheese. The Technology of Dairy Products*, Early, R. ed, Blackie Academic & Professional, 1998.

Barker, C. M., Morr, C.V. *Properties of Spherosil QMA whey protein concentrates*. J.Food Science, vol 51, n°4, 1986

Baskir, J.N., Hatton, T.A. e Suter, U.W. *Protein partitioning in two-phase aqueous polymer systems*. Biotechnol. Bioeng. 34:541-558, 1989

Biscans, B, Sanchez, V. E Coudera, J.P. *Extraction de betalactoglobuline et alphasalalbumine par chromatographie échange d'ions en couche fluidisée*. Entropie n°125/126, pp 17-26, 1985

Bradford, M. M. *A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein Dye binding*. Analytical Biochemistry 72: 248-251, 1976

Bramaud, C., Airnar, P., Daufin, G. *Optimisation of a whey protein fractionation process based on the selective precipitation of alphasalalbumin*. Lait 77: 411-423, 1997

Brooks, D.E., Sharp, K.A. *Theoretical aspects of partitioning. Partitioning in aqueous two phase systems*. H.Walter, D.E.Brooks and D.Fisher. Orlando, Academic Press, Inc, 1985

Cartier, P., Chilliard, Y., Paquet, D. Journal of Dairy Science 73: 1173-1177, 1990

Chang, Y.K., Chase, H. A. *Development of operating conditions for protein purification using expanded bed techniques*. Biotech. And Bioeng. 49: 512-526, 1996

Cheftel, J. C., Lorient, D. *Les propriétés fonctionnelles des protéines laitières et leur amélioration*. Le Lait 62, 1982

Chen, J. Y. H-P. *Partitioning and separation of alphasalalbumin and betalactoglobulin in PEG/Potassium Phosphate ATPS*. J. of Fermentation and Bioeng. Vol 73, n°2, 140-147, 1992

Cheryan. *Fouling of UF membranes – physico-chemical factors affecting fouling*. Phd, UF Handbook, Technomic Publishing AG, USA, 1986.

Clark, W.M. *Electrophoresis-enhanced extractive separation*. Chemtech-American Chemical Society, 1992

Coelho, C. *PROLAC - Relatório final de projecto Quinta dos Ingleses*, 1999

Conway, B.E. *Ionic hydration in chemistry and biophysics*. Elsevier. Amsterdam, 1981

de Wit, J.N. *The use of whey protein products*. A review. NIZO Research Report V281, 1989

Daimond, A. D., Hsu, J. T. *Aqueous Two Phase Systems for Biomolecule Separation*. Advances in Biochemical Engineering, Fiechter, A. (ed.) Springer-Verlag, Berlin, 47, 89-135, 1992

Dumay, E., Cheftel, J.C. 1989. *Chauffage d'un concentré protéique de β -lactoglobuline en milieu faiblement alcalin. Effets sur la solubilité et le comportement*

chromatographique de la β -lactoglobuline et de la α -lactalbumine. Science des Aliments 9: 561, 1989

Edmond, E., Ogston, A. G. *An approach to the study of phase separation in ternary aqueous systems.* Biochem. J. 109 (4): 569, 1968

Eiteman, M.A., Gainer, J.L. *The effect of free-volume changes on partitioning in magnesium sulfate-poly(ethylene glycol) aqueous two-phase systems.* Biochim. Biophys. Acta 992: 125-127, 1989

Elling, L., Kula, M.-R. *Immunoaffinity partitioning – Synthesis and use of PEG-oxirane for coupling to BSA and monoclonal antibodies.* Biotechnol. Appl. Biochem. 13: 354-362, 1991

Etienne, L., Girardet, J.M., Linden, G. Lait 74: 313-323, 1994

Etzel, M. *Opportunities for chromatography in the dairy industry.* Expoláctea, Universidade de Oviedo, 1998

Ferraz, A. *Adaptação ambiental no sector dos lacticínios.* AIP Ambiente 22: 22, 1998

Flanagan, S. D., Barondes, S.H. *Affinity partitioning- a method for purification of proteins using polymer-ligands in aqueous polymer two-phase systems.* J. Biol. Chem. 250 (4) : 1484-1489, 1975

Fox, P.F, Flynn, A. 1992. *Biological Properties of Milk Proteins.* Advanced Dairy Chemistry Vol1- Proteins P. F. Fox, 1992

Fox, P.F. *The milk protein system.* Development in Dairy Chemistry-4, Fox, P.F. (Ed.), p245, Elsevier Applied Science, New York, 1989

Franco, T.T., Andrews, A.T. , Asenjo, J.A. *Use of chemically modified proteins to study the effect of a single protein property on partitioning in aqueous two-phase systems: effect of surface charge.* Biotechnol Bioeng 49: 309-315, 1996

Franco, T.T., Andrews, A.T., Asenjo, J.A. *Conservative chemical modification of proteins to study the effects of a single protein property on partitioning in aqueous two-phase systems.* Biotechnol Bioeng 49: 290-299, 1996

Franco, T.T., Andrews, A.T., Asenjo, J.A. *Use of chemically modified proteins to study the effect of a single protein property on partitioning in aqueous two-phase systems: effect of surface hydrophobicity.* Biotechnol Bioeng 49: 300-308, 1996

Frej, A.-K.B., Hjorth R., Hammarstrom, A. *Pilot scale recovery of recombinant Annexin V from unclarified E.coli homogenate using expanded bed adsorption.* Biotechn. and Bioeng. Vol 44, pp 929-992, 1994

Frick, G., Albertsson, P.-A. *Bacteriophage enrichment in a liquid two phase systems with subsequent treatment with “Freon”113.* Nature (London) 183: 1070-1072, 1959

Girardet, J., Mati, A., Sanogo, T., Etienne, L., Linden, G. 1991. *Fast protein liquid chromatography purification of hydrophobic fraction of bovine milk proteose-peptone fraction and characterization by bidimensional electrophoresis*. Journal of Dairy Research 58: 85, 1991

Girardet, J.M., Linden, G. *PP3 component of bovine milk: a phosphorylated whey glycoprotein – Review Article*. J.Dairy Research, 63: 333-350, 1996

Girardet, J.M., Linden, G., Loye, S., Courthaudon, J. L., Lorient, D. Journal of Dairy Science 76: 2156-2163, 1993

Grosch, B. *Food Chemistry*. Spanger-Verlag, Berlin, 1987.

Guan, Y., Lilley, T.H., Treffry, T.E. *A new excluded volume theory and its application to the coexistence curves of aqueous polymer two-phase systems*. Macromolecules 26: 3971-3979, 1993

Harper, W. J. *Lactose and lactose derivatives*. Whey and Lactose Processing, Zadow eds., Elsevier Applied Science, 1992

Hart, R.A., Lester, P.M., Reifsnyder, D.H., Ogez, J.R., Builder, S.E. *Large scale, in situ isolation of periplasmic IGF-I from E.coli*. Biotechnology 12 (11): 273-277, 1994

Henn, A.R., Kauzmann, W. *Equation of state of a random network, continuum model of liquid water*. J.Phys. Chem. 93: 3770-3783, 1989

Henry, H. *High Performance ion-exchange chromatography of proteins: a review of methods and mechanisms*. High Performance Liquid Chromatography in Biotechnology, Hanock, W., eds, John Wiley & Sons, 1990

Huffman, L.M. *Processing whey protein for use as a food ingredient*. Food Technology Feb, 1996

Hustedt, W., Kroner, K.H., Stach, W., Kula, M.-R. *Procedure for the simultaneous large-scale isolation of pullulanase and 1,4- α -glucan phosphorylase from Klebsiella pneumoniae involving liquid-liquid separations*. Biotechnol. Bioeng. 20 : 1989-2005, 1978

Innocent, N., Corradini, C. Blecker C., Paquot, M. *Emulsifying properties of the total fraction and hydrophobic fraction of bovine milk proteose peptones*. International Dairy Journal 8: 981-985, 1998 b.

Innocent, N., Corradini, C., Blecker C., Paquot, M. *Dynamic surface properties of PP fraction of bovine milk*. J. Dairy Science 81: 1833-1839, 1998 a.

Jelen, P. *Whey cheeses and beverages*. Whey and Lactose Processing, Zadow eds., Elsevier Applied Science, 1992

Johansson, G. *Effects of salts on the partition of proteins in aqueous polymeric two-phase systems*. Acta Chem Scand. B28: 873-882, 1974 a.

Johansson, G. *Partition of proteins and microorganisms in aqueous biphasic systems*. Mol Cell. Biochem. 4: 169-180, 1974 b.

Johansson, G. *Partition of salts and their effects on partition of proteins in a dextran-poly(ethylene glycol)-water two-phase system*. Biochim. Biophys. Acta 221 :387-390, 1970 a.

Johansson, G. *Studies on aqueous dextran-PEG two-phase systems containing charge PEG.1. Partition of albumins*. Biochim. Biophys. Acta 222 :381-389, 1970 b.

Johansson, G. *The effect of PEG esters on the partition of proteins and fragmented membranes in aqueous biphasic systems*. Biochim. Biophys. Acta 451 : 517-529, 1976

Johansson, G., Shanbhag, V.P. *Affinity partitioning of proteins in ATPS containing polymer-bound fatty acids. I- effect of PEG-palmitate on the partition of human serum albumin and α -lactalbumin*. J. Chromatography 284: 63-72, 1984

Johanssen, L. B., Sorensen, E. S., Petersen, T. E., Berglund, L. *Characterization of bovine mammary gland PP3 cDNA reveals homology with mouse and rat adhesion molecule GlyCAM-1*. Biochim. et Biophys. Acta 1260: 116-118, 1995

Kanno, C. Journal of Dairy Science 72: 1732-1739, 1989 b.

Kanno, C. *Purification and Separation of Multiple forms of lactophorin from bovine milk whey and their immunological and electrophoretic properties*. Journal of Dairy Science 72: 883-891, 1989 a.

Kester, J.J., Brunner, J.R. *Milk fat membrane as possible origin of proteose peptone glycoproteins*. Journal of Dairy Science 65: 2241, 1982

Kirk, R. S., Sawyer, R. *Pearson's composition and analysis of foods*. 9th Ed, Longman Scientific & Technical, UK, 1991.

Kolar, C. K., Brunner, J.R. *PP fraction of bovine milk: distribution in the protein system*. Journal of Dairy Science vol 52, n°10, pp 1541, 1970

Kroner, K.H., Schutte, H., Granda, S., Kula, M.-R. *Technical aspects of separation using aqueous two-phase systems in enzyme isolation processes*. Biotechnol. Bioeng. 20 :1967-1988, 1978

Kuhn, J. *Alcoholic fermentation in an aqueous two phase system*. Biotechnol. Bioeng. 22: 2393-2398, 1980

Lif, T., Frick, G., Albertsson, P.-A. *Fractionation of nucleic acids in aqueous two-phase systems*. J. Mol. Biol.3 :727-740, 1961

Mangino, M. E. *Properties of whey protein concentrates* Whey and Lactose Processing, Zadow eds., Elsevier Applied Science, 1992

Marshall, S.C. *Casein Macropeptide from whey – a new product opportunity*. Food Research Quarterly vol 51, 1991

Marshall, K.R. *Industrial isolation of milk proteins: whey proteins*. Developments in Dairy Chemistry-1, P.F.Fox (Ed.), p339., Applied Science, New York, USA, 1982

Masimov, A. A, Gasanov, A.A., Rogozhin, S.V. *Relationship between the relative hydrophobicity of macromolecules and the hydrophobic character of their aqueous solutions*. J.Chromat. 294: 261-267, 1984

Mathews, M.E. *Whey protein recovery processes and Products*. Journal of Dairy Science 67: 2680-2692, 1984

Mc. Cormick, D.K. *Expanded bed adsorption*. Biotechnology vol 11, 1993

McKenzie, H.A. *pH and Buffers*. Data for Biochemical Research, Dawson R. M. C., Elliot W. H. e Jones K. M. (eds) Oxford University Press, London, 475-508, 1969

Meireles, L. *Valorização Integral do Soro de Queijo-Análise da Indústria de derivados de soro de queijo*. Gabinete de Contabilidade e Consultadoria, 1999

Melander, W., Horváth, C. *Salt effects on hydrophobic interaction in precipitation and chromatography of proteins: an interpretation of lyotropic series*. Arch. Biochem. Biophys. 183: 200-215, 1977

Monzón , C. e Olano, A. *Producción de bebidas alcohólicas a partir del suero de queserías*. Alimentaria 83: 41, 1977

Morr, C. V. *Whey utilization*. Advanced Dairy Chemistry Vol 1 – Proteins, P. F. Fox, 1992

Morr, C. *Whey utilization*. Whey and Lactose Processing, Zadow eds., Elsevier Applied Science, 1992

Morr, C.V. *Whey proteins: manufacture*. Development in Dairy Chemistry-4, Fox, P.F. (Ed.), p245, Elsevier Applied Science, New York, 1989

Moulin, G., Galzy, P. *Whey, a potential substrate for biotechnology*, 1983

Mulvihill, D.M. *Functional Milk Protein Products*. Biochemistry of milk products, Andrews A,T e Varley, J, 1984

Nejjar, Y., Paquet, D., Aubert, F., Linden, G. *The PP3 component of the proteose peptone extraction from unheated skim milk*. Milchwissenschaft 45 (2), 1990

NG, W. C., Brunner, J. R., Rhee, K. C. *PP fraction of bovine milk: lacteum serum component 3 – a whey glycoprotein*. Journal of Dairy Science 53: 987, 1970

Noppe, W. *Purification of some milk proteins by expanded bed adsorption*. Expoláctea, Universidade de Oviedo, Espanha, 1998

Ortin, A., Muiño-Blanco, M. T., Calvo, M., Lopez-Perez, M. J., Cebrian-Perez, J. A. *Extraction of β -lg from bovine milk by affinity counter-current distribution in ATPS*. Journal of Dairy Science 75: 711-717, 1992

Outinen, M. et al. *Fractionation of proteins from whey with different pilot scale processes*. Lebensm.-wiss.u. – Technol., 29, 411-417, 1996

Pâquet, D. *Review bibliographique: la proteose-peptone du lait*. Le Lait 69: 1, 1989

Paquet, D., Nejjar, Y. E Alais, C. *Electrophoretic and chromatographic behaviour of PP fraction of cows milk*. Milchwissenschaft 40 (4), 1985

Pearce, R. J. *Whey protein recovery and whey protein fractionation*. Whey and Lactose Processing, Zadow eds., Elsevier Applied Science, 1992

Pearce, R.J. *Fractionation of whey proteins*. Bulletin of the International Dairy Federation 212: 150, 1986

Pearce, R.J. *Heat stable components in the aschaffenburg and drewry total albumin fraction from bovine milk*. New Zealand Journal of Dairy Science and Technology 15:13, 1980

Persson, L.-O., Olde, B. *Synthesis of ATP-polyethylene glycol and ATP-Dextran and their use in the purification of phosphoglycerate kinase from spinach chloroplasts using affinity partitioning*. J. Chromatography 457: 183-193, 1988.

Pintado, M.E., Malcata, F.X. *Optimization of modified atmosphere packaging with respect to physicochemical characteristics of Requeijão*. Food Research International, 1999

Rasmussen, L.K., Sorensen, E.B., Petersen, T.E. *Structure of casein micelles and two whey proteins: PP3 and Osteopontin*. Protein Chem. Lab., 1998

Read, S. *Techniques for determining protein concentration*. Techniques in Protein and Enzyme Biochemistry, Tipton, K., ed., Elsevier Scientific Publishers Ireland Ltd, 1984

Renner, E. *Nutritional Aspects*. Whey and Lactose Processing, Zadow eds., Elsevier Applied Science, 1992

Riera, F. A., Alvarez, R., Arguello, M. A., Cabero, M. *Fraccionamiento y aprovechamiento de proteínas del suero lacteo (II)*. I+D, Tecnologia de Alimentos, 1996

Roe, S. *Separation based on structure*. Protein purification methods, Harris, E. L. V. e Angal, S. (eds), IRL Press, Oxford University Press, 175-244, 1989

Samoilov, O.Y. *Structure of aqueous electrolyte solutions and the hydration of ions*. Consultants Bureau, New York, 1965

Sasakawa, S., Walter, H. *Partition behaviour of native proteins in aqueous dextran-poly(ethylene glycol) phase systems*. *Biochemistry* 11: 2760-2765, 1972

Scopes, R. K. *Overview of protein purification and characterization*. *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, Inc., 1995

Scott, R.L. *The thermodynamics of high polymer solutions. V. Phase equilibria in the ternary system: polymer1-polymer2-solvent*. *J.Chem. Phys.* 17: 279-284, 1949

Shastri, Sid. *Whey to health*. *Total Health* vol 20 (2) pp44, 1998

Shida, K., Takamizawa, K., Nagaoka, M., Kushiro, A., Osawa, T., Tsuji, T. *Journal of Dairy Science* 77: 930-939, 1994

Silva, M., Frutuoso A. *Contratos de Adaptação Ambiental*. *AEP Ambiente* 41: 16-21, 2000

Sjoberg, A., Karlstrom, G., Tjerneld, F. *Effects on cloud point of aqueous PEG solutions upon addition of low molecular weight saccharides*. *Macromolecules* 22:4512-4516, 1989

Skudder, P. J. *Evaluation of a porous silica-based ion-exchange medium for the production of protein fractions from rennet and acid whey*. *Journal of Dairy Research* 52: 167-181, 1985

Sorensen, E. S., Rasmussen, L. K., Moller, L., Petersen, T.E. *The localization and multimeric nature of component PP3 in bovine milk: purification and characterization of PP3 from caprine and ovine milks*. *Journal of Dairy Science* 80: 3176-3181, 1997

Sorensen, E.S., Petersen, T.E. *Phosphorylation, glycosylation and amino acid sequence of component PP3 from proteose peptone fraction of bovine milk*. *Journal of Dairy Research* 60: 535, 1993 b.

Sorensen, E.S., Petersen, T.E. *Purification and characterization of three proteins isolated from proteose peptone fraction of bovine milk*. *Journal of Dairy Research* 60: 189, 1993 a.

Sorensen, E.S., Petersen, T.E. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 198: 200-205, 1994

Takerkart, G., Segard, E., Monsigny, M. *Purification of trypsin in two-phase systems containing a diamino- α , ω -diphenylcarbonyl poly(ethylene glycol) as competitive inhibitor of trypsin*. *FEBS Lett.* 42 : 218-220, 1974

Tjerneld, F., Berner, S., Cajjarville, A., Johansson, G. *New aqueous two-phase system based on hydroxypropyl starch useful in enzyme purification.* *Enz.Microb.Technol.* 8: 417-423, 1986

Tsukasaki, F., Motoshima, H., Kuruki, H., Minagawa, E., Kanno, C. *Proceedings International Dairy Congress 24. Melbourne. Abstracts of Posters and Brief Communications* 190, 1994

Veide, A., Lindback, T., Enfors, S.O. *Continuous extraction of β -D-galactosidase from E.coli in an aqueous two-phase system: effects of biomass concentration on partitioning and mass transfer.* *Enzyme Microb. Technol.* 6:325-330, 1984

Venâncio, A. *Caracterização de novos sistemas para partição bifásica aquosa de biomoléculas.* Tese de doutoramento, 1996

Venâncio, A., Almeida, C., Domingues, L., Teixeira, J.A. *Protein partition on a derivative guar gum based aqueous two-phase system.* *Bioseparation* 5: 253-258, 1995

Venâncio, A., Almeida, C., Teixeira, J.A. *Enzyme purification with aqueous two-phase systems comparison between systems composed by pure polymers and systems composed by crude polymers.* *J. Chromat.B* 680 (1-2): 131-136, 1996

Visser, J., Jeurink, Th. J. M. *Fouling of heat exchangers in the dairy industry.* *Experimental Thermal and Fluid Science* 14: 407-424, 1997

Voet, D., Voet, J. *Biochemistry, 2nd ed.* John Wiley & Sons, 1995

Yamazaki, Y., Suzuki, H. *An attempt of new enzyme reactor based on aqueous two phase systems.* *Rep. Ferment. Res. Inst. (Chibs, jpn)* 52 :33-40, 1997

Yang, S.T., Silva, E.M. *Novel products and new technologies for use of a familiar carbohydrate, milk lactose.* *Journal of Dairy Science* 78: 2541, 1995

Zall, R.R. *Sources and composition of whey and permeates.* *Whey and Lactose Processing*, Zadow eds., Elsevier Applied Science, 1992

Zaslavsky, B. Y. *Aqueous two phase partitioning.* *Physical Chemistry and Bioanalytical Applications* Marcel Dekker, Inc., New York, 1995

Zaslavsky, B. Y., Masimov, A. A, Gasanov, A.A., Rogozhin, S.V. *Relation between the relative hydrophobicity of macromolecules and the hydrophobic character of their aqueous solutions.* *J.Chromat.* 294: 261-267, 1984

Zaslavsky, B. Y., Miheeva, L.M., Rogozhin, S.V. *Parameterization of hydrophobic properties of aqueous polymeric biphasic systems and water-organic solvent systems.* *J.Chromat.* 212: 13-22, 1981

Zydney, A. L. *Protein separations using membrane filtration: new opportunities for whey fractionation.* *International Dairy Journal* 8: 243-250, 1998