

FABÍOLA CRISTINA DE OLIVEIRA

**ESTUDO DA PARTIÇÃO DA PROTEÍNA OVOMUCOIDE EM SISTEMAS  
AQUOSOS BIFÁSICOS E EM RESINAS ANIÔNICA OU HIDROFÓBICA**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2009

FABÍOLA CRISTINA DE OLIVEIRA

**ESTUDO DA PARTIÇÃO DA PROTEÍNA OVOMUCOIDE EM SISTEMAS  
AQUOSOS BIFÁSICOS E EM RESINAS ANIÔNICA OU HIDROFÓBICA**

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

APROVADA: 12 de fevereiro de 2009

---

Prof. Luis Henrique Mendes da Silva  
(Coorientador)

---

Prof. Edwin Elard Garcia Rojas  
(Coorientador)

---

Prof<sup>ª</sup>. Renata Cristina Ferreira Bonomo

---

Prof<sup>ª</sup>. Edimar Aparecida Filomeno Fontes

---

Prof. Afonso Mota Ramos  
(Presidente da banca)

*A Deus.*

*Aos meus pais, Chiquinho e Maria Inêz, e toda a minha querida família,  
que sempre estiveram ao meu lado, me dando amor e carinho nos momentos mais difíceis.*

*Ao Everton, pelo amor, paciência e companheirismo em todas as horas.*

*Se não fossem vocês não chegaria até aqui.*

*O Senhor é meu Pastor e nada me faltará.*

*(Salmo 22)*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre ao meu lado, me dando forças para não desanimar e conseguir alcançar meus objetivos.

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

Ao CNPq, pelos recursos financeiros e pela bolsa concedida.

A todos da minha querida família pelo amor, carinho, incentivo, orações e por sempre estarem ao meu lado.

Ao Everton, pelo amor, carinho e principalmente pela paciência.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Jane Sélia dos Reis Coimbra, agradeço pela orientação, confiança, motivação, paciência e amizade.

Ao professor e amigo Edwin, pelas valiosas sugestões, pela prestatividade, e incentivo.

Ao professor Luís Henrique Mendes da Silva pelos ensinamentos acadêmicos, atenção, incentivo e pela coorientação.

A professora Maria do Carmo pela ajuda oferecida na condução dos experimentos.

As amigas Rita e Rosana, que nos momentos mais difíceis sempre me deram apoio, agradeço pela amizade.

Aos amigos do Laboratório de Operações e Processos (LOP), Daniela, Jaqueline, Rafael, Ingrid, Leandro, Bruna Mara, Gisele, Priscilla, Kika, Janaína, Omar, César, Vagner, Toninho, Roney, Magno, Aline, Carol, Camila, Fernanda, Ivan e Bruno, pelo companheirismo, pelos momentos agradáveis proporcionados e pelas informações compartilhadas.

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

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

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE TABELAS .....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xii
RESUMO .....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
OBJETIVO GERAL .....	3
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
CAPÍTULO 1 .....	4
1. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
1.1 Ovo de Galinha .....	4
1.2 Clara de Ovo .....	5
1.3 Ovomucoide .....	6
1.4 Separação por Adsorção.....	7
1.4.1 Cromatografia de Troca Iônica .....	8
1.4.2 Equilíbrio de adsorção em trocador iônico .....	11
1.4.3 Variáveis que influenciam no processo de troca iônica .....	12
1.4.3.1 Temperatura .....	12
1.4.3.2 Tipo e Concentração de Sal .....	13
1.4.3.3 pH.....	13
1.4.3.4 Natureza da Proteína .....	14
1.4.3.5 Natureza do Adsorvente.....	14
1.4.4 Cromatografia por interação hidrofóbica (CIH) .....	15
1.4.5 Fatores que afetam a CIH.....	16
1.4.5.1 Tipo de ligante .....	16
1.4.5.2 Tipo e concentração de sal .....	17
1.4.5.3 pH.....	19
1.4.5.4 Temperatura .....	19
1.4.5.5 Aditivos .....	20

1.4.6 Tanques agitados.....	20
1.4.7 Isotermas de adsorção .....	20
1.5 Sistema Aquoso Bifásico (SAB).....	22
1.5.1 Fundamentos sobre a Formação dos SABs.....	23
1.5.2 Diagrama de equilíbrio de fases.....	24
1.5.3 Partição de proteínas em Sistemas Aquosos Bifásicos .....	26
1.5.4 Variáveis que Influenciam o Sistema Aquoso Bifásico.....	27
1.5.4.1 Massa Molar e Concentração do Polímero .....	27
1.5.4.2 pH.....	28
1.5.4.3 Tipo e Concentração de Sal .....	29
1.5.4.4 Temperatura .....	29
1.5.5 Componentes do sistema.....	30
1.5.5.1 Polietilenoglicol (PEG).....	30
1.5.5.2 Sais .....	31
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
CAPÍTULO 2. PARTIÇÃO DA OVOMUCOIDE EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS .....	40
RESUMO .....	40
1. INTRODUÇÃO .....	40
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	42
2.1 Materiais.....	42
2.2 Determinação dos dados de equilíbrio para o sistema Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> e PEG 1500 a 25 °C .....	42
2.2.1 Coleta das fases .....	43
2.2.2 Medida da densidade.....	43
2.2.3 Medida do volume das fases .....	44
2.2.4 Quantificação do teor de água.....	44
2.2.5 Quantificação do teor de sal.....	45
2.2.6 Quantificação do teor de polietilenoglicol .....	45
2.3 Experimentos com Sistemas Aquosos Bifásicos .....	45
2.3.1 Escolha dos Sistemas de Trabalho .....	45
2.3.2 Preparo dos Sistemas Aquosos Bifásicos.....	46
2.3.3 Cálculo do coeficiente de partição .....	46

2.3.4 Cálculo do comprimento da linha de amarração (CLA).....	47
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	47
3.1 Dados de equilíbrio para o sistema Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> e PEG 1500 a 25 °C.....	47
3.2 Coeficiente de partição da ovomucoide.....	49
3.3 Influência do tipo de sal sobre o coeficiente de partição da ovomucoide.....	54
4. CONCLUSÃO .....	56
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
CAPÍTULO 3. ADSORÇÃO DA OVOMUCOIDE EM TANQUES AGITADOS UTILIZANDO RESINA DE TROCA ANIÔNICA .....	60
RESUMO .....	60
1. INTRODUÇÃO .....	60
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	62
2.1 Materiais.....	62
2.2 Experimentos de adsorção da ovomucoide em tanque agitado.....	62
2.2.1 Dados de equilíbrio .....	62
2.2.2 Análises de proteína .....	63
2.2.3 Modelagem dos dados de equilíbrio .....	64
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	64
3.1 Equilíbrio de adsorção de ovomucoide na resina aniônica Streamline Q XL em sistema do tipo tanque agitado .....	64
3.2 Efeito da concentração de sal sobre a adsorção da ovomucoide.....	67
3.3 Efeito do pH sobre a adsorção da ovomucoide.....	70
4. CONCLUSÃO .....	71
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
CAPÍTULO 4. ADSORÇÃO DA OVOMUCOIDE EM TANQUES AGITADOS UTILIZANDO RESINA DE INTERAÇÃO HIDROFÓBICA.....	75
RESUMO .....	75
1. INTRODUÇÃO .....	75
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	77
2.1 Materiais.....	77
2.2 Experimentos de adsorção da ovomucoide em tanque agitado.....	77



2.2.1 Dados de equilíbrio .....	77
2.2.2 Análises de proteína .....	78
2.2.3 Modelagem dos dados de equilíbrio .....	79
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	79
3.1 Efeito do tipo e concentração de sal sobre a adsorção da ovomucoide .....	79
4. CONCLUSÃO .....	84
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	84
CONCLUSÃO GERAL .....	88

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1. REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Seqüência de aminoácidos da ovomucoide. ....	7
Figura 2. Representação esquemática da dupla camada elétrica.....	10
Figura 3. Estrutura dos ligantes usados na CIH. ....	16
Figura 4. Influência dos sais nos efeitos salting-out e salting-in. ....	17
Figura 5. Representação esquemática dos dois modelos de estado da proteína (CHEN e SUN, 2003).....	18
Figura 6. Diagrama de fase para sistemas aquosos bifásicos, expresso em coordenadas retangulares. ....	24
Figura 7. Representação planar parcial da molécula de PEG com os sítios disponíveis para as interações com os demais componentes do sistema. ....	31

### CAPÍTULO 2. PARTIÇÃO DA OVOMUCOIDE EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS

Figura 1. Diagrama de equilíbrio de fase para o sistema contendo PEG 1500 + Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> + água a 25 °C. ....	48
Figura 2. Influência do tipo de cátion formador do sistema aquoso bifásico sobre o coeficiente de partição da ovomucoide. ....	55
Figura 3. Influência do tipo de ânion formador do sistema aquoso bifásico sobre o coeficiente de partição da ovomucoide. ....	55

### CAPÍTULO 3. ADSORÇÃO DA OVOMUCOIDE EM TANQUES AGITADOS UTILIZANDO RESINA DE TROCA ANIÔNICA

Figura 1. Gráfico semi-recíproco da adsorção de ovomucoide na resina aniônica Streamline Q XL. (a) pH 6,2; (b) pH 7,0 e (c) pH 8,0. ....	66
Figura 2. Isotermas de adsorção de Ovomucoide em resina aniônica (Streamline QXL) em diferentes concentrações de NaCl, pH 6,2 e temperatura de 25 °C, em que os símbolos representam os dados experimentais e (-) representa o ajuste do modelo de Langmuir. ....	67

Figura 3. Isotermas de adsorção de Ovomucoide em resina aniônica (Streamline QXL) em diferentes concentrações de NaCl, pH 7,0 e temperatura de 25 °C, em que os símbolos representam os dados experimentais e (-) representa o ajuste do modelo de Langmuir. ....	68
Figura 4. Isotermas de adsorção de Ovomucoide em resina aniônica (Streamline QXL) em diferentes concentrações de NaCl, pH 8,0 e temperatura de 25 °C, em que os símbolos representam os dados experimentais e (-) representa o ajuste do modelo de Langmuir. ....	68
Figura 5. Efeito do pH sobre a capacidade máxima de adsorção ( $q_m$ ) da ovomucoide em resina aniônica, à 25 °C em diferentes concentrações de sal. ....	70

#### CAPÍTULO 4. ADSORÇÃO DA OVOMUCOIDE EM TANQUES AGITADOS UTILIZANDO RESINA DE INTERAÇÃO HIDROFÓBICA

Figura 1. Isotermas de adsorção de Ovomucoide em resina de interação hidrofóbica (Streamline phenyl) em diferentes concentrações de NaCl, pH 7,0 e temperatura de 25 °C, em que os símbolos representam os dados experimentais e (-) representa o ajuste do modelo de Langmuir. ....	80
Figura 2. Isotermas de adsorção de Ovomucoide em resina de interação hidrofóbica (Streamline phenyl) em diferentes concentrações de Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , pH 7,0 e temperatura de 25 °C, em que os símbolos representam os dados experimentais e (-) representa o ajuste do modelo de Langmuir. ....	80
Figura 3. Isotermas de adsorção de Ovomucoide em resina de interação hidrofóbica (Streamline phenyl) em diferentes concentrações de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , pH 7,0 e temperatura de 25 °C, em que os símbolos representam os dados experimentais e (-) representa o ajuste do modelo de Langmuir. ....	81
Figura 4. Efeito do tipo de sal sobre a capacidade máxima de adsorção ( $q_m$ ) da ovomucoide em resina de interação hidrofóbica, à 25 °C em diferentes concentrações de sal. ....	84

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1. Composição química do ovo .....	5
Tabela 2. Elevação da tensão superficial ( $\sigma$ ) na presença de diferentes sais. ....	17

### CAPÍTULO 2. PARTIÇÃO DA OVOMUCOIDE EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS

Tabela 1. Dados de equilíbrio para os sistemas formados por PEG 1500 + Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> + água a 25 °C. ....	48
Tabela 2. Dados dos SABS formados por PEG 1500 e os diferentes sais utilizados. ....	50

### CAPÍTULO 3. ADSORÇÃO DA OVOMUCOIDE EM TANQUES AGITADOS UTILIZANDO RESINA DE TROCA ANIÔNICA

Tabela 1. Dados de equilíbrio para a adsorção da ovomucoide em resina de troca aniônica (Streamline Q XL) em tanques agitados.....	66
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

SABs - Sistemas Aquosos Bifásicos;

pI - Ponto Isoelétrico;

PEG – Polietilenoglicol;

$K_p$  - Coeficiente de Partição

$W_{FS}$  - Concentração de equilíbrio da proteína particionada na fase superior;

$W_{FI}$  - Concentração de equilíbrio da proteína particionada na fase inferior;

CLA - Comprimento da Linha de Amarração;

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

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

$\text{Li}_2\text{SO}_4$  - Sulfato de Lítio;

$\text{Na}_2\text{SO}_4$  - Sulfato de Sódio;

$\text{MgSO}_4$  - Sulfato de Magnésio;

$\text{Na}_2\text{CO}_3$  – Carbonato de Sódio;

$\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$  - Citrato de Sódio;

$\text{NaCl}$  – Cloreto de sódio;

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – Sulfato de amônio

$y_{\text{sup}}$  - Recuperação teórica da proteína na fase superior (%);

$y_{\text{inf}}$  - Recuperação teórica da proteína na fase inferior (%);

$V^S$  e  $V^i$  - Volume da fase superior e inferior, respectivamente;

$n^S$  e  $n^i$  - número de moléculas na fase superior e inferior, respectivamente;

$\rho$  - densidade;

$q$  - quantidade de proteína adsorvida por unidade de massa do adsorvente ( $\text{mg g}^{-1}$ );

$K_d$  - constante de dissociação do complexo proteína-adsorvente;

$q_m$  - quantidade máxima de soluto adsorvido ( $\text{mg g}^{-1}$ );

$C$  – concentração de equilíbrio da proteína na fase líquida ( $\text{mg mL}^{-1}$ );

CTI – Cromatografia de troca iônica;

CIH – Cromatografia de interação hidrofóbica;

$\Delta G$  – variação da energia livre de Gibbs;

$\Delta H$  – Variação da entalpia;

$\Delta S$  – Variação da entropia;

T – temperatura;

$\Phi_i^S$  e  $\Phi_i^I$  - frações volumétricas do componente “i” na fase superior e inferior, respectivamente;

$w_{ij}$  - par efetivo entre os componentes formadores do SAB “i” e “j”;

$w_{iS}$  - par efetivo entre o componente “i” na fase superior ou inferior com o soluto “s”;

$MM_s$  – massa molar da proteína;

R – constante universal dos gases;

$\mu$  - potencial químico;

$\Delta\phi$  - diferença de potencial elétrico;

$z_i$  – carga nominal;

N – número de Avogrado.

## RESUMO

OLIVEIRA, Fabíola Cristina de Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2009. **Estudo da partição da proteína ovomucoide em sistemas aquosos bifásicos e em resinas aniônica ou hidrofóbica.** Orientadora: Jane Sélia dos Reis Coimbra. Coorientadores: Edwin Elard Garcia Rojas, Luis Henrique Mendes da Silva e Maria do Carmo Hespanhol da Silva.

Neste trabalho foi avaliada a aplicação da técnica de extração líquido-líquido utilizando sistemas aquosos bifásicos (SAB) para a separação da proteína ovomucoide, presente na clara de ovo. Esta técnica pode ser usada para purificação de biomoléculas em larga escala pela possibilidade de partição seletiva com altos rendimentos. Os SABs avaliados foram compostos por PEG 1500 e sais inorgânicos (sulfato de lítio, sulfato de sódio, sulfato de magnésio, carbonato de sódio e citrato de sódio), a temperatura de 25 °C. Os resultados mostraram que o coeficiente de partição variou de 0,02 a 6,0, o que mostra que, dependendo do sistema empregado, a proteína se concentra, ou na fase inferior (rica em sal) ou na fase superior (rica em PEG). Os maiores valores do coeficiente de partição foram obtidos em sistemas compostos por carbonato de sódio e os menores em sistemas compostos por sulfato de magnésio, sendo que neste último obteve-se uma porcentagem de recuperação superior a 90 %. As diferentes tendências apresentadas pelo coeficiente de partição em função das propriedades dos sistemas mostra que é possível separar adequadamente a proteína da mistura, o que estabelece esse sistema como uma alternativa a ser considerada no planejamento de processos de recuperação e purificação de biomoléculas. Foi avaliado, também, o comportamento adsorptivo da ovomucoide em resina de troca aniônica (Streamline Q XL) e de interação hidrofóbica (Steramline Phenyl), em tanques agitados, a temperatura de 25 °C, em diferentes condições experimentais. Para a resina de troca aniônica foram estudadas diferentes concentrações de NaCl (0,00; 0,03; 0,07 e 0,10) mol L<sup>-1</sup> e três valores de pH (6,2; 7,0 e 8,0). O modelo de Langmuir ajustou-se aos dados experimentais, com R<sup>2</sup> superiores a 0,99, observando-se que com o aumento da concentração de sal e do pH tem-se uma diminuição na capacidade de adsorção da resina. Já para a resina de interação hidrofóbica foi avaliada a influência do tipo de sal (NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e da sua concentração (0,3; 0,5; 0,8 e 1,0) mol L<sup>-1</sup>, em pH igual a 7,0. O modelo de Langmuir foi ajustado aos dados experimentais, observando-se que com o

aumento da concentração de sal tem-se um incremento na capacidade de adsorção da resina. Quanto ao tipo de sal, o  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  promoveu uma maior adsorção da proteína na resina.



## ABSTRACT

OLIVEIRA, Fabíola Cristina de Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2009. **Study of partition of ovomucoid protein in aqueous two-phase systems and anionic or hydrophobic resins.** Adviser: Jane Sélia dos Reis Coimbra. Co-advisers: Edwin Elard García Rojas, Luis Henrique Mendes da Silva and Maria do Carmo Hespanhol da Silva.

In this work, the application of the liquid-liquid extraction technique with aqueous two-phase systems (ATPS) was evaluated for the separation of ovomucoid, an egg white protein. This technique is an advisable purification process applied to large scale since it provides a selective partition with high yields. The ATPS were composed by PEG 1500 and an inorganic salt (lithium sulfate, sodium sulfate, magnesium sulfate, sodium carbonate and sodium citrate), at 25 ° C. The results showed that the partition coefficient ranges from 0.02 to 6.0, showing that, depending on the system used, the protein concentrates either in the bottom phase (salt-rich) or in the upper phase (PEG-rich). The highest values of the partition coefficient were obtained in systems composed of sodium carbonate and the smallest ones in systems composed of magnesium sulfate, and in this last one it was obtained a recovery percentage higher than 90%. The different trends for the partition coefficient according to the properties of the systems show that it is possible to separate the properly protein of the mixture, which states that system as an alternative to be considered in the planning processes of recovery and purification of biomolecules. It was also evaluated the ovomucoid adsorption behavior in anionic exchange resin (Streamline Q XL) and hydrophobic interaction resin (Streamline Phenyl) in stirred tanks at 25 ° C, in different experimental conditions. For anionic exchange resin different NaCl concentrations (0.00, 0.03, 0.07 and 0.10) mol L<sup>-1</sup> and three pH values (6.2, 7.0 and 8.0) were studied. The Langmuir model fitted to the experimental data, with R<sup>2</sup> higher than 0.99. A reduction in the ovomucoid adsorption capacity was observed with the increasing concentration of salt and pH. The influence of the type of salt (NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) and its concentration (0.3, 0.5, 0.8 and 1.0) mol L<sup>-1</sup>, in pH 7.0, was evaluated in the hydrophobic interaction resin. The experimental data were fitted by Langmuir model, and an increase in the adsorption capacity was observed with increasing

concentration of salt. A higher adsorption of protein in the resin was obtained using the salt  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

## INTRODUÇÃO GERAL

O ovo é uma fonte de proteína altamente nutritivo e é consumido em grande quantidade no mundo todo (URISU et al., 1997). É também um alimento de baixo custo, acessível a todas as camadas da população e com elevada capacidade de produção.

A clara de ovo é uma fonte natural de proteínas de interesse tecnológico e de reconhecido valor nutricional e biológico (JULIÀ et al. 2007). A ovalbumina, a conalbumina ou ovotransferrina, a ovomucoide e a lisozima são quatro proteínas que representam mais de 80% da proteína total (LINDEN e LORIENT, 1996). Apesar da importância nutricional e tecnológica destas proteínas, elas são identificadas como as principais proteínas alergênicas da clara, porém estudos mostram que a ovomucoide é o componente que causa o maior número de reações alérgicas (JULIÀ et al. 2007; MINE e ZHANG, 2002).

A ovomucoide, que constitui 11 % do total de proteínas da clara, é uma proteína composta de 186 aminoácidos, altamente glicosilada contendo (20 a 25) % de carboidratos. Apresenta massa molar de 28 kDa, ponto isoelétrico de 4,1 e atividade de inibição da tripsina (MINE e RUPA, 2004). Apresenta alta resistência ao calor e a digestão proteolítica, sendo porém, uma proteína altamente alergênica (RUPA e MINE, 2006; MINE et al., 2003; URISU et al., 1997). A característica de estabilidade térmica da ovomucoide pode ser usada na produção de nanogéis de proteínas ou biofilmes resistentes a temperaturas maiores que 65 °C (URISU et al., 1997; LEMON-MULÉ et al., 2008). A alta resistência ao calor e à proteólise fazem da ovomucoide um bom marcador para presença de ovo em produtos alimentícios até mesmo naqueles submetidos a tratamento térmico (GU et al. 1986; MATSUDA et al. 1983; URISU et al., 1997).

Desta maneira, sendo a clara um ingrediente muito utilizado na tecnologia de alimentos, o estudo de novos processos para a separação da ovomucoide possibilita a obtenção de uma proteína que aumente a estabilidade térmica de alimentos. Além disso, a proteína purificada poderia ser utilizada em estudos de métodos para inativação da sua capacidade alergênica sem riscos para saúde.

Os processos convencionais de separação e purificação de biomoléculas, como precipitação com sais ou extração com solventes, apresentam desvantagens associadas à desnaturação e baixa pureza. Assim, torna-se necessário o

desenvolvimento de novas técnicas como a adsorção e a extração líquido-líquido por SAB que possibilitem a separação e purificação da proteína mantendo a sua estrutura nativa.

A adsorção é uma técnica, na qual certos componentes de uma fase fluida são transferidos para a superfície de um adsorvente sólido, em um fenômeno de superfície. A cromatografia de adsorção em tanques agitados, ou batelada, é um processo simples, usado na avaliação do equilíbrio de adsorção e dessorção, na cinética de adsorção das proteínas (CHANG e CHASE, 1996; ZHANG e SUN, 2002; TONG et al., 2003; CHEN et al., 2003), na determinação de parâmetros de modelos como equilíbrio de adsorção e difusividade intrapartícula, empregados na simulação de processos cromatográficos em grande escala, como de leite expandido e leite móvel simulado (LI et al, 2003).

A escolha da técnica cromatográfica para efetuar dada separação dependerá de certas propriedades biológicas e físico-químicas dos compostos de interesse, como características bioespecíficas (cromatografia por bioafinidade), hidrofóbicas (cromatografia por interação hidrofóbica) e carga líquida (cromatografia de troca iônica), entre outras.

A extração líquido-líquido, que utiliza sistemas bifásicos aquosos é um processo eficiente para separar bioconstituintes, visto que o tipo de sistema utilizado no processo extrativo (usualmente polietilenoglicol, dextrana e água ou polietilenoglicol, sal e água) apresenta alto teor de água em cada fase (entre 60% e 90%). Isto resulta em um ambiente ameno para o trabalho com um componente biologicamente ativo, o qual preserva a sua estabilidade molecular, possibilitando o seu processamento neste meio. Estes sistemas apresentam viscosidade e tensão superficial baixas e densidade próximas às da água. Trata-se ainda de um sistema com alta seletividade, de custo relativamente baixo, que apresenta facilidade de aumento de escala e possibilidade de reciclagem dos reagentes utilizados (ALBERTSSON, 1986; COIMBRA 1997).

Neste trabalho foi avaliada a partição da ovomucoide em sistemas aquosos bifásicos utilizando diferentes sais bem como o processo de adsorção em tanques agitados da proteína ovomucoide empregando resina aniônica e interação hidrofóbica, em diferentes condições de pH, concentração e tipo de sal.

## **OBJETIVO GERAL**

- Analisar a viabilidade técnica da extração líquido-líquido utilizando sistemas aquosos bifásicos e da adsorção em tanques agitados, empregando resina de troca iônica e de interação hidrofóbica, para o desenvolvimento de processos de separação e purificação da proteína ovomucoide.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Calcular o coeficiente de partição e a porcentagem de recuperação teórica da ovomucoide nos sistemas aquosos bifásicos.
- Estudar a influência do tipo de sal formador de sistema aquoso bifásico (citrato de sódio, sulfato de lítio, sulfato de sódio, sulfato de magnésio e carbonato de sódio) e da concentração de PEG e sal sobre a partição da ovomucoide.
- Obter isotermas no equilíbrio adsorptivo da proteína ovomucoide empregando resina de troca aniônica e de interação hidrofóbica.
- Determinar a influência do pH e concentração de sal no processo de adsorção da proteína ovomucoide empregando resina de troca aniônica.
- Determinar a influência do tipo e concentração de sal no processo de adsorção da proteína ovomucoide, empregando resina de interação hidrofóbica.
- Ajustar o modelo de Langmuir aos dados experimentais para a predição do equilíbrio.

## CAPÍTULO 1

### 1. REVISÃO DE LITERATURA

#### 1.1 Ovo de Galinha

O ovo de galinha (*Gallus domesticus*) constitui um produto natural e com alto valor nutricional. Adicionalmente, apresenta baixo custo, quando comparado a qualquer outro alimento de origem animal (SIM, 1995). Em 2001, o Brasil ocupou a sétima posição na produção mundial de ovos com 2,82 % do total comercializado (SOUSA, 2008).

Atualmente, o Brasil ainda ocupa o 7º lugar como produtor mundial de ovo de galinha. Tal produtividade apresenta grande potencial de crescimento e desenvolvimento (SOUSA, 2008). No 2º trimestre de 2008 foram produzidas 563,607 milhões de dúzias de ovos de galinha, com altas de 4,8% em relação ao 2º trimestre de 2007 e de 0,2% em relação ao 1º trimestre de 2008. São Paulo é o principal estado produtor, com mais de 32,0% do total nacional (IBGE, 2008).

Em torno de 80% do ovo “in natura” de uma granja segue diretamente para o mercado consumidor. O restante destina-se ao uso industrial, geralmente na forma de clara, gema ou ovo integral desidratado. O produto desidratado é normalmente utilizado como ingrediente alimentar no preparo de biscoito, bolo, doce, maionese e massa (SIM, 1995).

O ovo de galinha constitui uma fonte natural de ácidos graxos, minerais, proteínas, triacilgliceróis e vitaminas. Quanto ao valor nutricional em proteínas, somente o leite materno supera o ovo de galinha, sendo este superior à carne bovina, carne de ave, carne de porco, leite bovino e pescado (ALLEONI e ANTUNES, 2004; BERTECHINI, 2006).

A casca, clara e gema compreendem em torno de 8% a 12%, 56% a 62% e 28% a 32% do ovo de galinha fresco, respectivamente, conforme demonstrado na Tabela 1. A casca constitui uma fonte natural de Ca, Cu, P e Mg. A clara de ovo apresenta alto teor de umidade, sendo rica em proteínas com alto valor nutricional e tecnológico, como a ovalbumina, ovotransferrina (conalbumina), ovomucina e lisozima, o que desperta amplo interesse no campo de ensino e pesquisa, bem como na esfera industrial. A gema apresenta baixo teor em carboidratos, sendo, entretanto,

rica em triacilgliceróis e proteínas, como a fosvitina e a lipovitelina. Adicionalmente, constitui uma expressiva fonte de vitamina A, do complexo B, vitamina D, vitamina E, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oléico, ácido linoléico, ácido linolênico, Ca, Fe, Mg, Na, Se e Zn (ALLEONI e ANTUNES, 2004; FENNEMA, 1993).

**Tabela 1.** Composição química do ovo

Componente	Proteína (%)	Lipídios (%)	Carboidratos (%)	Cinzas (%)	Água (%)
Ovo integral	12,8-16,4	10,5-11,8	0,3-1,0	0,8-0,1	74,6
Gema	15,7-16,6	31,8-35,5	0,2-1,0	1,1	48,8
Clara	9,7-10,6	0,03	0,4-0,9	0,5-0,6	88,0
Casca	4,0	-	-	95	1,0

Fonte: Rojas, 2004.

## 1.2 Clara de Ovo

Como a gema, a clara de ovo apresenta baixo teor de carboidratos, sendo, entretanto, relativamente abundante em Mg e Na. A clara é composta, em quase sua totalidade, por água e proteínas, com alguns minerais. Este produto de origem animal é único, pois 90% de sua matéria seca é composta de proteínas. Também contém glicose livre, com concentração duas vezes maior do que no plasma sanguíneo. O pH da clara no ovo fresco é de 7,6 a 7,9, aumentando para até 9,7 durante o armazenamento de acordo com a temperatura e a difusão do CO<sub>2</sub> através da casca (LINDEN E LORIENT, 1996).

A clara pode ser considerada um sistema protéico composto de fibras de ovomucina e de um sistema coloidal de várias proteínas globulares, que são ativadas com enzimas, inibidores ou anticorpos. A proteína mais abundante é a ovalbumina, seguida da conalbumina, ovomucoide e lisozima. Apresenta em torno de 88% de água e teor de proteínas entre (9,8 e 10,6)%. A ovalbumina, a conalbumina ou ovotransferrina, a ovomucoide e a lisozima são quatro proteínas que representam mais de 80% da proteína total (SGARBIERI, 1996; LINDEN e LORIET, 1996). A clara contém outras proteínas em menor quantidade que também apresentam propriedades funcionais e nutricionais importantes (CHARLEY, 1982; KORHONEN et al., 1998).

### **1.3 Ovomucoide**

A ovomucoide constitui 11 % do total de proteínas da clara, e é uma proteína altamente glicosilada contendo (20 a 25) % de carboidratos. Apresenta uma massa molar de 28 kDa, um ponto isoelétrico de 4,1 e atividade de inibição da tripsina (MINE e RUPA, 2004). A molécula é composta de 186 aminoácidos (Figura 1) que são arranjados em três domínios (DI, DII e DIII), estruturalmente independentes, que são interligadas por ligações peptídicas e cada domínio tem três pontes dissulfeto intradomínio. Esta característica estrutural pode ser a causa da alta resistência ao calor e à digestão proteolítica, assim como sua forte alergenicidade (RUPA e MINE, 2006; MINE et al., 2003; URISU et al., 1997). A característica funcional de estabilidade térmica da ovomucoide pode ser usada na produção de nanogéis de proteínas ou biofilmes resistentes a temperaturas maiores que 65 °C (URISU et al., 1997; LEMON-MULÉ et al., 2008). A alta resistência ao calor e à proteólise fazem da ovomucoide um bom marcador para presença de ovo em produtos alimentícios até mesmo naqueles submetidos a tratamento térmico (GU et al. 1986; MATSUDA et al. 1983; URISU, 1997).





superfície do sólido e que atraem as moléculas de um fluido em contato por um tempo finito (DECHOW, 1989).

O processo de adsorção pode ser brevemente descrito considerando o escoamento de um fluido que contém o soluto entre os espaços vazios externos das partículas adsorventes. O soluto é transportado por difusão, do volume de fluido através de um filme externo, para a partícula, sendo adsorvido na superfície exterior da mesma ou dentro dos poros. O soluto é adsorvido em um sítio desocupado devido a forças elétricas, físicas ou reações químicas. Uma dada molécula pode ser adsorvida e dessorvida várias vezes enquanto permanecer dentro de uma única partícula (FOUST, 1982).

O soluto adsorvido não se dissolve no sólido, mas permanece na sua superfície ou nos poros. No equilíbrio, o soluto adsorvido tem uma pressão parcial igual à existente na fase fluida em contato, e pela simples modificação da temperatura, ou da pressão da operação, o soluto pode ser removido do sólido (FOUST, 1982).

A adsorção de proteínas tem sido utilizada na análise e na purificação de biomoléculas pela indústria de fármacos e de biotecnologia. Este processo se realiza através do movimento de macromoléculas de uma solução líquida para o interior dos poros de um adsorvente previamente selecionado. A velocidade do processo é governada pela difusão externa, pela difusão nos poros e pela capacidade que possui um adsorvente de adsorver um determinado adsorbato. Conhecer a dinâmica e termodinâmica molecular deste processo é um passo imprescindível para o desenvolvimento de equipamentos de adsorção em escala industrial.

#### **1.4.1 Cromatografia de Troca Iônica**

Cromatografia de troca iônica (CTI) é um dos métodos mais comuns utilizados na separação e purificação de biomoléculas (CHEN et al. 2006). Esta técnica baseia-se em interações eletrostáticas entre aminoácidos carregados na superfície das proteínas e resinas eletricamente carregadas, embora outras interações não específicas tais como forças hidrofóbicas podem estar envolvidas (LIN et al. 2001).

É conveniente imaginar a resina trocadora de íons como um gel homogêneo através do qual se distribui uma rede de cadeias hidrocarbônicas. Ligadas a estas cadeias estão grupos iônicos que são imóveis, chamados contra-íons. As cargas destes grupos iônicos são equilibradas pelas cargas opostas de íons difusíveis. Por exemplo, numa resina trocadora catiônica os grupos aniônicos imóveis estão ligados entre si. As cargas destes grupos aniônicos fixos são equilibradas pelos cátions, que podem difundir-se (PESSOA e KILIKIAN, 2005).

A CTI é usada na separação de proteínas, baseando-se na carga da proteína que se quer isolar. Se esta possuir carga positiva, a solução deve passar por uma coluna com carga negativa (impedindo a passagem das proteínas com carga positiva). O processo de purificação por troca-iônica tem como objetivo a adsorção à matriz da proteína-alvo ou dos contaminantes, com posterior eluição (PESSOA e KILIKIAN, 2005).

O princípio básico da cromatografia de troca-iônica baseia-se na competição entre íons de interesse e contaminantes pelos grupos carregados da matriz ou da fase estacionária.

As moléculas de proteína têm em sua superfície grupamentos com cargas positivas e negativas (SILVA, 2000). A carga líquida de uma proteína depende da proporção entre as suas cargas positivas e negativas e varia de acordo com o pH. O pH no qual o número de cargas positivas é igual ao de cargas negativas é denominado ponto isoelétrico (pI). Acima do pI as proteínas possuem carga líquida negativa enquanto abaixo a carga líquida é positiva (PESSOA e KILIKIAN, 2005).

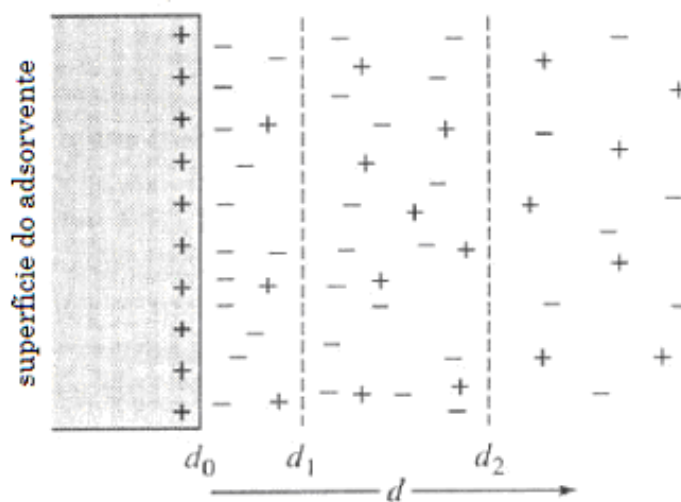
Os contra-íons, também denominados íons de substituição, são íons de baixa massa molar que se ligam à fase estacionária ou às proteínas solúveis na fase móvel. Para que a proteína se ligue à fase estacionária, os contra-íons devem ser eletroliticamente dissociados. Os cátions  $\text{Na}^+$  e  $\text{H}^+$  são contra-íons comumente encontrados em trocadores catiônicos e os ânions  $\text{Cl}^-$  e  $\text{OH}^-$  são os mais utilizados em trocadores aniônicos (PESSOA e KILIKIAN, 2005).

Na troca iônica, a fase líquida, em geral, é uma fase aquosa eletrolítica e o sólido adsorvente é um eletrólito insolúvel no líquido. O mecanismo pelo qual a troca iônica ocorre ainda não é bem entendido, mas algumas teorias explicam de forma satisfatória o fenômeno em questão (FONTAN, 2005).

Uma destas teorias é a teoria da dupla camada elétrica, que se baseia no princípio de que, quando duas fases de constituições químicas diferentes em que

existam espécies carregadas em contato, uma diferença de potencial entre as fases é estabelecida e uma separação de cargas é observada (KUNIN, 1958; ADAMSON, 1990).

Quando uma das fases é sólida e a outra é uma solução eletrolítica, como na troca iônica, várias são as estruturas possíveis da dupla camada elétrica. Adotando como exemplo o trocador aniônico, em que a fase sólida é carregada positivamente e os íons a serem trocados possuem carga negativa, uma estrutura para a dupla camada considera que todo o ânion necessário para neutralizar o potencial elétrico do sólido se disponha em uma única camada situada a uma distância mínima  $\delta$  da sua superfície, conhecida como dupla camada de Helmholtz. Outra estrutura é aquela cuja camada de ânions é completamente difusa, diminuindo a densidade de carga em função da superfície do sólido. A região difusa da camada de ânions é conhecida como camada de Gouy. E finalmente para uma situação intermediária as duas anteriores, onde uma parte da camada de ânions seja eletricamente densa e próxima da superfície sólida, e a outra parte difusa, tem-se a situação conhecida como dupla camada de Stern (FONTAN, 2005; KUNIN, 1958; ADAMSON, 1990). A Figura 2 trata-se de uma representação esquemática da dupla camada elétrica.



Fonte: [http://www2.dbd.pucrio.br/pergamum/tesesabertas/0212140\\_04\\_cap\\_02.pdf](http://www2.dbd.pucrio.br/pergamum/tesesabertas/0212140_04_cap_02.pdf). Acesso: 10/01/2009.

**Figura 2.** Representação esquemática da dupla camada elétrica.

Na CTI de proteínas, a determinação da espessura da dupla camada elétrica é relevante. Devido ao fato da estrutura de uma proteína ser eletricamente carregada, é de se esperar que em volta dela se forme uma dupla camada elétrica. Se esta camada possuir uma densidade de cargas elevada e estiver situada a uma distância muito pequena da estrutura da proteína, a retenção da mesma no adsorvente poderá ser afetada, uma vez que a proteína poderá ser neutralizada. No entanto quando a camada em torno da proteína é difusa o suficiente, a atração eletrostática entre o adsorvente e a proteína permite a aproximação entre eles. Ocorre então uma redistribuição de íons das duas duplas camadas (adsorvente e proteína), sendo assumida uma alta liberação de íons para a solução (KOPACIEWICZ et al., 1983).

Segundo LIN et al. (2001) o processo de adsorção de proteínas em resina de troca iônica pode ser subdividido em cinco etapas: i) desidratação ou deionização da proteína (remoção da dupla camada elétrica); ii) desidratação ou deionização do adsorvente; iii) interações eletrostáticas ou não específicas entre proteína-adsorvente; vi) rearranjo conformacional da proteína após a adsorção e v) redistribuição das moléculas de água e íons na solução.

#### **1.4.2 Equilíbrio de adsorção em trocador iônico**

A capacidade máxima de um adsorvente não pode ser completamente utilizada na prática, devido aos efeitos de transferência de massa envolvidos no processo de contato fluido-sólido. Para estimar a capacidade de adsorção prática ou dinâmica, primeiramente é essencial ter a informação do equilíbrio de adsorção. Então, análises cinéticas são conduzidas dependendo dos tipos de processos de contato (SUZUKI, 1990).

O tempo necessário para que o sistema atinja o equilíbrio é o primeiro passo para a investigação do seu comportamento, podendo ser verificado por meio do estudo da cinética da adsorção. O comportamento no equilíbrio pode ser investigado por meio das isotermas de adsorção. A isoterma de adsorção é o ponto de partida para qualquer análise do processo de adsorção. Ela é uma parte essencial da modelagem da cinética de adsorção e, portanto, essencial para o projeto do processo em batelada ou coluna, eficiência e economia. A isoterma expressa o grau de purificação que pode ser alcançado, a quantidade aproximada de adsorvente

necessária para alcançar um determinado grau de pureza e a sensibilidade do processo de purificação na concentração do soluto (DECHOW, 1989).

### **1.4.3 Variáveis que influenciam no processo de troca iônica**

#### **1.4.3.1 Temperatura**

Antes considerada sem importância, a influência da temperatura no equilíbrio de troca iônica tem despertado cada vez mais o interesse de pesquisadores. O efeito da temperatura é um fenômeno complexo, que pode afetar tanto as propriedades físico-químicas do adsorvente, como as constantes de dissociação de eletrólitos, quanto as propriedades do soluto, como mudanças conformacionais de proteínas (MIHELIČ et al., 2003). A influência da temperatura no processo de adsorção de pequenos compostos inorgânicos e aminoácidos tem sido amplamente estudada, enquanto estudos com compostos de alta massa molar, em particular de proteínas, não têm sido extensivamente feitos (FANG et al., 1996). Em alguns casos, a elevação na temperatura aumenta a capacidade adsortiva (MIHELIČ et al., 2003), enquanto em outros, ocorre o inverso (HUANG et al., 1990). Tais diferenças ainda não são bem compreendidas, mas sabe-se que quando o processo de adsorção é exotérmico, o fenômeno é entalpicamente dirigido e a capacidade adsortiva da resina aumenta com a elevação da temperatura. Já para o processo de adsorção endotérmico, a contribuição entrópica é maior, ocorrendo comportamento inverso (FANG et al., 1996; MIHELIČ et al., 2003). Estudos demonstram que a mudança na temperatura de trabalho influencia na conformação das proteínas e na liberação de contra-íons e água das superfícies do adsorvente e da proteína (MIHELIČ et al., 2003), podendo assim ser usada no ajuste da resolução cromatográfica na eluição de proteínas (FANG et al., 1996). Sabendo-se que elevadas temperaturas levam à desnaturação e à precipitação de proteínas (FANG et al., 1996), o que se busca em um processo de purificação de proteínas é otimizar a temperatura de trabalho, aumentando a capacidade adsortiva da resina com o mínimo de desnaturação protéica possível.

### 1.4.3.2 Tipo e Concentração de Sal

É conhecido que o tipo de sal pode afetar o processo de troca iônica de várias maneiras. HEARN et al. (1991) verificaram para diferentes ânions monovalentes (Cl<sup>-</sup> e Br<sup>-</sup>) que o raio iônico e a eletronegatividade influenciam o comportamento da adsorção de proteínas em trocadores aniônicos. FANG et al. (1996) avaliaram o efeito da valência de cátions (Na<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup>), usados como contra-íons na troca catiônica de proteínas, observando maiores valores de coeficientes de atividade quando foi utilizado Na<sup>+</sup> como contra-íon, enquanto o emprego de Ca<sup>2+</sup> permitiu a eluição de proteínas em temperaturas mais elevadas. Quanto à concentração de sal em solução, na cromatografia de troca iônica, quanto maior a concentração de sal, menor a capacidade adsortiva da resina (HUANG et al., 1990; FANG et al., 1996) indicando que a principal força envolvida no processo de troca iônica é a atração eletrostática (LIN et al., 2001).

### 1.4.3.3 pH

Alguns estudos sobre o efeito do pH no processo de troca iônica de proteínas têm sido relatados ao longo dos anos (HUANG et al., 1990; LIN et al., 2001; GAO et al. 2007). Os resultados encontrados sobre a influência do pH no processo de troca iônica apresentam algumas divergências. HUANG et al. (1990) observaram que a elevação do valor de pH de 7,6 para 9,6 aumentou a capacidade de adsorção de conalbumina em um trocador aniônico. Já na adsorção de albumina de ovo, verificou-se maior capacidade adsortiva em pH 8,6 do que em pH 9,6, utilizando-se a mesma resina, apesar de ambas possuírem carga líquida negativa nessa faixa de pH (KOPACIEWICZ et al., 1983). LIN et al. (2001) observaram, por meio da variação no pH, que forças não-iônicas, como a interação hidrofóbica, também atuam no processo de troca iônica. A influência do pH no processo de troca iônica de proteínas está associada ao ponto isoelétrico (pI) da proteína, e conseqüentemente à sua carga líquida em diferentes valores de pH. Quanto mais distante do pI, maior é a carga líquida da proteína e maior poderá ser a interação entre ela e o adsorvente (KOPACIEWICZ et al., 1983). No entanto, condições extremas de pH podem levar a alterações conformacionais e à perda de atividades específicas, como no caso de enzimas. Tais alterações conformacionais podem levar a um aumento na

hidrofobicidade da proteína, reduzindo sua interação com o trocador iônico. Deve-se buscar, portanto, o melhor valor de pH para que seja obtida a máxima quantidade adsorvida com um mínimo de mudanças conformacionais e de perda de atividades.

#### **1.4.3.4 Natureza da Proteína**

Dependendo da composição de aminoácidos, a proteína poderá ter um variado número de grupos carregados, levando a diferentes valores de pI e arranjos espaciais, em função de sua estrutura primária, secundária, terciária e quaternária (KOPACIEWICZ et al., 1983). SKIDMORE e CHASE (1990), analisando a adsorção de Albumina de Soro Bovino (BSA) e Lisozima (LIS) em uma resina catiônica, verificaram que, além da diferença de carga líquida entre as proteínas, a diferença na massa molar também influenciou o processo adsorptivo. A LIS (MM ~14 kDa) apresentou maior capacidade de adsorção que a BSA (MM ~69 kDa) em condições mono e multicomponentes, dentre outros motivos, por ter maior facilidade em penetrar nos poros do adsorvente. KOPACIEWICZ et al. (1983), avaliando a retenção de diferentes proteínas em adsorventes catiônicos e aniônicos ao longo de uma grande faixa de pH, observaram que, além da carga líquida das proteínas, a distribuição das cargas em seu interior e na superfície contribui para a orientação espacial da proteína ao ser adsorvida.

#### **1.4.3.5 Natureza do Adsorvente**

Como regra geral, para a retenção de proteínas em condições de pH acima do pI (com carga líquida negativa) utilizam-se trocadores aniônicos (com grupos fixos positivos), enquanto para condições abaixo do seu pI, utilizam-se trocadores catiônicos (KOPACIEWICZ et al., 1983; GRANDISON, 1996). No entanto, outras características dos adsorventes podem exercer influência no processo de troca iônica. ANSPACH et al. (1990) observaram para a adsorção de lisozima melhores resultados para os adsorventes com base de sílica que os de base polimérica. Enquanto os primeiros mantinham sua estrutura intacta ao longo do tempo, os adsorventes poliméricos apresentaram deformações em sua estrutura, causando um excesso de compactação e impedimento estérico para a entrada da proteína nos poros da resina. FANG et al. (1996) verificaram diferenças no mecanismo de adsorção de proteínas



em adsorventes do tipo ‘tentáculo’ (com poros de grande diâmetro nominal) e em adsorventes tradicionais microporosos, principalmente na morfologia dos ligantes e acessibilidade aos sítios de adsorção. Os autores submeteram os adsorventes às mesmas condições de trabalho com diferentes proteínas, observando alterações no comportamento de cada uma.

#### **1.4.4 Cromatografia por interação hidrofóbica (CIH)**

A cromatografia por interação hidrofóbica (CIH) tem por fundamento as interações hidrofóbicas dos ligantes imobilizados na fase estacionária com as regiões hidrofóbicas das biomoléculas. A adsorção pode ser aumentada com a elevação do teor de sal na fase móvel e a eluição é alcançada pela redução da concentração de sal no eluente (MELANDER et al., 1984). A adsorção requer a presença dos chamados sais kosmotrópicos, como sulfato de sódio, que diminuem a disponibilidade de moléculas de água na solução, aumentam a tensão interfacial e as interações hidrofóbicas. A elevação da concentração salina na solução, quando utiliza estes tipos de sais, reduz a solubilidade das proteínas e aumentam o nível de entropia na camada das moléculas de água que envolvem grupos hidrofóbicos.

Esse conceito fundamenta-se na teoria bem conhecida segundo a relação termodinâmica:

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (1)$$

Em que o termo  $\Delta G$  expressa a variação da energia livre de Gibbs envolvida no processo,  $\Delta H$  expressa a variação da entalpia e  $\Delta S$  a variação de entropia.

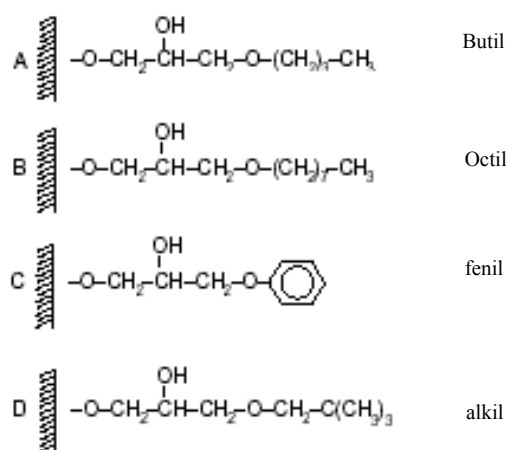
Nessa teoria considera-se que o deslocamento das moléculas ordenadas de água dos arredores dos ligantes hidrofóbicos e das proteínas origina um incremento da entropia ( $\Delta S > 0$ ). Como as mudanças na entalpia são pequenas, comparadas com os valores de  $T\Delta S$ , é computada uma variação negativa na energia livre de Gibbs ( $\Delta G < 0$ ) do sistema, implicando que a interação ligante hidrofóbico-proteína é termodinamicamente favorável (PESSOA e KILIKIAN, 2005).

## 1.4.5 Fatores que afetam a CIH

### 1.4.5.1 Tipo de ligante

A escolha das fases estacionária e móvel é fundamental para o bom desempenho da CIH. As fases estacionárias para CIH se diferenciam pelo tipo de ligante, tamanho da cadeia do ligante, densidade do ligante e tipo de matriz. Na Figura 3, apresentam-se diferentes estruturas de ligantes para CIH. A maioria dos ligantes são alcanos de cadeia linear com ou sem um grupo terminal amino. Compostos aromáticos usados como ligantes apresentaram bons resultados, por proporcionarem, além das interações hidrofóbicas, as ligações aromáticas ( $\pi$ - $\pi$ ). Para uma mesma densidade de ligante, a capacidade do adsorvente de CIH para se ligar a proteína aumenta com o aumento do comprimento da cadeia carbônica, devido ao aumento da hidrofobicidade (PESSOA e KILIKIAN, 2005).

Segundo QUEIROZ et al. (2001), pode-se elevar a hidrofobicidade e a força de interação aumentando o tamanho da cadeia n-alquil, embora a seletividade da adsorção possa diminuir. Os suportes são, em sua maioria compostos por carboidratos hidrofílicos (agarose), sílica ou material de copolímeros sintéticos. Para um mesmo tipo de ligante, a seletividade da fase estacionária será alterada em função do suporte empregado.



**Figura 3.** Estrutura dos ligantes usados na CIH.

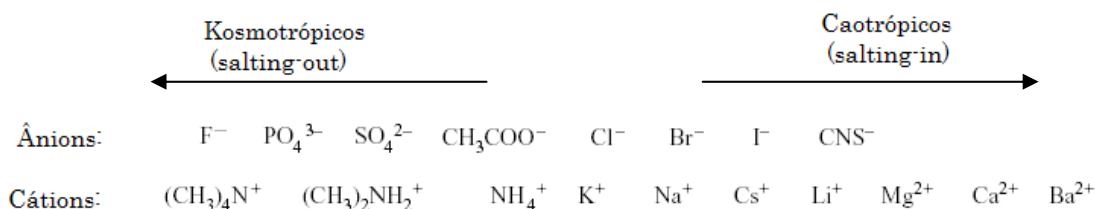
### 1.4.5.2 Tipo e concentração de sal

Diversos sais são promotores de interações entre ligantes fixados nos suportes sólidos e as proteínas na CIH. A influência dos diferentes tipos de sais sobre as interações hidrofóbicas está relacionado ao aumento da tensão superficial (Tabela 2) e ao efeito sobre a solubilidade de proteínas, sendo que tal comportamento segue a série de Hofmeister (Figura 4).

**Tabela 2.** Elevação da tensão superficial ( $\sigma$ ) na presença de diferentes sais.

Sal	$\sigma \times 10^3$ (dina · g /cm · mol)
KClO <sub>4</sub>	1,40
NaCl	1,64
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,02
MgSO <sub>4</sub>	2,10
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,16
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,73
MgCl <sub>2</sub>	3,16

Fonte: ROJAS, 2004.



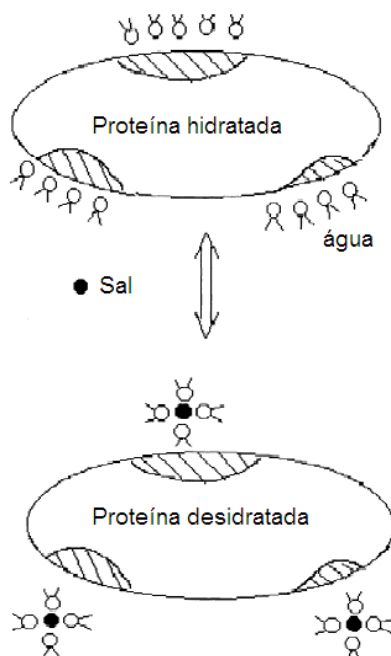
Fonte: CACACE, 1997.

**Figura 4.** Influência dos sais nos efeitos salting-out e salting-in.

Os sais do começo da série promovem as interações hidrofóbicas e são chamados de kosmotrópicos. Esses sais ordenam a estrutura da água líquida, promovendo a desidratação da proteína, enquanto que os sais caotrópicos, desordenam a estrutura da água e então diminuem a força das interações hidrofóbicas (PESSOA e KILIKIAN, 2005).

As moléculas de proteína são associadas, em solução, com uma camada de hidratação. A água ligada previne que as moléculas de proteína se ligam a ligantes hidrofóbicos sobre a superfície do adsorvente. No entanto, na presença de sal, há a desidratação das moléculas de proteínas devido à hidratação das moléculas de sal ao

redor das moléculas de proteína. Assim, as zonas hidrofóbicas expostas na superfície da proteína aumentam com a elevação da concentração de sal, tornando a interação hidrofóbica entre proteína e adsorvente mais forte. Para simplificar o efeito da desidratação da superfície da proteína, CHEN e SUN (2003) assumiram que há somente dois estados da proteína na solução (Figura 5): a proteína hidratada, na qual as zonas hidrofóbicas da proteína estão cobertas pela camada de hidratação, e a proteína desidratada, no qual as regiões hidrofóbicas da proteína ficam expostas devido a hidratação das moléculas de sal. Assim, com o aumento da concentração de sal, aumenta a fração de proteína desidratada. Os dois estados da proteína estão em equilíbrio na solução salina e somente a proteína desidratada interage com os ligantes hidrofóbicos.



**Figura 5.** Representação esquemática dos dois modelos de estado da proteína (CHEN e SUN, 2003).

A presença de sais incrementa a energia livre das proteínas e esse incremento é proporcional à área superficial das biomoléculas. A associação intermolecular dos grupos hidrofóbicos minimiza o incremento da energia livre pelo decréscimo da área de contato da proteína com o meio solvente polar. Em meio de elevada concentração de sal, a forma ligada da proteína é termodinamicamente mais estável, comparada com a proteína não ligada. Isto explica porque a proteína liga-se a fase estacionária a altas concentrações salinas (CHEN e SUN, 2003).

A retenção de proteínas na CIH, baseada nas mudanças de conformação, nem sempre podem ser explicadas por uma correlação simples entre as interações hidrofóbicas e a influência de sais na tensão superficial, visto que as proteínas modificam constantemente sua conformação, e algumas destas conformações são reforçadas pelos diferentes adsorventes e certos tipos de sais.

Alterações no tipo de sal que compõe a fase móvel influenciam a retenção das proteínas e, portanto, a seletividade da separação (RIPPEL e SZEPESY, 1994). Assim, pode-se observar que a influência da concentração de sal sobre a retenção das proteínas é um fenômeno complexo.

### **1.4.5.3 pH**

O pH da fase móvel também afeta a retenção de biomoléculas. Geralmente uma elevação no pH diminui o grau de interação hidrofóbica entre as proteínas e os ligantes, devido ao aumento do caráter hidrofílico das proteínas decorrente de mudanças na sua carga (PESSOA e KILIKIAN, 2005). Por outro lado o decréscimo no pH resulta em um aumento aparente das interações hidrofóbicas, por exemplo, QUEIROZ et al. (2001) observaram que uma redução no pH, aparentemente, aumentou o grau das interações hidrofóbicas.

### **1.4.5.4 Temperatura**

Em geral, pode-se afirmar que na CIH o aumento da temperatura melhora a retenção da proteína. Baseado na teoria desenvolvida para a interação de solutos hidrofóbicos em água, pode-se considerar que a ligação de proteínas em adsorventes hidrofóbicos é favorecida pela entropia, o que implica que a interação aumenta com o aumento da temperatura. É interessante notar que as forças de atração de Van der Waals, as quais estão presentes na interação hidrofóbica, também aumentam com a temperatura (PESSOA e KILIKIAN, 2005).

No entanto, esse efeito positivo de adsorção com o aumento da temperatura nem sempre é observado, indicando que o papel da temperatura na CIH é de natureza complexa. Esse comportamento deve-se provavelmente, aos efeitos da temperatura na conformação estrutural das diferentes proteínas e das respectivas solubilidades em soluções aquosas (PESSOA e KILIKIAN, 2005).

#### **1.4.5.5 Aditivos**

Alguns aditivos podem ser utilizados na CIH, não só para melhorar a solubilidade ou modificar a conformação da proteína, assim como para promover a eluição das proteínas ligadas. Os mais utilizados são os álcoois miscíveis em água (por exemplo, etanol e etilenoglicol), detergentes (por exemplo, Triton X-100) e soluções aquosas de sais caotrópicos (PESSOA & KILIKIAN, 2005).

#### **1.4.6 Tanques agitados**

O tratamento em tanques agitados é adotado quando a capacidade do adsorvente e o tempo de equilíbrio termodinâmico são suficientemente grandes para garantir a proximidade da completa adsorção em um único estágio, desejado na maioria dos ensaios laboratoriais. Tanques agitados são muito usados para determinação de isothermas de adsorção e comportamento de transferência de massa entre a fase fluida e o adsorvente, devido à simplicidade dos balanços de massa envolvidos, calculados pela medida de concentração na fase fluida (PERRY et al., 1997).

#### **1.4.7 Isothermas de adsorção**

No projeto de um processo de purificação ou de sua ampliação de escala, é usual o estudo do equilíbrio do soluto entre a solução e o adsorvente usando as isothermas de adsorção (BELLOT e CONDORET, 1993; GRITTI E GUIOCHON, 2003). Em 1916, Langmuir desenvolveu um modelo (Eq. 01) simples para tentar prever o grau de adsorção de um gás sobre uma superfície como uma função da pressão do fluido (LANGMUIR, 1916). Diversos exemplos práticos da utilização do modelo da isoterma de Langmuir para modelagem da adsorção de proteínas podem ser encontrados na literatura científica, incluindo a adsorção de HSA (Albumina do Sangue Humano), lisozima e álcool desidrogenase em Cibacross Blue F3G-A imobilizadas com Sepharose CL-GB, Sepharose 4B, Gelatina GC 700, Fractogel HWSSF, HWG5F, HW75F, Spherosil XOBO3O (ANSPACH et al., 1990), adsorção de BSA (Albumina do Soro Bovino) em adsorventes de quitosana (YOSHIDA &

KATAOKA, 1989), adsorção de BSA e  $\beta$ -lactoglobulina em Streamline phenyl (BONOMO et al., 2006) entre outros.

$$q = \frac{q_m C}{K_d + C} \quad (2)$$

em que  $C$  é a concentração de proteína na fase líquida,  $q$  é a quantidade de proteína adsorvida na matriz,  $q_m$  é a capacidade máxima de adsorção da matriz adsorvente e  $K_d$  é constante de dissociação que representa a razão entre a dessorção e a adsorção.

Segundo FINETTE et al. (1997), quando a molécula de proteína é relativamente pequena, ela se torna facilmente acessível aos ligantes imobilizados na matriz porosa, e o balanço global e dinâmico da adsorção acontece rapidamente. Com isso, o equilíbrio local se torna válido. A isoterma de Langmuir representa um modelo simplificado no caso de adsorção de proteínas, uma vez que este modelo assume: (a) sistema ideal; (b) as moléculas são adsorvidas e aderem à superfície do adsorvente em sítios definidos e localizados; (c) cada sítio pode acomodar uma e somente uma molécula adsorvida; (d) a energia da molécula adsorvida é a mesma em todos os sítios da superfície e não depende da presença ou ausência de outras moléculas adsorvidas nos sítios vizinhos; e (e) todos os sítios de adsorção têm a mesma afinidade com as moléculas de proteína.

As moléculas de proteína podem sofrer alterações conformacionais ou outro tipo de alterações que podem levar a uma perturbação no equilíbrio em solução, conduzindo a desvios significativos no modelo da isoterma de Langmuir (FINETTE et al., 1997). Os adsorventes também estão suscetíveis a alterações e podem possuir números de sítios de adsorção diferentes decorrentes, por exemplo, de imperfeição na fabricação. Contudo, a isoterma de Langmuir tem sido amplamente utilizada para descrever a adsorção de proteínas em trocadores iônicos (GAO et al., 2007), principalmente quando o interesse principal é o estudo da afinidade de ligação com baixas concentrações de proteína adsorvida. Isto é, quando a avaliação do processo adsorptivo é consequência da constante de equilíbrio de adsorção no início do processo. Com isso, o modelo de Langmuir proporciona uma análise razoável do cálculo inicial na avaliação da isoterma, embora possa não ser a melhor escolha para todas as variações de concentração de proteína (LIN et al., 2001).

## 1.5 Sistema Aquoso Bifásico (SAB)

Os sistemas aquosos bifásicos (SABs) são formados por espécies químicas que, quando misturadas em determinadas faixas de composição e temperatura dividem-se em duas fases com composições diferentes. O componente majoritário destes sistemas é a água, fornecendo um ambiente ameno para as biomoléculas evitando, assim, mudanças em suas estruturas e perdas de atividades biológicas (da SILVA e LOH, 2006; ALBERTSSON, 1986; ZASLAVSKY, 1995).

A utilização dos sistemas aquosos bifásicos na partição e purificação de materiais biológicos foi inicialmente proposta por Albertsson em meados da década de 50 (ALBERTSSON, 1986). Nestes casos, a extração por meio de SAB é adequada para substituir a extração convencional por solventes orgânicos, pois, pelo fato do solvente ser a água, são ambientalmente seguros e permitem a separação de partículas sensíveis à desnaturação em outros solventes (GUSTAFSSON et al, 1986). Desde então, as pesquisas nesta área têm-se aprofundado, tornando a utilização dos SAB importante ferramenta na partição e, ou concentração de compostos como células animais ou vegetais, microorganismos, fungos e seus esporos, cloroplastos, mitocôndrias, membrana vesicular, enzimas, proteínas, ácidos nucleicos, vírus, metais, entre outros (HATTI-KAUL, 2001).

Os SABs são formados pela reunião de determinados polímeros, polieletrólitos ou ainda, polímeros em combinação com solutos de baixa massa molar, em uma mesma solução, que formam duas fases acima de certas concentrações. Em ambos os casos duas fases líquidas, que se encontram em equilíbrio termodinâmico, são formadas e diversos solutos, como biomoléculas, podem ser distribuídas desigualmente em cada fase (OLIVEIRA, 2006). As fases são regiões que possuem propriedades termodinâmicas intensivas diferentes, como densidade, índice de refração e composição. Mas como as duas fases dos SABs estão em equilíbrio, nenhuma propriedade termodinâmica está variando em uma dimensão temporal, ou ainda, não há troca resultante de matéria entre as fases. Estas fases estão separadas por uma interface que é a região na qual as propriedades termodinâmicas intensivas de cada fase transitam para valores diferentes, sempre tendendo para o valor daquela propriedade no seio da outra fase em equilíbrio (CARVALHO, 2004).

Existem dois tipos principais de sistemas aquosos bifásicos, os formados por dois polímeros e os que contêm polímero e sal. Nestes casos uma das fases é rica em



polímero e a outra no outro polímero ou sal (ZASLAVSKY, 1995). Os sistemas PEG-sais são atrativos devido ao baixo custo, rápida separação de fases e baixa viscosidade. Por outro lado, apresentam algumas limitações como a desnaturação de biomoléculas em altas concentrações de sal (SILVA e MEIRELLES, 2000).

Os sistemas aquosos bifásicos têm um grande potencial para a eficiente separação das proteínas que podem ser difíceis de separar em uma grande escala, além de ser uma técnica de baixo custo. Estes sistemas têm vantagens importantes em sua habilidade de extrair pequenos materiais particulados (extração direta do meio fermentado) e de obter grandes volumes em uma modalidade contínua com tempo de contato curto (SOUSA, 2008). A técnica de separação em SABs é aconselhável para purificação de proteínas em larga escala porque possibilita separação seletiva, uma baixa tensão superficial, boa biocompatibilidade, bem como a possibilidade de “scale-up” e boa relação custo-benefício. Quando comparada com outras técnicas de recuperação, essa técnica apresenta diversas vantagens, como: operação rápida e contínua, altos rendimentos, reciclagem dos polímeros, minimização da desnaturação de proteínas e facilidade de separar materiais particulados (CASCONE et al., 1991; CASTRO e AZNAR, 2005; COIMBRA et al., 1997; PORTO et al., 2004).

Um amplo conjunto de variáveis, tais como: temperatura, tipo e concentração de sal, concentração e massa molar do polímero, influencia a separação de fases em SABs e, conseqüentemente, o processo extrativo de um determinado biocomponente (ASENJO, 1990). A base da partição em SAB é a distribuição seletiva de compostos entre as duas fases. Por isto, a predição e a interpretação da partição de biopartículas em sistemas aquosos bifásicos é uma difícil tarefa, embora a manipulação das propriedades do sistema tornando predominante um determinado tipo de interação venha a ser uma forma de controlar a partição (HATTI-KAUL, 2001). Daí a importância de estudar diferentes SABs, ampliando e facilitando a utilização dos mesmos na extração líquido-líquido.

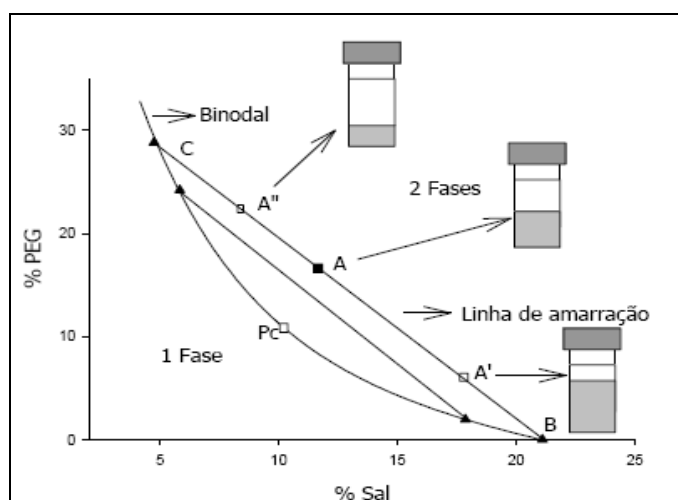
### **1.5.1 Fundamentos sobre a Formação dos SABs**

A formação de duas fases durante o processo de mistura de soluções aquosas de dois polímeros (ou de um polímero e de um sal) dependerá das interações intermoleculares - expressas em termos da energia livre - entre os constituintes

formadores do sistema. Serão também estas mesmas interações as responsáveis por todas as propriedades físico-químicas presentes nas duas fases, como por exemplo, a distribuição dos diferentes componentes no sistema, da relação de volumes entre as fases, da diferença de potencial elétrico e do excesso de energia livre associados à interface, do coeficiente de partição de um soluto específico, etc. Para cada sistema, teremos pares de componentes que possuirão interações termodinamicamente favoráveis e pares que gerarão interações que aumentarão a energia livre do sistema e, por isto, serão consideradas desfavoráveis. Naturalmente estas interações serão dependentes do estado termodinâmico do sistema, isto é, da composição, temperatura e pressão (DA SILVA e LOH, 2006).

### 1.5.2 Diagrama de equilíbrio de fases

Para a utilização de SAB é necessário o conhecimento do comportamento das fases nos sistemas. Os dados de equilíbrio podem ser representados em diagramas de equilíbrio, em uma temperatura e pressão fixa. Os diagramas de equilíbrio, ou diagramas de fase, representam graficamente a composição dos constituintes do sistema, presentes em certas concentrações, na qual ocorre a separação das fases (OLIVEIRA, 2006). Na Figura 6 está apresentado um exemplo de diagrama de fases, mostrando a composição das fases em equilíbrio, em coordenadas retangulares.



**Figura 6.** Diagrama de fase para sistemas aquosos bifásicos, expresso em coordenadas retangulares.

Convencionalmente, os componentes presentes em maior quantidade nas fases inferior e superior são representados no eixo das abscissas e das ordenadas, respectivamente. A quantidade de água é calculada por diferença. A curva que divide a região em duas fases é chamada de curva binodal ou curva de equilíbrio. A região acima da curva binodal é chamada de bifásica e a abaixo, monofásica (ALBERTSSON, 1986).

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

Ao se estudar a partição de um determinado material num dado sistema aquoso bifásico, em diferentes composições globais do sistema, faz-se uso de uma medida numérica de referência para a composição das fases. O comprimento da linha de amarração, usualmente referido como CLA, é um valor empírico adequado para a utilização como tal medida. O valor CLA pode ser calculado, a partir das concentrações dos componentes nas fases, pela Equação (4):

$$CLA = \sqrt{[\Delta PEG]^2 + [\Delta Sal]^2} \quad (4)$$

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

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

Dados de composições e propriedades dos sistemas aquosos bifásicos são necessários para o projeto de processos de extração e para o desenvolvimento de modelos termodinâmicos de transferência de massa e aplicáveis na extração líquido-líquido. Adicionalmente, dados de diagramas de fases são também necessários para viabilizar a predição da partição das moléculas entre as fases (CARVALHO, 2004).

### 1.5.3 Partição de proteínas em Sistemas Aquosos Bifásicos

Em geral, materiais biológicos adicionados em SAB distribuem-se entre as duas fases, sem perda da atividade biológica. Em geral, a distribuição de proteínas entre as duas fases aquosas dos SABs é caracterizada por um parâmetro denominado coeficiente de partição,  $K_p$ , que é definido pela relação entre as concentrações de certa biomolécula nas fases superior e inferior do SAB (ALBERTSSON, 1986):

$$K_p = \frac{W_{FS}}{W_{FI}} \quad (5)$$

onde  $W_{FS}$  e  $W_{FI}$  são as concentrações de equilíbrio da proteína particionada nas fases ricas em PEG-(superior) e salina-(inferior), respectivamente.

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

$$K_p = K_{amb} + K_{est} \quad (6)$$

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

$$\ln K_p = \ln K_{el.} + \ln K_{hidrof.} + \ln K_{hifil.} + \ln K_{conf.} + \ln K_{lig.} \quad (7)$$

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

Esta distribuição desigual da biopartícula entre as duas fases é resultante de um balanço de interações entre a proteína e as outras espécies (polímeros, água e/ou sais) presentes nas duas fases que coexistem em equilíbrio (FARRUGGIA et al., 2004).

Inúmeras propriedades físico-químicas do sistema e da proteína determinam o valor de  $K_p$ . Exemplos de fatores associados à proteína que influenciam sua distribuição entre as fases são: o tamanho, a conformação (estruturas secundária, terciária e quaternária) e a composição (estrutura primária), presença de carga elétrica e hidrofobicidade (DA SILVA e LOH, 2006). Existem ainda propriedades importantes das fases que contribuem nesta distribuição, como por exemplo, a natureza química dos componentes formadores dos SABs (DA SILVA e LOH, 2006), a massa molar e a concentração dos polímeros, a presença de ligantes ao longo da cadeia polimérica que possam interagir especificamente com sítios da proteína (BROOKS et.al., 1994), pH e temperatura (GAUTAM e SIMON, 2006).

#### **1.5.4 Variáveis que Influenciam o Sistema Aquoso Bifásico**

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

##### **1.5.4.1 Massa Molar e Concentração do Polímero**

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

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

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

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

#### **1.5.4.2 pH**

A redução do pH desloca a curva de equilíbrio para a direita. Assim, as concentrações necessárias à formação de duas fases líquidas, em um sistema polímero e sal, aumentam. Em relação à partição de proteínas, o pH altera as cargas da superfície das proteínas e, conseqüentemente, o seu coeficiente de partição (da SILVA, 2006). Um exemplo clássico é a desnaturação de proteínas devido à redução de pH. A distribuição de proteínas desnaturadas em soluções líquidas é diferente daquela obtida em seu estado natural, por apresentarem área superficial significativamente maior que na forma nativa. Contudo, a influência da carga da biomolécula depende muito do tipo de sal presente no sistema, uma vez que diferentes sais dão origem a diferentes potenciais elétricos entre as fases.

Mudanças no pH podem também induzir mudanças conformacionais na estrutura das proteínas, causando mudança em seus comportamentos de separação. Em condições extremas de pH é possível que ocorra a desnaturação das proteínas. Geralmente, a partição de proteínas desnaturadas é diferente da partição das mesmas proteínas na forma nativa, o que pode ser atribuído não só a maior área superficial da forma desnaturada, mas também ao fato da superfície exposta desta ser muito mais hidrofóbica. Como regra geral as proteínas carregadas mais negativamente (nos casos

em que o pH é superior ao pI) tem maior afinidade pela fase superior que é rica em PEG (ALBERTSSON, 1986, FORCINITI e HALL, 1991).

#### **1.5.4.3 Tipo e Concentração de Sal**

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

#### **1.5.4.4 Temperatura**

A influência da temperatura é complexa devido ao seu efeito na composição das fases em equilíbrio, assim como na alteração da estrutura da biomolécula e desnaturação (SARUBBO, 2000). Geralmente, para baixas temperaturas (menores que 20 °C) a curva binodal desloca-se em direção às baixas concentrações dos componentes que formam as fases, resultando no aumento do comprimento das linhas de amarração. Os sistemas de fases próximos do ponto crítico podem ser mais influenciados pela mudança de temperatura devido à sua instabilidade, quando a curva binodal é deslocada, podendo assim o sistema passar facilmente para a região monofásica (BAMBERGER et al., 1985).

O efeito da temperatura varia de acordo com o tipo de sistema, polímero e polímero ou polímero e sal. Para o sistema PEG e dextrana, foi constatada que com o aumento da temperatura era necessária uma concentração maior dos polímeros para a separação das fases. Neste caso, para que a separação das fases seja favorecida, deve-se trabalhar em temperaturas inferiores à ambiente. Já para PEG e sal, ocorre justamente o contrário, pois em temperaturas maiores ou próximas à ambiente a

separação das fases do sistema é facilitada. Foi observado também para o sistema PEG e sal, que o aumento da temperatura favorece o aumento da concentração de PEG na fase superior do sistema e conseqüentemente ocorre uma redução da concentração do polímero na fase inferior (FORCINITI e HALL, 1991; ZASLAVSKY, 1995). Alguns trabalhos relatam um aumento do coeficiente de partição com a temperatura (JOHANSSON et al., 1984); outros que não há relação entre o coeficiente de partição e a temperatura (TJERNELD et al., 1985), demonstrando a necessidade de estudos mais aprofundados para se esclarecer o efeito deste parâmetro sobre a partição.

### **1.5.5 Componentes do sistema**

#### **1.5.5.1 Polietilenoglicol (PEG)**

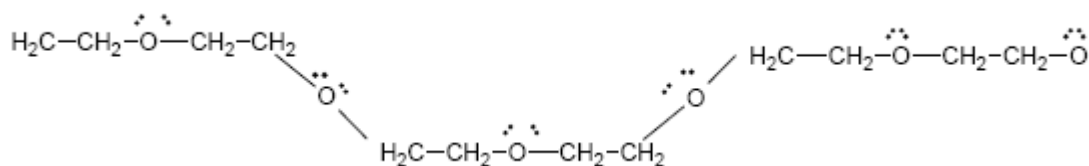
O polietilenoglicol,  $\text{HO}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{H}$ , é um polímero sintético, hidrofílico, não iônico, de cadeia linear ou ramificada, com massa molar variável e juntamente com outros polímeros sintéticos, constitui a base para as indústrias de plásticos, embalagens, fibras, adesivos, tintas e esmalte (OLIVEIRA, 2006). É solúvel em água e em vários solventes orgânicos. PEG's são higroscópicos e absorverão quantidades significativas de água se expostos a alta umidade. Antioxidantes são freqüentemente adicionados ao PEG para evitar decomposição oxidativa (ALVES, 2003).

A utilização do PEG é de grande interesse na biotecnologia principalmente por excluir, em ambiente aquoso, outros polímeros de sua vizinhança, não se solubilizando com eles. Por serem compostos biodegradáveis e atóxicos, a descarga de PEG não é problemática para o meio ambiente. Segundo COIMBRA (1997), o PEG foi aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration), sendo considerado não antigênico nem imunogênico. Estas características têm permitido a larga utilização de PEG e seus derivados em alimentos, cosméticos, sabões e medicamentos. Possivelmente, essa característica do PEG ser inerte está relacionada à manutenção da viabilidade das células sujeitas à partição em sistemas aquosos bifásicos.

O polietilenoglicol (Figura 7) é formado por unidades de óxido de etileno, em que cada unidade contém sítios ativos (oxigênios portadores de pares de elétrons



livres), onde são formadas as interações com as moléculas de água e os íons dissociados do sal (CARVALHO, 2004).



**Figura 7.** Representação planar parcial da molécula de PEG com os sítios disponíveis para as interações com os demais componentes do sistema.

### 1.5.5.2 Sais

O citrato de sódio, também chamado de citrato trissódico (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>), apresenta-se na forma de cristais brancos, inodoros e estáveis em ar. É normalmente comercializado na forma de citrato trissódico dihidratado, com massa molar de 294,10 g mol<sup>-1</sup>. Apresenta solubilidade de 42,5 g/100mL em água a 25 °C. Possui pH entre 7,5 e 9,5 a 20 °C quando em solução de 50 g L<sup>-1</sup> de citrato trissódico dihidratado em água. É usado em fotografia como agente seqüestrante para remover traços de metais, como anticoagulante e na indústria de alimentos como emulsificante, acidulante e seqüestrante (CARVALHO, 2004). Citrato de sódio é biodegradável, atóxico e pode ser descarregado em plantas de tratamento biológico de água residuária (ALVES, 2003).

O sulfato de lítio (Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) possui solubilidade de 35,64 g/100mL em água a 18°C. É um componente de interesse tecnológico com aplicações na detecção de radiação a laser, como um elemento ótico de transmissão de imagens, na fabricação de cristais de alta resistência na indústria farmacêutica. Este sal pode ser também utilizado na recuperação de soluções com a adição de agentes precipitantes, como anti-solventes, em função da sua solubilidade invertida e da pequena variação da solubilidade com a temperatura. Esta técnica é uma alternativa para a recuperação deste sal visando substituir a precipitação por congelamento e evaporação (TABOADA, 2002).

O sulfato de sódio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) é um sal branco, cristalino, com solubilidade em água de 16,86 g/100mL a 18 °C. Apresenta pH entre 5,2 e 9,2 a 20 °C quando em

solução de 50 g L<sup>-1</sup> de sulfato de sódio em água (CARVALHO, 2004). Possui larga aplicação industrial e em particular nas indústrias têxtil, de papel, detergente e vidro.

O Sulfato de Magnésio (MgSO<sub>4</sub>) é um sal branco, cristalino, que é normalmente comercializado na forma sulfato de magnésio heptahidratado, com massa molar de 246,48 g mol<sup>-1</sup>. Apresenta uma solubilidade em água de 71,0 g/100mL a 20°C e apresenta pH entre 5,0 e 8,0 a 25 °C em água (MERCK, 2008).

O carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) é um sal branco e translúcido, com massa molar de 105,99 g mol<sup>-1</sup>, apresenta solubilidade em água, de 220 g L<sup>-1</sup> à 20 °C (MERCK 2008). O carbonato de sódio pode ser utilizado, entre outras coisas, na fabricação de sabão, vidros e tintas.

## 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMSON, A. W. **Physical Chemistry of surfaces**. 5ª edition New York: John Wiley & Sons, 1990, 777 p.

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

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

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

ANSPACH, F. B.; JOHNSTON, A.; WIRTH, H. J.; UNGER, K. K.; HEARN, M. T. W. High-performance liquid chromatography of amino acids, peptides and proteins – XCVa Thermodynamic and kinetic investigations on rigid and soft affinity gels with varying particle and pore sizes: comparison of thermodynamic parameters and the adsorption behaviour of proteinsevaluated from bath and frontal analysis experiments. **Journal of Chromatography**, v. 499, p. 103-124, 1990.

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

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

BELLOT, J. C.; CONDORET, J. S. Theoretical study of the ion-exchange preparative chromatography of a two-protein mixture. **Journal of Chromatography**, v. 635, p. 1-17, 1993.

BERTECHINI, A. G. Mitos e Verdades Sobre o Ovo de Consumo. Disponível em: [www.avisite.com.br](http://www.avisite.com.br), Acessado em 08 fevereiro 2006.

BONOMO, R.C.; MINIM, L. A., COIMBRA, J. S. R.; FONTAN, R. C. I.; MENDES DA SILVA, L. H.; MINIM, V. P. R. Hydrophobic interaction adsorption of whey proteins: Effect of temperature and salt concentration and thermodynamic analysis. **Journal of Chromatography B**. V. 844, p 6-14, 2006.

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

CACACE, M. G., LANDAU, E. M., RAMSDEN, J. J. The Hofmeister series : salt and solvent effects on interfacial phenomena. **Quarterly Reviews of Biophysics**, v. 30 (3), p. 241-277, 1997.

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

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

CASTRO, B. D., AZNAR, M. Liquid–liquid equilibrium of water + PEG 8000 + magnesium sulphate or sodium sulphate aqueous two–phase systems at 35 °C: experimental determination and thermodynamic modelling. **Braz. J. Chem. Eng.** v. 22, p. 463–470, 2005.

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

CHARLEY, H. **Food Science**. 2 ed. New York: John Willey & Sons, 1982, 564p.

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

CHEN, W. D.; HUC, H.; WANG, Y. Analysis of steric mass-action model for protein adsorption equilibrium onto porous anion-exchange adsorbent. **Chemical Engineering Science**. V. 61; p. 7068 – 7076; 2006.

COIMBRA, J. S. R.; THOEMMES, J.; KULA, M. R.; SILVA, L. H. M.; MEIRELLES, A. J. A. Separation of  $\beta$ -lactoglobulin from cheese whey using an aqueous two-phase system. **Arq. Biol. Tecnol.** v. 40, p. 189–196, 1997.

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

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

CUSSLER, E. L. **Diffusion**. Cambridge University Press, 1995, 525 p.

Da SILVA, C. A. S. **Partição do glicomacropéptido usando sistemas aquosos bifásicos**. Viçosa, MG: UFV, 2006. 57f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

DA SILVA, L. H.M. e LOH, W. Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. **Química Nova**, v. 29, p.1345-1351, 2006.

DECHOW, F. J. Separation and Purification Techniques in Biotechnology. **Noyes Publications**, Cap. 2, 65-162, 1989.

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

FANG, F.; AGUILAR, M. I.; HEARN, M. T. W. Influence of temperature on the behaviour of proteins in cation-exchange chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 729, p. 49-66, 1996.

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

FENNEMA, O. R.. **Principles of Food Science: Food chemistry**. New York: Marcel Dekker, 1993, 1095 p.

FINETTE, G.; MAO, M-Q.; HEARN, M. Comparative studies on the isothermal characteristics of proteins adsorbed under batch equilibrium conditions to ion-exchange, immobilized metal ion affinity and dye affinity matrices with different ionic strength and temperature conditions. **Journal Chromatography A**, v. 763, p.71-90, 1997.

FONTAN, R. C. I. **Termodinâmica e modelagem da adsorção em sistemas mono e multicomponentes compostos por  $\alpha$  - lactoalbumina e  $\beta$  – lactoglobulina**. Viçosa, MG: UFV, 2005. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

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

FOUST, A. S., WENZEL L. A., CLUMP, C. W., MAUS, L e ANDERSEN, L. B. **Princípios das Operações Unitárias**. 2ª edição: Ed. Guanabara Dois, 1982.

GAO, D.; LIN, D. Q.; YAO , S. J. Mechanistic analysis on the effects of salt concentration and pH on protein adsorption onto a mixed-mode adsorbent with cation ligand. **Journal of Chromatography B**, v. 859; p.16–23; 2007.

GAUTAM, S.; SIMON, L. Partitioning of  $\beta$ -glucosidase from *Trichoderma reesei* in poly(ethylene glycol) and potassium phosphate aqueous two-phase systems: Influence of pH and temperature, **Biochemical Engineering Journal**, v. 30, p. 104 – 108, 2006.tjernel

GRANDISON, A. S. Ion-exchange and electro dialysis – chapter 6. In: GRANDISON, A. S.; LEWIS, M. J. (editors) **Separation process in the food and biotechnology industries**. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, p. 153-176, 1996.

GRITTI, F.; GUIOCHON, G. Effect of the mobile phase composition on the isotherm parameters and the high concentration band profiles in reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 995, p. 37-54, 2003.

GU, J., MATSUDA, T., NAKAMURA, R. Antigenicity of ovomucoid remaining in boiled shell eggs. **Journal of Food Science**, v. 51, p. 1448–1450, 1986.

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

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

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

HEARN, M. T. W.; HODDER, A. N.; FANG, F. W.; AGUILAR, M. I. High-performance liquid chromatography of amino acids, peptides and proteins – CX1a Retention behaviour of proteins with macroporous tentacle-type anion-exchangers. **Journal of Chromatography**, v. 548, p. 117-126, 1991.

HUANG, J.; SCHUDEL, J.; GUIOCHON, G. Adsorption behaviour of albumin and conalbumin on TSK-DEAE 5PW anion exchanger. **Journal of Chromatography**, v. 504, p. 335-349, 1990.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA.  
Disponível em: [www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br). Acesso em: 15/12/2008.

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

JULIÀ, S.; SÁNCHEZ, L.; Pérez, M. D.; LAVILHA M.; CONESA, C.; CALVO, M. Effect of treatment on hen's egg ovomucoid: An immunochemical and calorimetric study. **Food Reserch International**, v. 40, p. 603-612, 2007.

KOPACIEWICZ, W.; ROUNDS, M. A.; FAUSNAUGH, J.; REGNIER, F. E. Retention model for high-performance ion-exchange chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 266, p. 3-21, 1983.

KORHONEN, H.; PIHLANTE-LEPPALA, A.; PIRJO, R.; TUPASELA, T. Impact of processing on bioactive proteins and peptides. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, p. 307-319, 1998.

KUNIN, R. **Ion Exchange resins**. 2ª edition New York: John Wiley & Sons. 466 p., 1958.

LANGMUIR, I. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. **Journal of American Chemical Society**. V.30, p.2263-2295, 1916.

LEMON-MULÉR, H.; SAMPSON, H. A.; SICHERER, S. H. SHREFFLER, W. G. NOONE, S. Immunologic changes in children with egg allergy ingesting extensively heated egg. **J. Allergy Cun Immunol**, v. 122, p. 977 – 983e1, 2008.

LI, P.; XIU, G.; RODRIGUES, A. E. Modeling separation of proteins by iner core adsorbent in a batch adsorber. **Chemical Engineering Sci**. v.58, p. 3361-3371, 2003.

LIN, F. Y.; CHEN, C. S.; CHEN, W. Y.; YAMAMOTO, S. Microcalorimetric studies of interaction mechanisms between proteins and Q-Sepharose at pH near the isoelectric point (pI) – effects of NaCl concentration, pH value and temperature. **Journal of Chromatography A**, v. 912, p. 281-289, 2001.

LINDEN, G.; LORIENT, D. *Bioquímica agroindustrial.*, Zaragoza: Editorial Acribia, S.A. 1996.

MATSUDA, T., WATANABE, K., NAKAMURA, R. Immunochemical and physical properties of peptic-digested ovomucoid. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 31, p. 942–946, 1983.

MELANDER, W., CORRADINI, D., HORVA'TH, C. Salt mediated retention of proteins in hydrophobic interaction chromatography. Application of solvophobic theory. **Journal of Chromatography A**, v. 317, p. 67–85, 1984.

MERCK. Disponível em: < <http://www.merck-chemicals.com>>. Acesso em: 10/05/2008.

MIHELIČ, I.; PODGORNIK, A.; KOLOINI T. Temperature influence on the dynamic binding capacity of a monolithic ion-exchange column. **Journal of Chromatography A**, v. 987, p. 159-168, 2003.

MINE, Y., RUPA, P. Immunological and biochemical properties of egg allergens. **World's Poultry Science Journal**, v. 60, p. 321 - 330, 2004.

MINE, Y., SASAKI, E., ZHANG J.W., Reduction of antigenicity and allergenicity of genetically modified egg white allergen, ovomucoid third domain. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 302, p. 133-137, 2003.

MINE, Y., ZHANG J.W., Identification and fine mapping of IgG and IgE epitopes in ovomucoid. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 292, p. 1070–1074, 2002.

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

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

PERRY, R. H.; GREEN, D. W.; MALONEY, J. O. **Perry's chemical engineers' handbook**, 7th edition New York: McGraw-Hill, 1997.

PESSOA JR., A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de produtos biotecnológicos**. Ed. Manole – Barueri, SP. 2005.

PORTO, T. S.; CAVALCANTI, M. T. H.; LIMA FILHO, J. L.; BARROS NETO, B.; PORTO, A. L. F.; PESSOA JÚNIOR, A. Extraction of protease from *Clostridium perfringens* by aqueous two-phase systems using PEG/Citrate. **Rev. Br. Ciênc. Farm.** v. 40, p. 139–141, 2004.

QUEIROZ J.A., TOMAZ C.T., CABRAL J.M.S. Hydrophobic interaction chromatography of proteins. **Journal of Biotechnology**, v. 87, p.143-159, 2001.

RIPPEL, G.; SZEPESY, L. Hydrophobic interaction chromatography of proteins on an Alkyl-Superose column. **Journal of Chromatography A**, v. 664, p. 27–32, 1994.

ROJAS, E. E. G. **Técnicas de separação aplicadas ao processamento do ovo**. Dissertação de Mestrado, Departamento de Tecnologia de Alimentos, UFV, Viçosa, 2004.

RUPA P., MINE Y. Engineered recombinant ovomucoid third domain can modulate allergenic response in Balb/c mice model. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 342, p. 710–717, 2006.

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

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

SGARBIERI, V. **Proteínas em alimentos protéicos. Propriedades. Degradações. modificações.** São Paulo -SP: Ed Livraria Valeria. 1996.

SILVA, F. R. C. **Estudo da adsorção inulinases em colunas com resinas de troca iônica: parâmetros experimentais e modelagem.** Dissertação (Doutorado). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2000.

SILVA, L. H.; Meirelles, A. J. A. Bovine serum albumin,  $\alpha$ -lactoalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin partitioning in poly(ethylene glycol) + maltodextrin aqueous two-phase systems. **Carbohydr. Polym.**, v. 42, p. 279-277, 2000.

SIM, J. S. **Eggs Uses and Processing Technologies: New Developments.** University of British Columbia: Columbia, CA, 1994. Marcel Dekker, Inc.: New York, NY, 1995.

SKIDMORE, G. L.; CHASE, H. A. Two-component protein adsorption to the cation exchanger S Sepharose® FF. **Journal of Chromatography**, v. 505, p. 329-347, 1990.

SOUSA, R. C. S. **Separação da lisozima, conalbumina e ovalbumina presentes na clara de ovo: Aspectos tecnológicos e termodinâmicos.** Dissertação de Mestrado, Departamento de Tecnologia de Alimentos, UFV, Viçosa, 2008.

SUZUKI, M. **Adsorption Engineering.** 1 ed., Amsterdam, 1990, 295 p.

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

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

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

URISU A., ANDO H., MORITA Y., WADA E., YASAKI T., YAMADA K., KOMADA K., TORII S., GOTO M., Wakamatsu T. Allergenic activity of heated



and ovomucoid-depleted egg white. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v 100 (2) p. 171-176, 1997.

YOSHIDA, H.; KATAOKA, T., Surface diffusion of direct dyes in porous cellulose membranes **Chemistry Engineering Journal**. p. 11-15, 1989

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

ZHANG, S.P.; SUN, Y. Ionic strength dependence of protein adsorption to dye-ligand adsorbents. **AIChE Journal**, v. 48, p. 178-186, 2002.

## **CAPÍTULO 2. PARTIÇÃO DA OVOMUCOIDE EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS**

### **RESUMO**

Neste trabalho foi aplicado a técnica de extração líquido-líquido, utilizando sistemas aquosos bifásicos (SABs), para a partição da ovomucoide. Esta técnica pode ser usada para purificação de biomoléculas em larga escala pela possibilidade de partição seletiva com altos rendimentos. Os sistemas são formados pela adição, à água, de dois polímeros ou de um polímero e um sal em concentrações determinadas. Os SABs avaliados foram compostos por PEG 1500 e sais inorgânicos (sulfato de lítio, sulfato de sódio, sulfato de magnésio, carbonato de sódio e citrato de sódio), a temperatura de 25 °C. O comportamento de partição da proteína nesses sistemas foi quantificado por meio do coeficiente de partição, em função do tipo de sal e concentração das fases, a fim de se obter o melhor sistema para a separação da biomolécula. A quantificação da proteína em cada fase foi feita por espectrofotometria por meio da leitura da absorbância a 280 nm. Os resultados mostraram que o coeficiente de partição variou de 0,02 a 6,0, indicando que, dependendo do sistema, a proteína se concentra ou na fase inferior (rica em sal) ou na fase superior (rica em PEG). Os maiores valores do coeficiente de partição foram obtidos em sistemas compostos por carbonato de sódio e os menores em sistemas compostos por sulfato de magnésio, sendo que neste último obteve-se uma porcentagem de recuperação superior a 90 %. As diferentes tendências apresentadas pelo coeficiente de partição em função das propriedades dos sistemas mostra que é possível separar adequadamente a proteína da mistura, o que estabelece esse sistema como uma alternativa a ser considerada no planejamento de processos de recuperação e purificação de biomoléculas.

### **1. INTRODUÇÃO**

A clara do ovo é uma fonte natural de proteínas de reconhecido potencial nutricional e biológico e de interesse tecnológico (AWADE et al. 1994). Devido às suas propriedades funcionais (gelatinização, coagulação, geleificação e formação de espuma), e ação antimicrobiana, as proteínas da clara do ovo de galinha têm sido

extensivamente usadas como ingredientes em alimentos processados (MINE e BERGOUGNOUX, 1998; WONG et al. 1996). A ovalbumina, a conalbumina ou ovotransferrina, a ovomucoide e a lisozima são quatro proteínas que representam mais de 80% da proteína total (LINDEN e LORIENT, 1996). Apesar da importância nutricional e tecnológica destas proteínas, elas são identificadas como as principais proteínas alergênicas da clara (MINE e ZHANG, 2002).

A ovomucoide, que constitui 11 % do total de proteínas da clara, é uma proteína altamente glicosilada contendo (20 a 25) % de carboidratos. Apresenta uma massa molar de 28 kDa, um ponto isoelétrico de 4,1 e atividade de inibição da tripsina (MINE e RUPA, 2004). A molécula é composta de 186 aminoácidos que são arranjados em três domínios, sendo cada domínio ligado por pontes de dissulfeto. Esta característica estrutural pode ser a causa da alta resistência ao calor e a digestão proteolítica, assim como sua capacidade alergênica (RUPA e MINE, 2006; MINE et al., 2003; URISU et al., 1997).

Um dos processos utilizados para obtenção de ovomucoide é a precipitação, seguida por técnicas cromatográficas (JULIÀ et al. 2007). Entretanto durante a precipitação a proteína pode desnaturar. Desta maneira torna-se necessário o desenvolvimento de novas técnicas de separação, como a extração líquido-líquido utilizando sistemas aquosos bifásicos, que possibilitem a separação e purificação da ovomucoide mantendo a sua estrutura nativa.

A partição de componentes biológicos em sistemas aquosos bifásicos (SAB) é uma técnica de separação simples e altamente eficiente, que vem sendo usada no isolamento de proteínas nos últimos 30 anos com potencial de aplicação à separação das proteínas da clara (ALBERTSSON, 1986; SOUSA, 2008).

Os SABs são formados por espécies químicas que, quando misturadas em determinadas faixas de composição e temperatura dividem-se em duas fases com composições diferentes, sendo a água o componente majoritário destes sistemas (ZASLAVSKY, 1995; ASENJO 1990). Estes sistemas possuem baixas viscosidade e tensão superficial e densidade próxima a da água, mostrando-se então, como ambientes mais suaves para biocompostos (como proteínas, enzimas e células), quando comparados aos sistemas tradicionais de extração, que são baseados em solventes orgânicos. Outras vantagens destes sistemas são o curto tempo de processamento e o fácil aumento de escala (COIMBRA, 1997; Da SILVA, 2007).

Estudos mostram que a distribuição das proteínas é função de diversos fatores como: massa molar do polímero, concentração dos polímeros, potencial hidrogeniônico (pH), espécies iônicas, grupos hidrofóbicos e temperatura (ALVES et al. 2000, Da SILVA et al. 2007, FARAVASH et al. 2007, GAUTAM e SIMON 2006, MADEIRA et al. 2005, SILVA e MEIRELLES 2001, ROSA et al. 2007). O estudo de tais variáveis operacionais é necessário no projeto e aumento de escala do processo de separação.

Neste trabalho foi estudado a partição da ovomucoide utilizando sistemas aquosos bifásicos compostos por polietilenoglicol  $1500 \text{ g mol}^{-1}$  e os sais sulfato de sódio, sulfato de lítio, sulfato de magnésio, citrato de sódio e carbonato de sódio à temperatura de  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , a fim de se encontrar as melhores condições de separação e purificação desta proteína.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Materiais**

A ovomucoide foi adquirida da Sigma Aldrich (USA). Os SABs foram preparados usando citrato de sódio, carbonato de sódio, sulfato de lítio, sulfato de sódio e sulfato de magnésio (Vetec, Brasil) e polietilenoglicol de massa molar  $1500 \text{ g mol}^{-1}$  (Isofar, Brasil).

### **2.2 Determinação dos dados de equilíbrio para o sistema $\text{Na}_2\text{CO}_3$ e PEG 1500 a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$**

Os SABs foram formados pela mistura de quantidades adequadas de solução estoque de PEG  $1500 \text{ g mol}^{-1}$  (50% em massa) e  $\text{Na}_2\text{CO}_4$  (25% em massa) e água em tubos de centrífuga graduados, para uma massa total do sistema de 40 g. Foram preparados quatro pontos globais baseados nos dados obtidos por VOROS et al. (1993), que determinou os dados de equilíbrio para sistemas compostos por PEG (1000 e 2000)  $\text{g mol}^{-1}$  e carbonato de sódio. A mistura foi agitada manualmente e então centrifugada (Eppendorf Mod. 5804, Alemanha) a  $1800 \text{ g}$  por 20 minutos, a  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , para acelerar a formação das duas fases. A mistura foi mantida em repouso

durante 24 horas em banho termostático (Tecnal TE-184, Brasil) na temperatura de  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Todas as soluções e diluições foram preparadas cuidadosamente e usando uma balança analítica (Denver M-310 Analytical Balance, USA) na pesagem dos reagentes para que o balanço de massa fosse feito corretamente.

### **2.2.1 Coleta das fases**

Após ser atingido o equilíbrio, e as duas fases límpidas serem observadas, a fase superior foi coletada com o auxílio de uma pipeta de Pasteur até que restasse uma camada desta fase de aproximadamente 5 milímetros acima da interface. Este procedimento visou garantir que a interface não fosse perturbada.

Depois da coleta da fase superior, foi inserida, cuidadosamente, uma seringa (com agulha longa) na célula de equilíbrio, perturbando a interface o mínimo possível. Após o equilíbrio ser restabelecido, o êmbolo da seringa foi puxado vagarosamente até que permanecesse na célula uma camada de 5 a 10 milímetros de fase inferior. As fases foram coletadas em recipientes com tampa e armazenadas sob refrigeração até que todas as análises fossem realizadas. Os componentes do sistema foram quantificados em cada fase e o diagrama de equilíbrio foi construído.

### **2.2.2 Medida da densidade**

A densidade foi determinada por meio do método do picnômetro, utilizando um picnômetro de 10 mL. A temperatura ambiente foi anotada para que a densidade da água, naquela temperatura, pudesse ser conhecida. Este dado foi usado para a calibração do volume do picnômetro, que foi inicialmente pesado vazio e seco, e depois com água deionizada. A Equação 1 foi então empregada para calcular o volume do picnômetro (V). Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, amostras de cada fase foram transferidas do banho termostático (na temperatura de equilíbrio em que foi construído o sistema aquoso bifásico) para o picnômetro, fazendo o ambiente e pesando o picnômetro com a amostra da fase. A Equação 2 foi usada para o cálculo da densidade ( $\rho_{\text{FASE}}$ ) de cada fase dos sistemas estudados.

$$V = \frac{m_{\text{PIC.}+\text{H}_2\text{O}} - m_{\text{PIC.}}}{\rho_{\text{H}_2\text{O}}} \quad (1)$$

$$\rho_{\text{FASE}} = \frac{m_{\text{PIC.}+\text{AM.}} - m_{\text{PIC.}}}{V} \quad (2)$$

sendo  $m$  a massa, o subscrito PIC. relativo ao picnômetro vazio, PIC.+H<sub>2</sub>O ao picnômetro com água e PIC.+AM. relativo ao picnômetro com a amostra da fase.

### 2.2.3 Medida do volume das fases

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

### 2.2.4 Quantificação do teor de água

A determinação do teor de água foi feita por meio da liofilização. Este método consiste basicamente na pesagem da amostra antes e após a secagem, em condições controladas e padronizadas, e parte da premissa de que toda perda de água é devido à umidade.

Foram utilizados tubos de vidro de 3 cm de diâmetro e 4 cm de altura previamente pesados sem tampa. Aproximadamente um grama de cada fase foi pesado anotando-se a massa obtida. Os tubos foram mantidos no congelador, a -12 °C, durante 24 horas e levados ao liofilizador (Edwards do Brasil, Brasil), à temperatura de -52 °C e à pressão de 12 N m<sup>-2</sup>, para a secagem das amostras, por 24 horas. Os tubos foram novamente pesados para o cálculo da diferença da massa correspondente à água evaporada. Esta análise foi feita em duplicata.

### **2.2.5 Quantificação do teor de sal**

A concentração de sal em cada fase constituinte dos SABs foi determinada usando medidas de condutividade. Foi utilizado um condutivímetro (Schott CG853, Alemanha), conectado a um banho termostático com temperatura controlada a  $30 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1,0 \text{ }^\circ\text{C}$ . Inicialmente foi feita uma curva analítica, em que a concentração do eletrólito variou entre ( $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ ) mol L<sup>-1</sup>. Para fazer a leitura das fases, estas foram diluídas de modo que a concentração do eletrólito em solução estivesse dentro da faixa de concentração da curva analítica.

### **2.2.6 Quantificação do teor de polietilenoglicol**

A quantificação do teor de PEG presente em cada fase foi feita por balanço de massa, subtraindo a quantidade total dos componentes adicionada pela quantidade de água e de sal presente no sistema.

## **2.3 Experimentos com Sistemas Aquosos Bifásicos**

### **2.3.1 Escolha dos Sistemas de Trabalho**

Os dados de equilíbrio para os sistemas aquosos bifásicos utilizados neste trabalho se basearam nos diagramas de fases de sistemas compostos por polietilenoglicol, sal e água obtidos por CARVALHO (2004) para os sistemas compostos por citrato de sódio, MARTINS et al. (2008) para os sistemas compostos por sulfato de lítio, sulfato de magnésio, sulfato de sódio e os obtidos no item anterior, para o sistema composto por carbonato de sódio. A partir dos sistemas bifásicos contendo PEG de massa molar  $1500 \text{ g mol}^{-1}$  e do sal formador da fase (citrato de sódio, sulfato de lítio, sulfato de magnésio, sulfato de sódio e carbonato de sódio), foram obtidos os coeficientes de partição da ovomucoide na temperatura de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  em função da concentração e do tipo de sal. As análises foram conduzidas em duplicata.

### 2.3.2 Preparo dos Sistemas Aquosos Bifásicos

Sistemas aquosos bifásicos foram obtidos pela mistura de solução estoque de PEG 1500 g mol<sup>-1</sup> (50 % em massa) e de um sal (citrato de sódio, carbonato de sódio, sulfato de lítio, sulfato de sódio e sulfato de magnésio), solução estoque de 25 % em massa.

Os sistemas foram preparados adicionando, em tubos de centrifuga graduados, quantidade adequada das soluções estoques de PEG e sal de forma a se obter uma massa total 12 g. A quantidade de ovomucoide (Sigma, USA) adicionada a cada sistema foi 3 mg, sendo esta a última a ser acrescentada. A mistura resultante foi agitada, manualmente, por aproximadamente 2 min, e logo após centrifugada a 1800 g por 10 min, a 25 °C (Eppendorf Mod. 5804, Alemanha), para acelerar o processo. Na seqüência, os tubos foram mantidos em repouso por 20 h em um banho termostático (Tecnal TE-184, Brasil), a 25 °C ± 0,1 °C.

Uma vez atingido o equilíbrio, para determinar a concentração da proteína em cada uma das fases, amostras de ambas as fases foram coletadas usando uma pipeta Pasteur para a fase superior e uma seringa com uma agulha longa e fina para a fase inferior.

A medida do volume das fases foi feita seguindo o procedimento descrito no item 2.2.3.

### 2.3.3 Cálculo do coeficiente de partição

O conteúdo protéico de cada fase foi quantificado pelo método espectrofotométrico de leitura direta a 280 nm (Spectrophotometer Care 50 Probe, Varian, USA). A curva analítica foi construída a partir de solução de ovomucoide pura em diferentes concentrações (0,01 a 0,1) mg mL<sup>-1</sup>.

A distribuição da ovomucoide nas fases do sistema foi determinada a partir do coeficiente de partição, expresso como:

$$K_p = \frac{W_{FS}}{W_{FI}} \quad (3)$$

em que  $K_p$  é o coeficiente de partição,  $W_{FS}$  é o teor do biocomponente na fase superior, rica em PEG e  $W_{FI}$  é o teor do biocomponente na fase inferior, rica em sal.



Este coeficiente é usado para quantificar o grau de separação alcançado em um processo de extração. Os experimentos foram feitos em duplicata e a média dos resultados foram os valores empregados neste trabalho. Para selecionar os SAB com a melhor capacidade de purificação da ovomucoide, foi calculada uma recuperação teórica ( $y$ , %) nas fases superior e inferior, respectivamente, por meio da seguinte Equação (PICÓ, 2006):

$$y(\%) = \frac{100}{1 + (1/RK_p)} \quad (4)$$

em que  $R$  corresponde a razão entre os volumes da fase superior e inferior.

### 2.3.4 Cálculo do comprimento da linha de amarração (CLA)

Para estudar a separação das fases em SAB, foi feito o uso de uma medida numérica de referência para a composição das fases. O tamanho ou comprimento da linha de amarração (CLA) é um parâmetro termodinâmico importante, ele representa o quão distintas são as propriedades termodinâmicas intensivas das fases do sistema. Desta forma, o valor do CLA pode ser calculado, a partir das concentrações dos componentes nas fases (MARTINS, 2007; CARVALHO, 2004), pela Equação:

$$CLA = \sqrt{[\Delta PEG]^2 + [\Delta Sal]^2} \quad (5)$$

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

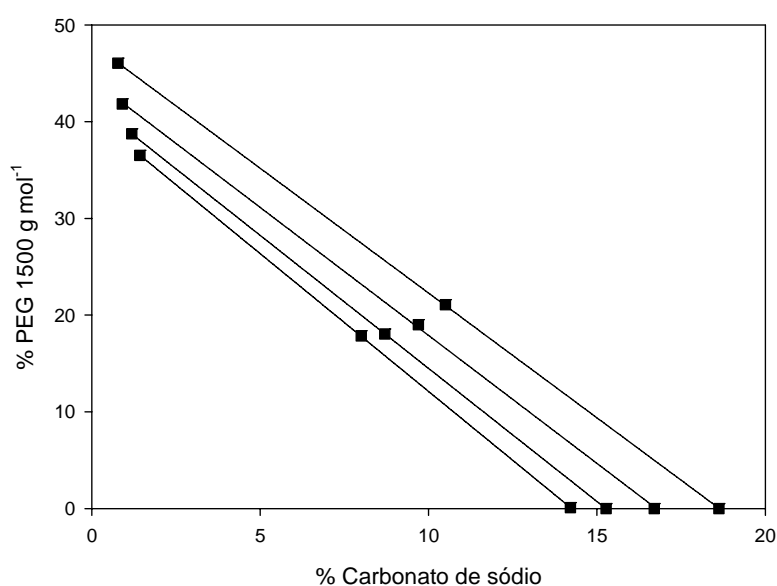
## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Dados de equilíbrio para o sistema $\text{Na}_2\text{CO}_3$ e PEG 1500 a 25 °C

As composições de equilíbrio para os sistemas estudados contendo PEG 1500 e  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 25 °C, assim como a densidade das fases estão apresentados na Tabela 1, em que os dados referentes aos componentes das fases estão expressos em termos de % em massa e os dados de densidade em  $\text{kg m}^{-3}$ . Os dados de equilíbrio de composição de fase estão representados no diagrama de fase da Figura 1.

**Tabela 1.** Dados de equilíbrio para os sistemas formados por PEG 1500 + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + água a 25 °C.

Ponto Global			Fase Superior				Fase Inferior			
Sal	PEG	Água	Sal	PEG	Água	$\rho$	Sal	PEG	Água	$\rho$
8,00	17,86	74,14	1,43	36,51	62,06	1077,28	14,21	0,09	85,70	1143,60
8,70	18,05	73,25	1,19	38,74	60,07	1079,70	15,27	0,00	84,73	1155,42
9,70	19,00	71,30	0,91	41,83	57,26	1083,17	16,70	0,00	83,30	1170,53
10,50	21,07	68,43	0,78	46,04	53,18	1087,43	18,62	0,00	81,38	1193,52



**Figura 1.** Diagrama de equilíbrio de fase para o sistema contendo PEG 1500 + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + água a 25 °C.

Como pode ser visto nos resultados apresentados, a formação destes sistemas aquosos bifásicos indica claramente a mútua exclusão do sal e do polímero e a elevada afinidade pela água em ambas as fases. Resultado semelhante foi encontrado por VOROS et al. (1993), ao determinar os dados de equilíbrio para sistemas compostos por PEG (1000 e 2000) g mol<sup>-1</sup> e carbonato de sódio.

O conhecimento dos dados de equilíbrio e propriedades dos sistemas aquosos bifásicos é necessário para o projeto de processos de extração e para o desenvolvimento de modelos termodinâmicos de transferência de massa e aplicáveis na extração líquido-líquido (CARVALHO, 2004). No estudo da partição a força motriz que rege a transferência está de alguma forma associada à diferença de

concentração entre ambas as fases (DALLORA et al., 2007). Desta forma dados de diagramas de fases são também necessários para viabilizar a predição da partição das moléculas entre as fases.

A partição de proteínas entre duas fases aquosas e a distribuição de equilíbrio dos componentes dos sistemas aquosos bifásicos pode ser entendida em termos de interações moleculares na mistura. A pressão e temperatura constantes, estes diferentes tipos de interação são funções da concentração do polímero, da água e do sal nos sistemas aquosos bifásicos, geralmente expressa em diagramas de fase (Da SILVA e LOH, 2006).

### **3.2 Coeficiente de partição da ovomucoide**

Na Tabela 2, estão apresentados os valores dos coeficientes de partição, as composições iniciais de PEG e sal utilizadas na elaboração dos sistemas, o valor do comprimento da linha de amarração, assim como a porcentagem teórica (%) de recuperação da proteína em cada fase. Como pode ser visto, quando se utilizou o sulfato de magnésio, a proteína se concentrou na fase inferior apresentado uma porcentagem de recuperação acima de 89 % para todas as concentrações estudadas. Quanto aos demais sistemas, a porcentagem de recuperação de proteína foi muito menor quando comparado ao formado por sulfato de magnésio, obtendo um maior valor no sistema contendo carbonato de sódio, em que a porcentagem de recuperação atingiu um valor próxima a 73 %, porém na fase superior.

**Tabela 2.** Dados dos SABs formados por PEG 1500 e os diferentes sais utilizados.

sal/% (m/m)	PEG/% (m/m)	vol. FS/(mL)	vol. FI/(mL)	CLA /% (m/m)	$K_p$	% $y_{(FS)}$	% $y_{(FI)}$
sulfato de sódio							
10,00	15,49	4,86	5,95	32,51	$0,5746 \pm 0,0257$	$31,94 \pm 0,97$	$68,06 \pm 0,97$
11,00	16,11	4,81	5,91	35,69	$0,7535 \pm 0,0498$	$37,99 \pm 1,56$	$62,01 \pm 1,56$
12,00	17,14	4,71	5,89	40,10	$1,1510 \pm 0,0482$	$47,92 \pm 1,05$	$52,08 \pm 1,05$
13,00	19,23	4,75	5,73	50,89	$1,9529 \pm 0,3004$	$61,64 \pm 3,65$	$38,36 \pm 3,65$
sulfato de lítio							
10,00	21,62	5,84	4,87	29,43	$0,7270 \pm 0,0567$	$46,54 \pm 1,94$	$53,46 \pm 1,94$
11,00	21,71	5,05	5,62	34,97	$0,7535 \pm 0,0052$	$42,64 \pm 0,15$	$57,36 \pm 0,15$
12,00	23,38	4,94	5,62	41,71	$1,0200 \pm 0,0936$	$47,23 \pm 2,29$	$52,77 \pm 2,29$
13,00	23,75	4,59	6,33	46,36	$1,0501 \pm 0,0959$	$43,18 \pm 2,24$	$56,82 \pm 2,24$
sulfato de magnésio							
10,00	19,35	4,62	6,03	33,81	$0,0226 \pm 0,0054$	$1,70 \pm 0,40$	$98,30 \pm 0,40$
11,00	20,58	4,38	6,12	40,12	$0,0298 \pm 0,0009$	$2,08 \pm 0,06$	$97,92 \pm 0,06$
12,00	20,69	4,15	6,20	43,76	$0,0359 \pm 0,0049$	$2,34 \pm 0,31$	$97,66 \pm 0,31$
13,00	22,02	4,34	5,96	52,40	$0,1663 \pm 0,0003$	$10,80 \pm 0,02$	$89,20 \pm 0,02$
citrato de sódio 25 °C							
11,00	20,38	7,12	3,83	28,91	$0,3201 \pm 0,0081$	$37,30 \pm 0,59$	$62,70 \pm 0,59$
12,00	22,34	6,76	4,12	39,22	$0,4851 \pm 0,0556$	$44,25 \pm 2,83$	$55,75 \pm 2,83$
13,00	24,53	6,37	4,36	42,15	$0,5675 \pm 0,0629$	$45,26 \pm 2,75$	$54,74 \pm 2,75$
14,00	26,44	5,98	4,63	45,96	$0,8489 \pm 0,0599$	$52,27 \pm 1,76$	$47,73 \pm 1,76$
carbonato de sódio							
10,00	12,11	3,96	8,07	38,60	$2,1599 \pm 0,0005$	$51,45 \pm 0,01$	$48,55 \pm 0,01$
11,00	11,74	3,64	8,40	41,22	$3,2404 \pm 0,3477$	$58,32 \pm 2,61$	$41,68 \pm 2,61$
12,00	12,61	3,76	8,50	44,71	$4,8831 \pm 0,0953$	$68,35 \pm 0,42$	$31,65 \pm 0,42$
13,00	14,54	3,94	8,36	49,38	$5,8782 \pm 0,6718$	$73,38 \pm 2,24$	$26,62 \pm 2,24$

O comportamento de partição dos solutos nos SABs deve ser compreendido em termos das interações intermoleculares que ocorrem no processo de transferência entre as fases. As interações polímero-polímero, polímero-solvente, polímero-íon e íon-íon são dependentes da estrutura polimérica, das concentrações de sal e do polímero, da hidratação das cadeias poliméricas e dos íons. Além disso, as interações de todos os componentes dos SABs com o soluto que particiona também determinam o comportamento de transferência. Essas interações são expressas no parâmetro termodinâmico denominado energia livre de Gibbs ( $\Delta G^\circ$ ). A avaliação de  $\Delta G^\circ$  em termos de processos moleculares é uma tarefa bastante complexa, pois envolve parâmetros de interações intermoleculares,  $\Delta H^\circ$ , e variáveis configuracionais,  $\Delta S^\circ$ , ambos relacionados à  $\Delta G^\circ$  pela relação de Gibbs-Helmholtz,  $\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$  (DA SILVA e LOH, 2006). Portanto, a avaliação do efeito isolado de cada parâmetro

precisa ser feita com cuidado, posto que sempre existe uma interdependência entre eles.

Objetivando o entendimento do comportamento de partição da ovomucoide nos SABs foi utilizado o modelo de JOHANSSON et al.(1998), que se baseia na teoria de Flory-Huggins. Este modelo fornece um conjunto simples de equações analíticas que possibilita a identificação da força motriz responsável pela partição de solutos em SABs.

Estes pesquisadores demonstraram que a partição da proteína em sistemas aquosos bifásicos pode ser decomposta em uma força motriz de natureza entrópica e outra de natureza entálpica. Nesta abordagem, a variação da entropia associada ao processo de transferência da ovomucoide é dada pela Equação:

$$\ln K_p = \frac{MM_s}{\rho} \left( \frac{n^s}{V^s} - \frac{n^i}{V^i} \right) \quad (6)$$

onde  $K_p$  representa o coeficiente de partição da ovomucoide,  $MM_s$  a massa molar da proteína,  $\rho$  é densidade numérica molecular global do sistema bifásico,  $n^s$  é o número total de moléculas na fase superior, enquanto que  $n^i$  é o número total de moléculas presentes na fase inferior e  $V^s$  e  $V^i$ , os volumes das fases superior e inferior, respectivamente.

Considerando ausentes as contribuições de natureza entálpica para a partição do soluto, a interpretação física da equação indica que, a respeito da contribuição entrópica para a transferência da ovomucoide entre as fases, os valores de  $K_p$  diferentes de 1(um) ocorrerão apenas se o número de moléculas por unidade de volume, nas duas fases, for diferente. Além disso, a referida equação mostra que o soluto particionará para a fase cuja densidade numérica de moléculas for maior. Assim, como força motriz, a entropia levará a proteína a particionar para a fase com maior número de moléculas por unidade de volume, pois nesta fase haverá um maior número de formas de distribuir as moléculas espacialmente, aumentando assim a contribuição da entropia configuracional para a minimização do parâmetro termodinâmico  $\Delta_{\text{mix}}G$ . Na maioria dos SABs atualmente conhecidos, são as moléculas de água que estão presentes em maioria numérica, em ambas as fases e, por isto, é este o componente determinante para a densidade numérica das diferentes fases. Assim, em linhas gerais, a contribuição entrópica fará a proteína tender a particionar para a fase com maior conteúdo de moléculas de água por unidade de

volume. Durante a partição de proteínas em sistemas aquosos bifásicos formados pela mistura de eletrólito/polímero, forças motrizes de natureza entrópica atuarão no processo forçando o biopolímero a se concentrar na fase rica em sal, visto ser esta a que contém maior densidade numérica (da SILVA e LOH, 2006). A concentração de proteínas na fase rica em polímero só ocorrerá nestes SABs (sal/polímero) caso existam interações entálpicas contribuindo para este comportamento de partição como, por ex., quando há interações específicas entre proteína e polímero.

A contribuição da entalpia para a partição da ovomucoide, segundo o modelo proposto por JOHANSSON et al., 1998 é dada pela Equação:

$$\ln K_p = -\frac{MMs}{RT} \left[ \sum_{i=1(i \neq p)}^3 (\phi_i^S - \phi_i^L) \varepsilon_{ip} - \sum_{i=1(i \neq p)}^2 \sum_{j=i+1(j \neq p)}^3 (\phi_i^S \phi_j^S - \phi_i^L \phi_j^L) \varepsilon_{ij} \right] \quad (7)$$

A Equação (7) expressa todas as interações entálpicas que ocorrem dentro do sistema. Pode-se separar a contribuição entálpica para a partição da proteína em dois termos. O primeiro termo refere-se à variação da energia entálpica do sistema devido à interação da ovomucoide com todos os componentes presentes nas duas fases dos sistemas, em que  $\varepsilon_{ip}$  representa a energia resultante da formação de um par entre proteína e o componente  $i$ . Assim, este termo expressa uma tendência que o soluto possui em se transferir para a fase onde existe a presença majoritária do componente com o qual a ovomucoide interaja mais entalpicamente, isto é, tenha o valor de  $\varepsilon_{ip}$  mais negativo (ou menos positivo). O segundo termo na Equação (7) representa diferença de conteúdo entálpico de cada fase resultante das interações entre todos os diferentes componentes que formam cada uma das distintas regiões dos SABs, ou seja, a variação da energia associada à transferência da proteína da fase inferior para a superior. Este termo energético só depende da interação que ocorre entre os componentes formadores das fases, não se leva em consideração a interação devida à proteína (da SILVA e LOH, 2006).

A dependência que  $K_p$  possui em relação à diferença entre a energia total das fases superior e inferior surge porque a transferência da ovomucoide entre essas fases implica necessariamente na quebra e formação de novas interações. Assim a inserção da ovomucoide na fase superior implica no rompimento de interações entre PEG e água para que ocorra a formação de uma cavidade na qual a proteína particionada

possa se alojar. Em adição, a saída da proteína da fase inferior possibilitará a formação de novas interações entre os componentes, sal e água, que se concentram na fase inferior (da SILVA e LOH, 2000).

A análise do segundo termo da equação prevê que a ovomucoide particionará para a fase que se encontra num estado termodinâmico de maior energia, isto é, para a fase que gastará menos energia para a formação da cavidade. Nos SABs estudados neste trabalho, a fase rica em PEG é a que possui maior conteúdo energético, visto que na fase inferior, rica em sal, as interações do tipo íon-dipolo tornam significativamente menor sua energia. Tem-se, contudo, que a partição de biossolutos é governada pela soma das contribuições de natureza entrópica e entálpica. Quando uma dessas contribuições, entrópica ou entálpica, sobrepõe a outra, esta é quem governa o mecanismo de partição.

Os resultados apresentados na Tabela 2 mostram que a transferência da ovomucoide para uma das fases depende do tipo de sistema utilizado. Ao utilizar o sistema composto por carbonato de sódio a ovomucoide apresentou uma tendência em se transferir para a fase rica em polímero, todos os valores de  $K_p$  foram maiores que 1 (um). Naturalmente, esse fluxo de moléculas de ovomucoide para a fase superior é governado por aspectos de natureza entálpica, sejam eles devido a uma interação direta entre a proteína e os componentes formadores da fase, ou a auto-energia de cada fase. Uma das possíveis contribuições entálpicas para a transferência é a existência de uma interação específica entre a proteína e o PEG, ou seja, a proteína se concentra, preferencialmente, na fase enriquecida com o componente “i” com o qual interage mais fortemente. Nesse caso, pode ser proposto que a causa da concentração da ovomucoide na fase superior é uma interação entálpica específica PEG-Ovomucoide.

Já nos sistemas formados por sulfato de magnésio a ovomucoide apresentou forte tendência em se transferir para a fase inferior, com valores de  $K_p$  menores que 1 (um). A fase inferior é rica em sal e possui maior densidade numérica, assim, provavelmente nestes sistemas a força motriz que governou o processo de transferência da ovomucoide foi a entropia. Nos demais sistemas a proteína se distribuiu, quase que igualmente em ambas as fases, apresentando valores de  $K_p$  próximos a 1 (um).

Em relação à influência da composição das fases, expresso pelo comprimento da linha de amarração, em todos os sistemas estudados, o aumento do CLA levou a

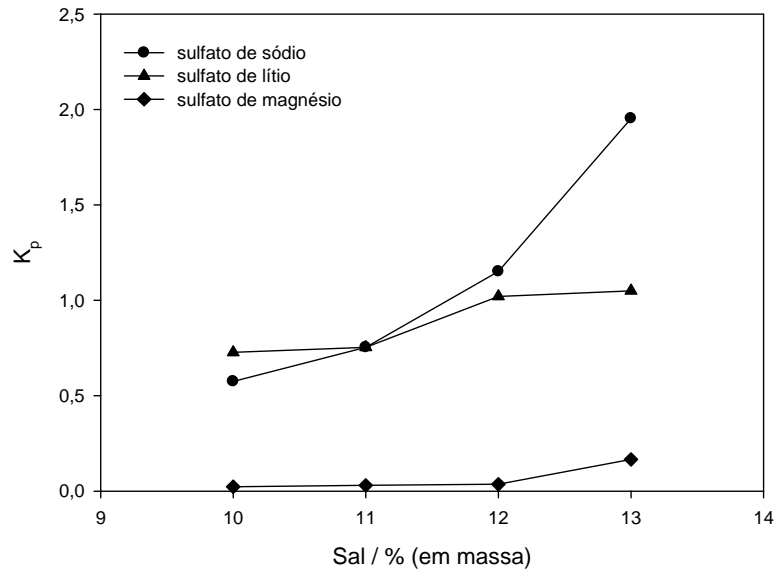
um aumento do coeficiente de partição da ovomucoide, sendo possivelmente resultado de um incremento das contribuições entálpicas na transferência da ovomucoide para a fase superior. Em relação a esta influência de CLA, BLÁSQUEZ et al. (1998) encontraram o mesmo comportamento estudando a partição de  $\alpha$ -amilase em sistemas PEG-sulfato de magnésio. RODRIGUES (2001) também verificou que a  $\beta$ -lactoglobulina dirigiu-se mais para a fase superior com o aumento na concentração de PEG em sistemas PEG-sulfato de amônio. BABU et al. (2008) verificaram que um aumento na concentração de fosfato de potássio de 14 % a 20 % (em massa) resultou em um aumento nos coeficientes de partição de PPO e bromelina.

### **3.3 Influência do tipo de sal sobre o coeficiente de partição da ovomucoide**

A partir dos resultados apresentados na Tabela 2 pode-se observar a influência exercida pelo eletrólito formador do SAB no processo de partição da ovomucoide. É observado um efeito significativo do tipo de sal formador do SAB sobre o valor do  $K_p$  da proteína.

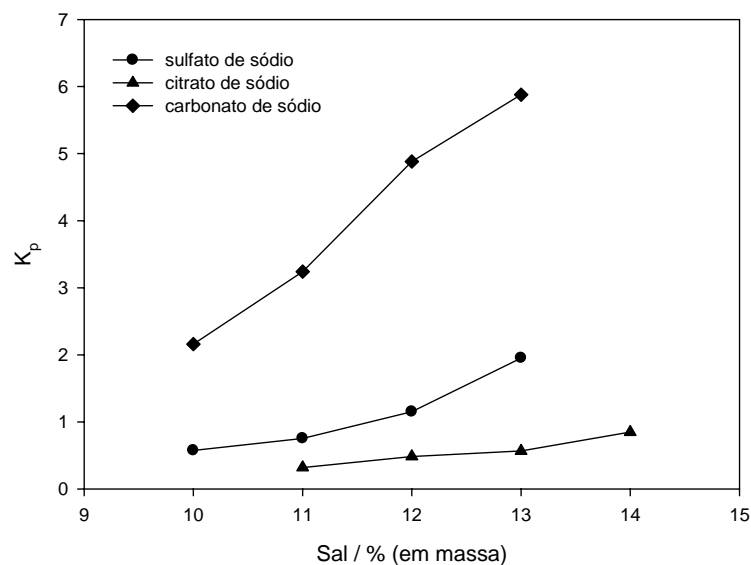
Os poucos estudos existentes na literatura sobre sistemas formados por sais de sulfato, relatam que, por esses sais possuírem o mesmo ânion,  $\text{SO}_4^{2-}$ , pode-se inferir que as diferenças no comportamento de partição de biossolutos nesses sistemas se devem aos diferentes cátions presentes nas suas estruturas. Os resultados sugerem que a mudança do cátion do eletrólito formador do SAB altera a magnitude das interações intermoleculares, e como conseqüência, os valores do coeficiente de partição. Para os sistemas estudados, os valores do coeficiente de partição variaram para os ânions de sulfato na seguinte ordem  $\text{Na}^+ > \text{Li}^+ > \text{Mg}^{2+}$ , conforme mostrado na Tabela 2 e na Figura 2. O mesmo resultado foi encontrado por BORA et al. (2005), ao estudar a partição de antibióticos.





**Figura 2.** Influência do tipo de cátion formador do sistema aquoso bifásico sobre o coeficiente de partição da ovomucoide.

Para os sais contendo o cátion  $\text{Na}^+$ , pôde-se perceber que existe diferença no comportamento da partição da proteína devido aos diferentes ânions presentes, conforme apresentado na Tabela 2 e Figura 3. Da mesma forma como ocorre com a mudança do cátion formador do sistema aquoso bifásico, o tipo de ânion utilizado também altera a magnitude das interações intermoleculares, interferindo assim, no valor do coeficiente de partição da ovomucoide. Para os ânions estudados o coeficiente de partição variou na seguinte ordem  $\text{CO}_4^{2-} > \text{SO}_4^{2-} > \text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$ .



**Figura 3.** Influência do tipo de ânion formador do sistema aquoso bifásico sobre o coeficiente de partição da ovomucoide.

Quando a proteína é particionada em sistemas contendo PEG e sal, o tipo e a concentração de sal têm efeito sobre as interações hidrofóbicas entre as proteínas e o meio; os íons de sal interagem com a superfície carregada da proteína para formar a dupla camada elétrica. Assim a proteína é desidratada devido ao efeito de hidratação das moléculas de sal circundando a proteína e as zonas hidrofóbicas da proteína são gradualmente expostas, aumentando com o incremento da concentração de sal (da SILVA, 2007). A influência dos íons de sal sobre o comportamento da proteína é usualmente descrito pela posição de cada íon na série de Hofmeister. O efeito dos íons da série para ânions segue a seguinte ordem  $\text{SO}_4^{2-} > \text{HPO}_4^{2-} > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^- > \text{SCN}^-$ , e para cátions  $\text{NH}_4^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+ > \text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+}$  (CACACE, 1997). Em altas concentrações, os íons à esquerda da série diminuem a solubilidade da proteína, aumentam a interação hidrofóbica e o efeito de hidratação das moléculas de sal circundando a proteína causando, assim, maior desidratação da mesma. Desta maneira tem-se um aumento na interação proteína-PEG, aumentando a extração para a fase rica em PEG (da SILVA, 2007).

#### 4. CONCLUSÃO

Sistema aquoso bifásico é uma técnica apropriada para a separação da ovomucoide da clara de ovo. A partição da proteína em sistemas aquosos pode ser influenciada por vários fatores. Neste trabalho o efeito da concentração de PEG e sal, assim como do tipo de sal sobre o coeficiente de partição da ovomucoide foram estudados objetivando melhorar a seletividade dos SABs e determinar as melhores condições de separação. Os valores de  $K_p$  aumentaram com o aumento de CLA. O tipo de sal também influenciou no valor de  $K_p$ . Nos sistemas, como os formados por carbonato de sódio, a proteína teve uma maior afinidade pela fase polimérica. A força motriz dessa transferência é provavelmente de natureza entálpica, sendo atribuída a uma interação específica entre o polímero e a ovomucoide (PEG-OVO), via pares de elétrons livres dos átomos de oxigênio da cadeia polimérica. Já para o sistema formado pelo sulfato de magnésio a proteína se concentrou na fase salina, sendo possivelmente, neste caso a força motriz dessa transferência de natureza entrópica.

Baseado nesta conclusão fica evidente a necessidade de estudos posteriores, teóricos e experimentais, que elucidem em maiores detalhes, os mecanismos responsáveis pela partição da ovomucoide em sistemas aquosos bifásicos.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALVES, J. G. L. F.; CHUMPITAZ, L. D. A.; SILVA, L. H. M.; FRANCO, T. T.; MEIRELLES, A. J. A. Partitioning of whey proteins, bovine serum albumin and porcine insulin in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**. v. 743, p. 235–239, 2000.

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

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

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

BLÁZQUEZ, G.; CAMACHO, F.; GONZÁLEZ-TELLO, P and ALARCÓN, F. J. Partition coefficients of  $\alpha$ -amylase in aqueous two-phase systems PEG+MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O+H<sub>2</sub>O at 298K. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1379, p. 191–197, 1998.

BORA, M. M., BORTAKUR, S., RAO, P. C., DUTTA, N. N. Aqueous two-phase partitioning of cephalosporin antibiotics: effect of solute chemical nature. **Separation and Purification Technology**, v. 45, p. 153-156, 2005.

CACACE, M. G., LANDAU, E. M., RAMSDEN, J. J. The Hofmeister series : salt and solvent effects on interfacial phenomena. **Quarterly Reviews of Biophysics**, v. 30 (3), p. 241-277, 1997.

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

COIMBRA, J. S. R.; THOEMMES, J.; KULA, M. R.; SILVA, L. H. M.; MEIRELLES, A. J. A. Separation of  $\beta$ -lactoglobulin from cheese whey using an aqueous two-phase system. **Arq. Biol. Tecnol.** v. 40, p. 189–196, 1997.

Da SILVA, C. A. S.; COIMBRA J. S.R.; ROJAS E. E. G.; MINIM, L. A.; Da SILVA, L. H. M. Partitioning of caseinomacropetide in aqueous two-phase systems, **Journal of Chromatography B**, v. 858, p. 205–210, 2007.

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

DA SILVA, L. H.M. e LOH, W. Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. **Química Nova**, v. 29, p.1345-1351, 2006.

DALLORA, N. L. P.; KLEMZ, J. G. D.; FILHO, P. A. P. Partitioning of model proteins in aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol and ammonium carbamate. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, p. 92-97, 2007.

FARAVASH, R. S., MODARRES, H.; NASERNEJAD, B. Structural and Partitioning studies of Bovine Serum Albumin in mixture of (poly(ethylene glycol) + K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + H<sub>2</sub>O), **J. Chem. Eng. Data**, v. 52 (1), p. 71 – 76, 2007.

GAUTAM, S.; SIMON, L. Partitioning of  $\beta$ -glucosidase from *Trichoderma reesei* in poly(ethylene glycol) and potassium phosphate aqueous two-phase systems: Influence of pH and temperature, **Biochemical Engineering Journal**, v. 30, p. 104 – 108, 2006.

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

JULIÀ, S.; SÁNCHEZ, L.; Pérz, M. D.; LAVILHA M.; CONESA, C.; CALVO, M. Effect of treatment on hen's egg ovomucoid: An immunochemical and calorimetric study. **Food Reserch International**, v. 40, p. 603-612, 2007.

LINDEN, G.; LORIENT, D. **Bioquímica agroindustrial.**, Zaragoza: Editorial Acribia, S.A. 1996.

MADEIRA, P. P., XU XIN, TEIXEIRA, J. A.; MACEDO, E. A. Prediction of protein partition in polymer + salt aqueous two-phase systems using the modified Wilson model, **Biochemical Engineering Journal**, v. 24, p. 147–155, 2005.

MARTINS, J. P.; CARVALHO, C. P.; SILVA, L. H. M. d.; COIMBRA, J. S. d. R.; SILVA, M. d. C. H. d.; RODRIGUES, G. D.; MINIM, L. A. Liquid–Liquid Equilibria of an Aqueous Two-Phase System Containing Poly(ethylene) Glycol 1500 and Sulfate Salts at Different Temperatures. **J. Chem. Eng. Data**, v. 53, 238-241 2008.

MINE, Y., BERGOUGNOUX Adsorption properties of cholesterol reduced egg yolk low-density liprotein at oil-in- water interfaces. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 2152-2158, 1998.

MINE, Y., RUPA, P. Immunological and biochemical properties of egg allergens. **World's Poultry Science Journal**, v. 60, p. 321 - 330, 2004.

MINE, Y., SASAKI, E., ZHANG J.W., Reduction of antigenicity and allergenicity of genetically modified egg white allergen, ovomucoid third domain. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 302, p. 133-137, 2003.

MINE, Y., ZHANG J.W., Identification and fine mapping of IgG and IgE epitopes in ovomucoid. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 292, p. 1070–1074, 2002.

PICÓ, G., ROMANINI, D., NERLI, B.; FARRUGGIA, B. Poly (ethylene glycol) molar mass and polydispersivity effect on protein partitioning in aqueous two-phase systems, **Journal of Chromatography B**, v. 830, p. 286–292, 2006.

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

ROSA, P. A. J., AZEVEDO, A. M.; AIRES-BARROS, M. R. Application of central composite design to the optimisation of aqueous two-phase extraction of human antibodies, **Journal of Chromatography A**, v. 1141, p. 50 – 60, 2007.

RUPA P., MINE Y. Engineered recombinant ovomucoid third domain can modulate allergenic response in Balb/c mice model. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 342, p. 710–717, 2006.

SILVA, L. H.; MEIRELLES, A. J. A. Bovine serum albumin,  $\alpha$ -lactoalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin partitioning in poly(ethylene glycol) + maltodextrin aqueous two-phase systems, **Carbohydr. Polym.**, v. 42, p. 279-282, 2000.

SOUSA, R. C. S. **Separação da lisozima, conalbumina e ovalbumina presentes na clara de ovo: Aspectos tecnológicos e termodinâmicos**. Dissertação de Mestrado, Departamento de Tecnologia de Alimentos, UFV, Viçosa, 2008.

URISU A., ANDO H., MORITA Y., WADA E., YASAKI T., YAMADA K., KOMADA K., TORII S., GOTO M., Wakamatsu T. Allergenic activity of heated and ovomucoid-depleted egg white. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v 100 (2) p. 171-176, 1997.

VOROS, N.; PROUST, P.; FREDENSLUND, A. Liquid-liquid phase equilibria of aqueous two phase systems containing salts and polyethylene glycol. **Fluid Phase Equilibria**, v. 90, p. 333 – 353, 1993.

WONG, Y. C.; HERALD, T. J.; HACHMEISTER, K. A. Comparison between irradiated and thermally pasteurised liquid egg white on functional, physical and microbiological properties. **Poultry science**, v. 75(6), p. 803-808, 1996.

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

### **CAPÍTULO 3. ADSORÇÃO DA OVOMUCOIDE EM TANQUES AGITADOS UTILIZANDO RESINA DE TROCA ANIÔNICA**

#### **RESUMO**

O comportamento adsorptivo da ovomucoide em resina de troca aniônica (Streamline Q XL) foi obtido em tanques agitados a temperatura de 25 °C. Foram avaliadas diferentes concentrações de NaCl (0; 0,03; 0,07 e 0,10) mol L<sup>-1</sup> e três valores de pH (6,2; 7,0 e 8,0). O modelo de Langmuir foi ajustado aos dados experimentais, observando-se que com o aumento da concentração de sal e do pH houve diminuição na capacidade de adsorção da resina.

#### **1. INTRODUÇÃO**

A clara do ovo é uma fonte natural de proteínas de reconhecido potencial nutricional biológico e de interesse tecnológico (AWADE et al., 1994). As proteínas da clara do ovo de galinha tem sido extensivamente usadas como ingredientes na tecnologia de alimentos (MINE e BERGOUGNOUX, 1998; WONG et al., 1996). A ovalbumina, a conalbumina ou ovotransferrina, a ovomucoide e a lisozima são quatro proteínas que representam mais de 80% da proteína total (LINDEN e LORIENT, 1996). Apesar da importância nutricional e tecnológica destas proteínas, elas são identificadas como as principais proteínas alergênicas da clara, porém estudos mostram que a ovomucoide é o componente que causa o maior número de reações alérgicas (JULIÀ et al., 2007; MINE e ZHANG, 2002).

A ovomucoide, que constitui 11 % do total de proteínas da clara, é uma proteína composta de 186 aminoácidos, altamente glicosilada contendo (20 a 25) % de carboidratos. Apresenta uma massa molar de 28 kDa, um ponto isoelétrico de 4,1 e atividade de inibição da tripsina (MINE e RUPA, 2004). Apresenta alta resistência ao calor e a digestão proteolítica, sendo também uma proteína alergênica (RUPA e MINE, 2006; MINE et al., 2003; URISU et al., 1997).

Diante das dificuldades encontradas com os processos existentes, como precipitação com sais, que apresentam desvantagens associadas a desnaturação e baixa pureza, torna-se necessário o desenvolvimento de novas técnicas como a

adsorção, que possibilitem a separação e purificação da proteína mantendo sua estrutura nativa.

A cromatografia de adsorção em tanques agitados, ou batelada, é um processo simples, usado na avaliação do equilíbrio de adsorção e dessorção, na cinética de adsorção das proteínas (CHANG e CHASE, 1996; ZHANG e SUN, 2002; TONG et al., 2003, CHEN et al., 2003), na determinação de parâmetros de modelos (como parâmetros de equilíbrio de adsorção e difusividade intrapartícula), empregados na simulação de processos cromatográficos em grande escala, como de leito expandido e leito móvel simulado (LI et al, 2003). Usualmente, o equilíbrio é apresentado na forma de isotermas de adsorção que relacionam a concentração de um composto, em solução e na superfície de um sólido adsorvente, ao longo de uma faixa de concentrações de interesse (JACOBSON et al., 1987). A isoterma é uma relação termodinâmica fundamental que permite a predição precisa dos perfis de bandas individuais (GUIOCHON et al., 1994).

A escolha da técnica cromatográfica para efetuar dada separação dependerá de certas propriedades biológicas e físico-químicas dos compostos de interesse, como carga líquida, características bioespecíficas e hidrofóbicas, entre outras.

A cromatografia de troca iônica (CTI) é um dos métodos mais comuns utilizados na separação e purificação de biomoléculas (CHEN et al., 2006). Esta técnica baseia-se em interações eletrostáticas entre aminoácidos carregados na superfície das proteínas e resinas eletricamente carregadas, embora outras interações não específicas tais como forças hidrofóbicas podem estar envolvidas (LIN et al., 2001).

A adsorção de proteínas é influenciada por vários fatores tais como força iônica, pH, temperatura, massa molar e carga superficial, e estes efeitos tem sido amplamente estudados (LIN et al., 2001; FINETTE et al., 1997). Neste trabalho foi avaliada a adsorção em tanques agitados da proteína da clara, ovomucoide, empregando uma resina de troca aniônica, em diferentes concentrações de NaCl (0,00; 0,03; 0,07 e 0,10) mol L<sup>-1</sup>, e pH (6,2; 7,0 e 8,0), à temperatura de 25°C.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Materiais**

A ovomucoide foi adquirida da Sigma Aldrich (USA). A resina empregada nos experimentos de adsorção foi a Streamline Q® XL (Amershan Pharmacia Biotech, Suécia) que é uma resina de troca aniônica, com densidade e tamanho de partícula de  $1,2 \text{ g mL}^{-1}$  e (100 a 300)  $\mu\text{m}$  (PHARMACIA, 2008). Nos experimentos foram utilizados água ultrapura (sistema Milli-Q, Millipore Inc., USA) e reagentes químicos de grau analítico e cromatográfico.

### **2.2 Experimentos de adsorção da ovomucoide em tanque agitado**

Neste trabalho foi avaliado o processo adsortivo da proteína ovomucoide, empregando a resina de troca aniônica Streamline Q XL (Amershan Pharmacia Biotech, Suécia), em valores de pH de 6,2; 7,0 e 8,0 e força iônica de (0; 0,03, 0,07 e 0,10)  $\text{mol L}^{-1}$  de NaCl, a temperatura de 25 °C.

#### **2.2.1 Dados de equilíbrio**

Os dados de equilíbrio para obtenção das isotermas de adsorção da proteína ovomucoide foram obtidos por meio de ensaios em batelada, variando o valor do pH e a concentração de NaCl.

Antes da realização dos experimentos, fez-se necessário um pré-condicionamento da resina, que se encontrava em solução aquosa de 20% etanol. Para isso, foi transferido cerca de 20 mL do adsorvente para um tubo centrífugo de 50 mL, acrescentando a mesma quantidade de água ultra pura (Milli-q, Millipore Inc., USA). Os tubos foram agitados por 5 minutos e posteriormente centrifugados (Eppendorf Mod. 5804, Alemanha), sendo então o sobrenadante descartado. O mesmo procedimento foi repetido 3 vezes e, em seguida, mais 2 vezes utilizando, no entanto, um tampão fosfato  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ , em valores de pH pré-definidos (6,2; 7,0 e 8,0). Foi obtida uma pasta de resina pré-condicionada, que permaneceu em estufa por cerca de 10 horas para secagem.



Posteriormente à secagem, foi pesado  $30 \text{ mg} \pm 5 \text{ mg}$  da resina, com auxílio de uma balança analítica (Denver M-310 Analytical Balance, USA), diretamente em tubos eppendorf de 2,0 mL, sendo posteriormente acrescentado 1 mL do tampão fosfato  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ , pH (6,2; 7,0 e 8,0) e concentração de sal 0; 0,03, 0,07 e 0,10)  $\text{mol L}^{-1}$  pré-definidos. Os tubos foram deixados sob leve agitação, em um sistema simulando um tanque agitado, como proposto por FERREIRA (2001) por um período de 16 horas para condicionamento da resina. Após este período, aos vários tubos contendo a resina pré-condicionada, foi adicionado diferentes volumes (0 a 1000)  $\mu\text{L}$  de solução de ovomucoide, de forma a obter-se variadas concentrações de proteína nos tubos. A faixa de concentração de proteína variou de (0 a 22)  $\text{mg mL}^{-1}$ . Em seguida, foi incorporado o tampão fosfato para completar o volume de solução para 2 mL. Os tubos foram agitados por 20 horas, sob temperatura controlada (DBO Mod. 101M/3 Eletrolab®, Brasil) de forma a se estabelecer o equilíbrio. No final do período de agitação, os tubos foram centrifugados (microcentrífuga Labnet Force 7, Denver Instrument Company, USA) a  $7500 \text{ g}$  por 15 minutos.

Os experimentos foram realizados em diferentes valores de pH (6,2; 7,0 e 8,0) e concentrações de NaCl (0,000; 0,030; 0,070 e 0,100)  $\text{mol L}^{-1}$ , na temperatura de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### 2.2.2 Análises de proteína

A concentração de proteína, presente na solução, foi determinada pelo método espectrofotométrico (Spectrophotometer Care 50 Probe, Varian, USA) de leitura direta a 280 nm, considerando o branco do ensaio como absorvância zero. As curvas analíticas foram obtidas utilizando soluções de ovomucoide com concentrações conhecidas (0,04 a 2,0)  $\text{mg mL}^{-1}$ . A concentração de proteína adsorvida na resina aniônica ( $q$ ) tem relação direta com a concentração do soluto na fase líquida, observada por meio das curvas analíticas e determinada por um balanço de massa no sistema, do qual resulta:

$$q = \frac{V}{m} (C_0 - C_b) \quad (1)$$

em que  $V$  (mL) é o volume total do sistema,  $m$  (g) é a massa do adsorvente que é colocado em contato com um volume de solução protéica de concentração  $C_0$  (mg/mL) e  $C_b$  (mg/mL) é a concentração de proteína em solução no final do experimento de adsorção.

### 2.2.3 Modelagem dos dados de equilíbrio

Muitos modelos de isotermas diferentes, tais como, a isoterma Linear, a de Langmuir, a bi-Langmuir, a de Freundlich e a de Langmuir- Freundlich, têm sido propostas para estudar a adsorção de solutos em solução sobre uma superfície sólida. Entre estes modelos o de Langmuir é o mais utilizado devido a sua simplicidade e por ajustar-se bem aos dados experimentais (LAN et al., 2001). O modelo da isoterma de Langmuir (LANGMUIR, 1916), com base em conceitos do equilíbrio termodinâmico, foi empregado para ajustar e descrever os dados de equilíbrio, utilizando a Equação:

$$q = \frac{q_m C}{K_d + C} \quad (2)$$

onde  $q$ , é a quantidade de proteína adsorvida por unidade de massa de adsorvente ( $\text{mg g}^{-1}$ );  $C$ , a concentração de proteína na fase líquida, no equilíbrio ( $\text{mg mL}^{-1}$ );  $q_m$ , a quantidade máxima de soluto adsorvida ( $\text{mg g}^{-1}$  resina); e  $K_d$ , a constante de dissociação ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) do complexo soluto-adsorvente, representa a afinidade entre o soluto e o adsorvente.

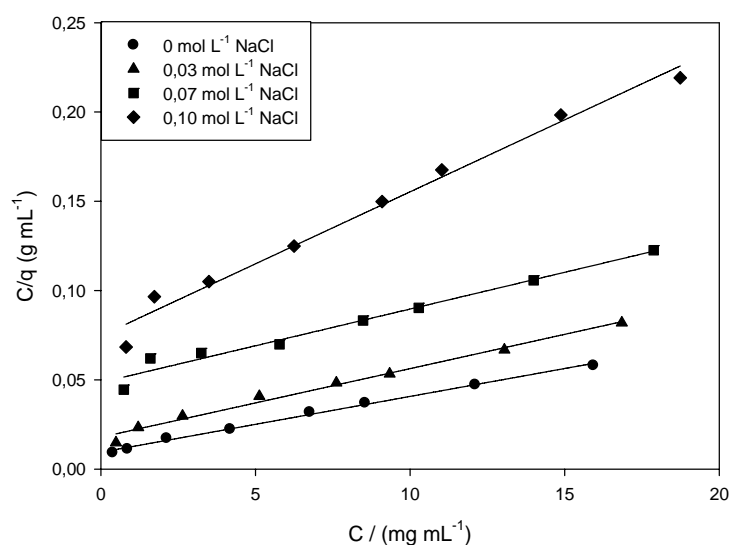
O modelo da isoterma de Langmuir foi ajustado aos dados experimentais utilizando SigmaPlot 10 SystatSoftware Inc.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

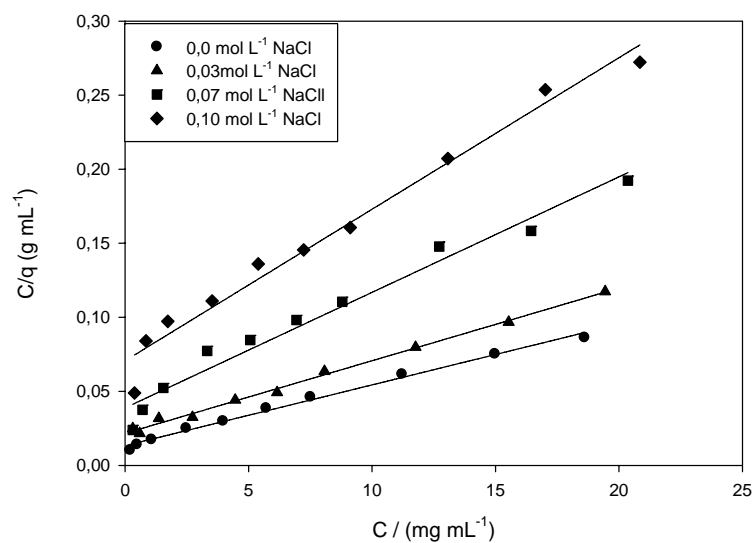
### 3.1 Equilíbrio de adsorção de ovomucoide na resina aniônica Streamline Q XL em sistema do tipo tanque agitado

No presente trabalho, todos os dados experimentais foram ajustados segundo o modelo de Langmuir, e os resultados obtidos demonstraram um ajuste satisfatório do modelo aos dados experimentais.

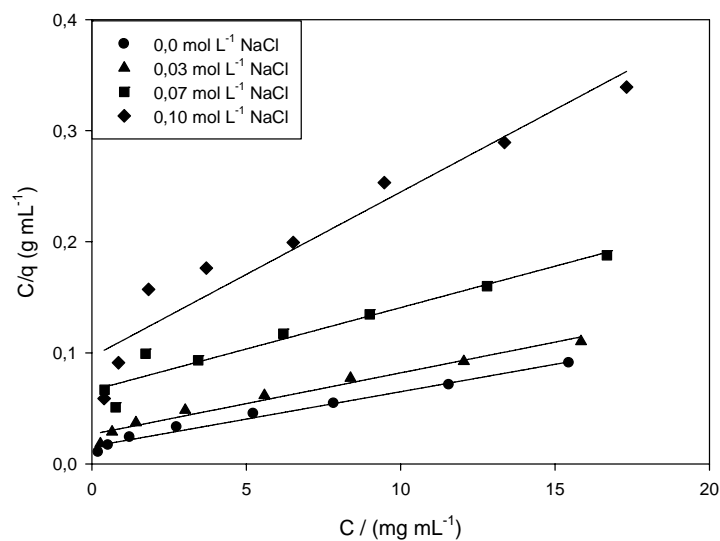
Para certificação do ajuste do modelo de Langmuir a todos os dados experimentais, fez-se o uso de gráficos semi-recíprocos ( $C/q$  versus  $C$ ). Segundo WIRTH et al. (1993), os valores dos dados de adsorção em maiores concentrações de proteína possuem maior validade quando apresentados em um gráfico numa regressão semi-recíproca. A linearidade dos gráficos representa o ajuste do modelo aos dados experimentais (FINETTE et al., 1997). A linearidade observada na construção dos gráficos da relação  $C/q$  versus  $C$ , mostrados na Figura 1, indica que o comportamento da adsorção da ovomucoide na resina aniônica Streamline Q XL pode ser representado pelo modelo da isoterma de Langmuir.



(a)



(b)



(c)

**Figura 1.** Gráfico semi-recíproco da adsorção de ovomucoide na resina aniônica Streamline Q XL. (a) pH 6,2; (b) pH 7,0 e (c) pH 8,0.

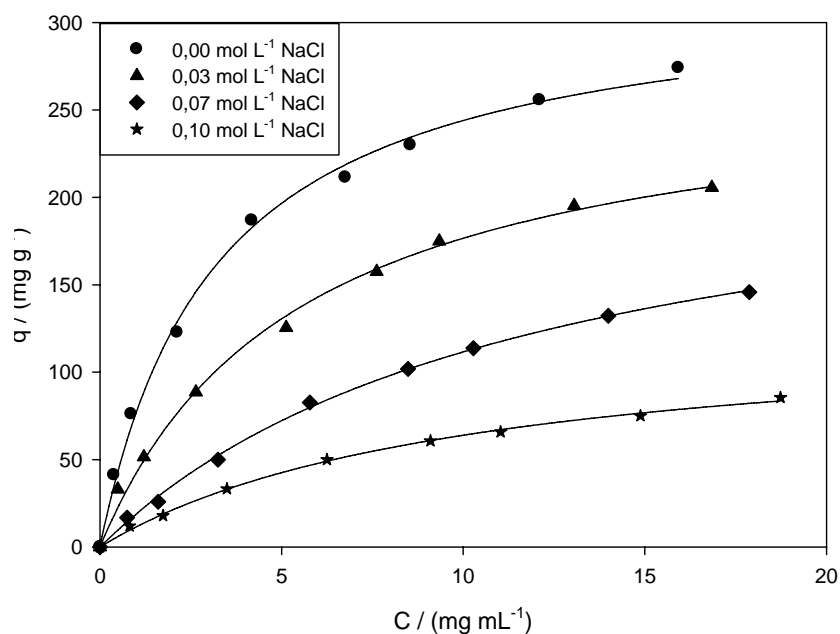
A Tabela 1 apresenta os valores  $q_m$  e  $K_d$  do ajuste do modelo de Langmuir aos dados experimentais da adsorção da ovomucoide na resina aniônica Streamline Q XL em função da concentração de NaCl e do valor de pH.

**Tabela 1.** Dados de equilíbrio para a adsorção da ovomucoide em resina de troca aniônica (Streamline Q XL) em tanques agitados.

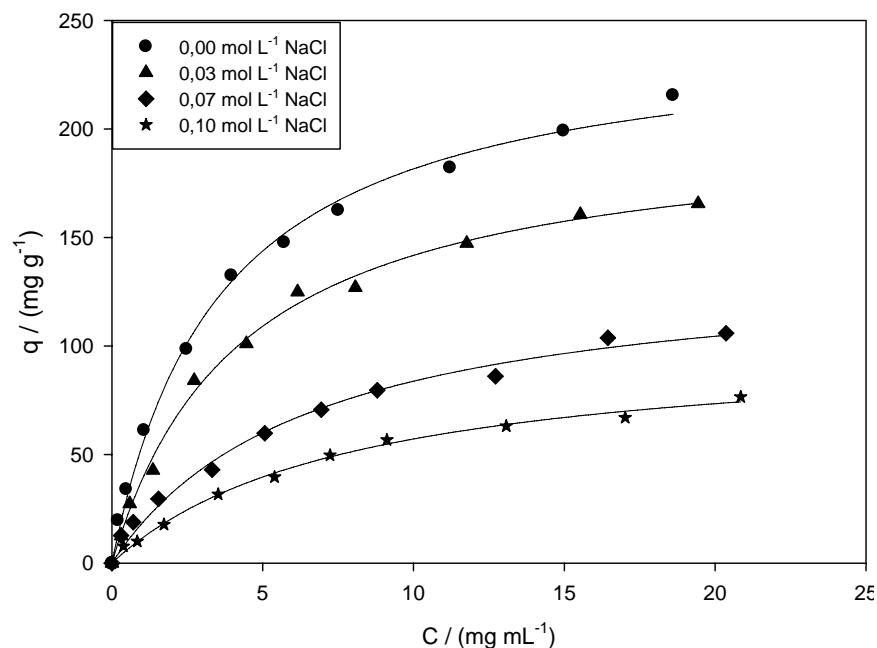
pH	NaCl / mol L <sup>-1</sup>	$q_m$ / (mg g <sup>-1</sup> )	$K_d$ / (mg mL <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
6,2	0,00	321,39	3,17	0,997
6,2	0,03	273,02	5,46	0,996
6,2	0,07	244,69	11,92	0,999
6,2	0,10	128,78	10,13	0,998
7,0	0,00	246,45	3,57	0,996
7,0	0,03	202,27	4,26	0,996
7,0	0,07	138,77	6,56	0,989
7,0	0,10	102,62	7,94	0,996
8,0	0,00	215,51	4,07	0,994
8,0	0,03	198,26	6,40	0,996
8,0	0,07	143,88	10,35	0,995
8,0	0,10	77,77	9,36	0,990

### 3.2 Efeito da concentração de sal sobre a adsorção da ovomucoide

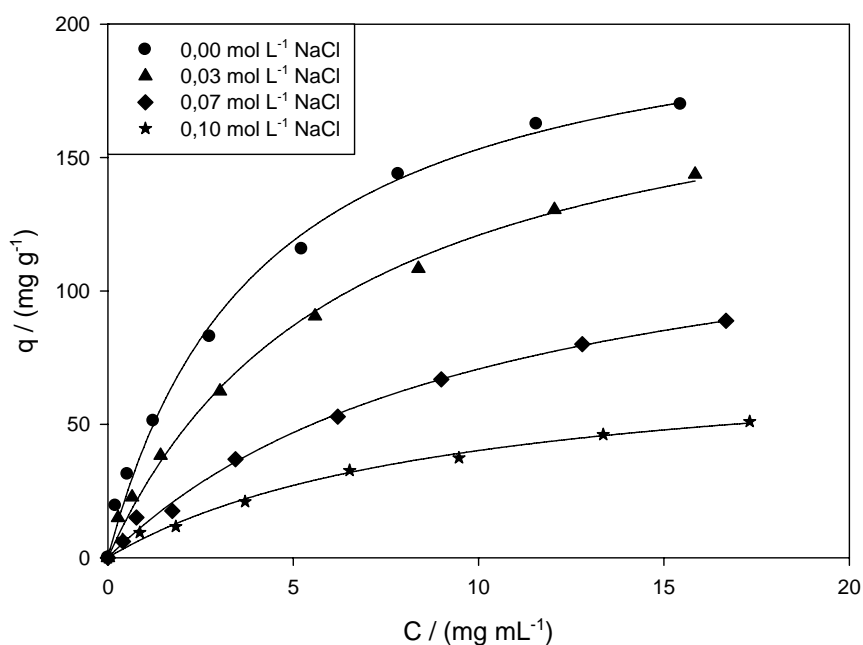
O efeito da concentração de NaCl sobre a isoterma de adsorção da ovomucoide na resina aniônica Streamline Q XL pode ser verificado nas Figuras 2, 3 e 4 para os valores de pH 6,2; 7,0 e 8,0, respectivamente. É possível observar que a adsorção da ovomucoide ocorre de maneira inversamente proporcional ao incremento concentração de NaCl, ou seja, o aumento da concentração salina diminuiu a capacidade de adsorção da resina em todos o valores de pH avaliados.



**Figura 2.** Isothermas de adsorção de Ovomucoide em resina aniônica (Streamline QXL) em diferentes concentrações de NaCl, pH 6,2 e temperatura de 25 °C, em que os símbolos representam os dados experimentais e (-) representa o ajuste do modelo de Langmuir.



**Figura 3.** Isothermas de adsorção de Ovomucoide em resina aniônica (Streamline QXL) em diferentes concentrações de NaCl, pH 7,0 e temperatura de 25 °C, em que os símbolos representam os dados experimentais e (-) representa o ajuste do modelo de Langmuir.



**Figura 4.** Isothermas de adsorção de Ovomucoide em resina aniônica (Streamline QXL) em diferentes concentrações de NaCl, pH 8,0 e temperatura de 25 °C, em que os símbolos representam os dados experimentais e (-) representa o ajuste do modelo de Langmuir.

Quando se tem um aumento na força iônica, causada pela adição de NaCl, as interações eletrostáticas íon-íon existentes na dupla camada elétrica diminuem devido a blindagem eletrostática, alterando a distribuição molecular e iônica na região, levando a uma diminuição da adsorção. Quando existe uma elevação na densidade de cargas de interação eletrostática das moléculas envolvidas no processo há um fenômeno de repulsão proteína-adsorvente na dupla camada elétrica e a elevação da concentração salina não favorece a adsorção. Outro fator que contribui para este efeito é a competição das moléculas de proteína em solução e os eletrólitos  $\text{Cl}^-$  da adição de NaCl com os contra-íons de troca. BOSTRÖM et al. (2003, 2004, 2005) demonstraram que o fenômeno pode ser entendido quando as forças de dispersão iônica entre íons e proteína são tratadas ao mesmo nível das interações da dupla camada elétrica, principalmente porque, enquanto as forças eletrostáticas normalmente dominam em baixas concentrações salinas, as forças de dispersão se tornam importantes em altas concentrações. BOSTRÖM et al. (2005) indicam que a inclusão das forças de dispersão atuantes entre as interações íon-íon e íon-macropartículas e dos efeitos íons-específicos de solvatação explicam grande parte dos efeitos de especificidade iônica.

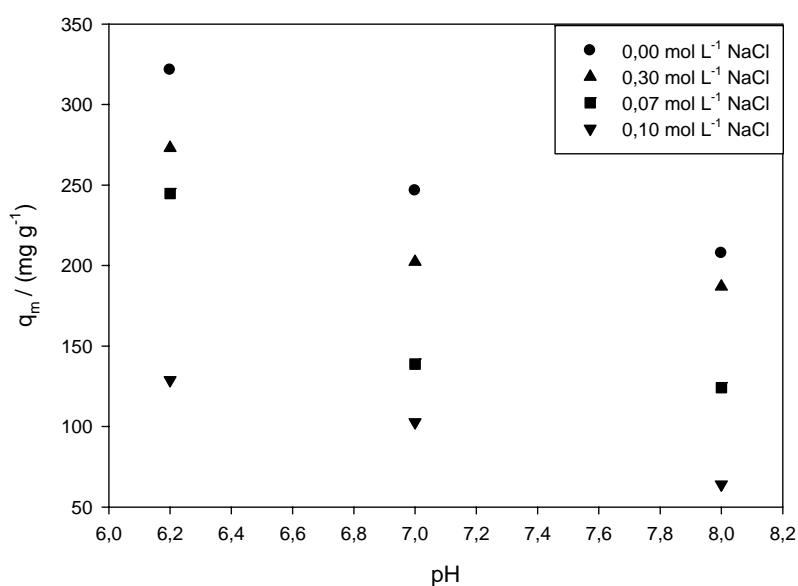
GAO et al. (2007), em um estudo do efeito do pH e concentração salina sob o mecanismo de adsorção de proteínas em um trocador iônico, também observaram efeito semelhante com o aumento da concentração de NaCl. CHEN et al. (2006), avaliando um modelo que previa a influência da concentração de sal em uma ampla faixa de pH, justificaram este comportamento pela presença de um efeito estérico das interações intermoleculares das proteínas com os contra-íons. Quanto à concentração de sal em solução, HUANG et al. (1990) e FANG et al. (1996) relatam que no processo de troca iônica, quanto maior a concentração de sal menor a capacidade adsortiva da resina, indicando que a principal força envolvida no processo de troca iônica foi a atração eletrostática (LIN et al., 2001). Na Tabela 1, fica evidente o decréscimo da capacidade máxima de adsorção ( $q_m$ ) conforme se aumenta a concentração salina para a faixa de pH avaliada.

O processo adsortivo da proteína ovomucoide na resina aniônica Streamline Q XL é resultado do balanço global das interações predominantes no processo e conseqüentemente na energia das interações das moléculas envolvidas, o que sugere

um estudo mais específico quanto à influência da concentração de NaCl sobre a energia resultante das interações moleculares no sistema.

### 3.3 Efeito do pH sobre a adsorção da ovomucoide

A Figura 5 ilustra o efeito do pH sobre a capacidade máxima de adsorção ( $q_m$ ) para todas as concentrações de sal estudadas.



**Figura 5.** Efeito do pH sobre a capacidade máxima de adsorção ( $q_m$ ) da ovomucoide em resina aniônica, à 25 °C em diferentes concentrações de sal.

O ponto isoelétrico da ovomucoide é 4,1, assim nos valores de pH estudados a proteína apresenta uma carga líquida negativa em sua superfície. Quando o pH é elevado de 6,2 a 8,0 a densidade de cargas negativas na superfície da proteína aumenta, o que deveria ter favorecido o processo de adsorção da ovomucoide. No entanto, como ilustrado na Figura 5, com o aumento do pH houve uma diminuição da capacidade máxima de adsorção da ovomucoide.

Estudos do efeito do valor de pH, no processo de troca iônica de proteínas, têm sido relatados ao longo dos últimos anos por diversos autores (HUANG et al., 1990; LIN et al., 2001, GAO et al., 2007), porém o mecanismo estrutural da interação com proteínas ainda não está bem estabelecido.

Uma das possíveis razões para o resultado encontrado deve-se ao fato de que durante o processo de adsorção, além das interações eletrostáticas, estão presentes



outros tipos de interação entre a proteína e o adsorvente, tais como, interação hidrofóbica e ligação de hidrogênio. Outro fato que poderia explicar este fenômeno é relativo à mudança de conformação da proteína quando há mudança de pH. DZHAFAROV (2000), que fez um estudo com BSA, relatou que a área da superfície da proteína acessível ao trocador iônico pode aumentar consideravelmente com mínimas mudanças no valor de pH. Assim a diminuição da capacidade de adsorção com o aumento do pH poderia ser considerado como resultado do aumento do volume molecular da ovomucoide. GAO et al. 2007 estudando o efeito do pH sobre a adsorção de BSA, encontrou resultados semelhantes.

#### 4. CONCLUSÃO

Os dados de equilíbrio de adsorção da ovomucoide em resina trocadora de ânions (Streamline Q XL) foram obtidos em tanques agitados a temperatura de 25 ° em diferentes concentrações de NaCl e diferentes valores de pH. O modelo de Langmuir foi ajustado aos dados experimentais. Nas condições experimentais avaliadas, foi possível observar que o comportamento no processo de adsorção da ovomucoide na resina é influenciado pela concentração de NaCl e pelo pH, ocorrendo uma redução da capacidade de adsorção com aumento do pH e da concentração salina.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BOSTRÖM, M., TAVARES F. W., BRATKO, D., NINHAM, B. W. Specific ion effects in solutions of globular proteins: Comparison between analytical models and simulation. **J Phys Chem B Condens Matter Mater Surf Interfaces Biophys**. v. 109; p. 24489–24494; 2005.

BOSTRÖM, M., WILLIAMS, D. R. M., NINHAM, B. W. Specific ion effects: role of salt and buffer in protonation of cytochrome C, **European biophysics journal**. E13; p. 239–245; 2004.

BOSTRÖM, M., WILLIAMS, D. R. M., NINHAM, B. W. Specific ion effects: why the properties of lysozyme in salt solutions follow a Hofmeister series, **European biophysics journal**. v. 85; p. 686–694; 2003.

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

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

CHEN, W. D.; HUC, H.; WANG, Y. Analysis of steric mass-action model for protein adsorption equilibrium onto porous anion-exchange adsorbent. **Chemical Engineering Science**. V. 61; p. 7068 – 7076; 2006.

DZHAFAROV, S. E. Study of Interphases Between Subunits of Human Serum Albumin By Tritium Labelling , **Journal Biology**. V. 24, p. 345–351, 2000.

FANG, F.; AGUILAR, M. I.; HEARN, M. T. W. Influence of temperature on the behaviour of proteins in cation-exchange chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 729, p. 49-66, 1996.

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

FINETTE, G.; MAO, M-Q.; HEARN, M. Comparative studies on the isothermal characteristics of proteins adsorbed under batch equilibrium conditions to ion-exchange, immobilized metal ion affinity and dye affinity matrices with different ionic strength and temperature conditions. **Journal Chromatography A**, v. 763, p.71-90, 1997.

GAO, D.; LIN, D. Q.; YAO , S. J. Mechanistic analysis on the effects of salt concentration and pH on protein adsorption onto a mixed-mode adsorbent with cation ligand. **Journal of Chromatography B**, v. 859; p.16–23; 2007.

HUANG, J.; SCHUDEL, J.; GUIOCHON, G. Adsorption behaviour of albumin and conalbumin on TSK-DEAE 5PW anion exchanger. **Journal of Chromatography**, v. 504, p. 335-349, 1990.

GUIOCHON, G.; SHIRAZI, S. G.; KATTI, A. M. **Fundamentals of preparative and nonlinear chromatography**. Academic Press, New York, 1994, 700 p.

JACOBSON, J.; FRENZ, J.; HORVÁTH, C. Measurement of competitive adsorption isotherms by frontal chromatography. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 26, p. 43-50, 1987.

JULIÀ, S.; SÁNCHEZ, L.; Pérez, M. D.; LAVILHA M.; CONESA, C.; CALVO, M. Effect of treatment on hen's egg ovomucoid: An immunochemical and calorimetric study. **Food Reserch International**, v. 40, p. 603-612, 2007.

LAN, Q.; BASSI, A. S., ZHU, J. J., MARGARITIS, A. A modified Langmuir model for the prediction of the effects of ionic strength on the equilibrium characteristics of protein adsorption onto ion exchange/affinity adsorbents. **Chemical Engineering Journal**, v. 81, p. 179 – 186, 2001.

LANGMUIR, I. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. **Journal of American Chemical Society**. V.30, p.2263-2295, 1916.

LI, P.; XIU, G.; RODRIGUES, A. E. Modeling separation of proteins by iner core adsorbent in a batch adsorber. **Chemical Engineering Sci.** v.58, p. 3361-3371, 2003.

LIN, F. Y.; CHEN, C. S.; CHEN, W. Y.; YAMAMOTO, S. Microcalorimetric studies of interaction mechanisms between proteins and Q-Sepharose at pH near the isoelectric point (pI) – effects of NaCl concentration, pH value and temperature. **Journal of Chromatography A**, v. 912, p. 281-289, 2001.

LINDEN, G.; LORIENT, D. **Bioquímica agroindustrial**, Zaragoza: Editorial Acribia, S.A. 1996.

MINE, Y., BERGOUGNOUX Adsorption properties of cholesterol reduced egg yolk low-density liprotein at oil-in- water interfaces. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 2152-2158, 1998.

MINE, Y., RUPA, P. Immunological and biochemical properties of egg allergens. **World's Poultry Science Journal**, v. 60, p. 321 - 330, 2004.

MINE, Y., SASAKI, E., ZHANG J.W., Reduction of antigenicity and allergenicity of genetically modified egg white allergen, ovomucoid third domain. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 302, p. 133-137, 2003.

MINE, Y., ZHANG, J.W., Identification and fine mapping of IgG and IgE epitopes in ovomucoid. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 292, p. 1070–1074, 2002.

PHARMACIA BIOTECH. Streamline® Q XL Streamline® SP XL. 71-5002-61, p1, 1997. Disponivel em: <http://www.ebiotrade.com/GE/AKTAclub7/1.PDFs/71500261.pdf>. Acesso em: 12 de maio de 2008.

RUPA P., MINE Y. Engineered recombinant ovomucoid third domain can modulate allergenic response in Balb/c mice model. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 342, p. 710–717, 2006.

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

URISU A., ANDO H., MORITA Y., WADA E., YASAKI T., YAMADA K., KOMADA K., TORII S., GOTO M., Wakamatsu T. Allergenic activity of heated and ovomucoid-depleted egg white. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v 100 (2) p. 171-176, 1997.

WIRTH H. J., UNGER K. K., HEARN M. T. W.; **Influence of Ligand Density on the Properties of Metal-Chelate Affinity Supports**. *Analytical Biochemistry*, v. 208, p. 16-25, 1993.

WONG, Y. C.; HERALD, T. J.; HACHMEISTER, K. A. Comparison between irradiated and thermally pasteurised liquid egg white on functional, physical and microbiological properties. **Poultry science**, v. 75(6), p. 803-808, 1996.

ZHANG, S.P.; SUN, Y. Ionic strength dependence of protein adsorption to dye-ligand adsorbents. **AIChE Journal**, v. 48, p. 178-186, 2002.

## **CAPÍTULO 4. ADSORÇÃO DA OVOMUCOIDE EM TANQUES AGITADOS UTILIZANDO RESINA DE INTERAÇÃO HIDROFÓBICA**

### **RESUMO**

Dados de equilíbrio de adsorção da ovomucoide em resina de interação hidrofóbica (Streamline Phenyl) foram obtidos em tanques agitados a temperatura de 25 °C. Foi avaliada a influência do tipo de sal (NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e da sua concentração (0,3; 0,5; 0,8 e 1,0) mol L<sup>-1</sup>. O modelo de Langmuir ajustou-se aos dados experimentais, observando-se que com o aumento da concentração de sal houve um incremento na capacidade de adsorção da resina. Quanto ao tipo de sal, o Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> promoveu uma maior adsorção da proteína na resina.

### **1. INTRODUÇÃO**

A clara do ovo é uma fonte natural de proteínas de reconhecido potencial nutricional biológico e de interesse tecnológico (AWADE et al. 1994), sendo um ingrediente muito utilizado na tecnologia de alimentos (MINE et al., 1998; WONG et al. 1996). A ovalbumina, a conalbumina ou ovotransferrina, a ovomucoide e a lisozima são quatro proteínas que representam mais de 80% da proteína total (LINDEN e LORIENT, 1996). Apesar da importância nutricional e tecnológica destas proteínas, elas são identificadas como as principais proteínas alergênicas da clara, porém estudos mostram que a ovomucoide é o componente que causa o maior número de reações alérgicas (JULIÀ et al. 2007; MINE e ZHANG, 2002).

A ovomucoide é uma proteína composta 186 aminoácidos e constitui 11 % do total de proteínas da clara, sendo altamente glicosilada contendo (20 a 25) % de carboidratos. Apresenta uma massa molar de 28 kDa, um ponto isoelétrico de 4,1 e atividade de inibição da tripsina (MINE e RUPA, 2004). Os 186 aminoácidos presentes na molécula são arranjados em três domínios, sendo cada domínio ligado por pontes de dissulfeto. Esta característica estrutural pode ser a causa da alta resistência ao calor e a digestão proteolítica, assim como sua capacidade alergênica (RUPA e MINE, 2006; MINE et al., 2003; URISU et al., 1997).

Uma das técnicas utilizadas para a purificação da ovomucoide é a precipitação, que apresenta desvantagens associadas a desnaturação da proteína e a

baixa pureza. Desta forma, torna necessário o desenvolvimento de técnicas de separação e purificação desta proteína que mantenha suas características inalteradas. Uma técnica com potencial adequação à purificação de proteínas da clara é a adsorção, na qual certos componentes de uma fase fluida são transferidos para a superfície de um adsorvente sólido, em um fenômeno de superfície.

A cromatografia de adsorção em tanques agitados, ou batelada, é um processo simples, usado na avaliação do equilíbrio de adsorção e dessorção, na cinética de adsorção das proteínas (CHANG e CHASE, 1996; ZHANG e SUN, 2002; TONG e SUN, 2003, CHEN et al., 2003), na determinação de parâmetros de modelos (como parâmetros de equilíbrio de adsorção e difusividade intrapartícula), empregados na simulação de processos cromatográficos em grande escala, como de leite expandido e leite móvel simulado (LI et al, 2003). As isotermas de adsorção das proteínas fornecem informações fundamentais para o projeto de separações cromatográficas. O equilíbrio de adsorção representa a dependência da quantidade de proteína ligada na superfície do adsorvente sobre a concentração de equilíbrio da proteína na fase líquida a temperatura constante (VANKOVA et al., 2007).

A cromatografia de interação hidrofóbica (CIH) é uma técnica muito utilizada para a separação de proteínas, baseada na interação reversível entre as zonas hidrofóbicas da superfície da proteína e o ligante hidrofóbico de uma resina cromatográfica (MAHN et al., 2005). A CIH alcança separações rápidas com pequenas degradações do produto, baixas exigências de solventes e níveis de purificação muito bons (QUIERIOZ et al., 2001). O mecanismo de interação hidrofóbica entre solutos e líquidos foi estudado devido à sua importância na precipitação das proteínas por salting-out (CHEN e SUN, 2003). A CIH é amplamente influenciada pelo tipo e concentração de sal. Nos sistemas por CIH, as proteínas são adsorvidas na presença de altas concentrações de sal e são eluídas com a redução da concentração de sal (CHEN et al, 2007).

Neste trabalho objetivou-se avaliar o comportamento de adsorção em tanques agitados da proteína da clara, ovomucoide, empregando uma resina de característica hidrofóbica, em diferentes concentrações (0,3; 0,5; 0,8 e 1,0) mol L<sup>-1</sup> e tipos de sais (NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), à temperatura de 25°C. A análise da retenção das proteínas foi conduzida com base nos dados de equilíbrio da adsorção. Tais informações levam a uma melhor compreensão do processo de separação e permitem a otimização da eficiência da separação.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Materiais**

A ovomucoide foi adquirida da Sigma Aldrich (USA). A resina empregada nos experimentos de adsorção foi a Streamline Phenyl adquirida de Amershan Pharmacia Biotech (Suécia), cuja densidade média de partícula é  $1,2 \text{ g mL}^{-1}$ . Possui tamanho médio de partícula de  $200 \text{ }\mu\text{m}$ , porosidade de 0,60, forma esférica e matriz com núcleo de quartzo cristalino (ROJAS, 2006). Nos experimentos foram utilizados água ultrapura (sistema Milli-Q, Millipore Inc., USA) e reagentes químicos de grau analítico e cromatográfico.

### **2.2 Experimentos de adsorção da ovomucoide em tanque agitado**

Neste trabalho foi avaliado o processo adsorptivo da proteína ovomucoide, empregando a resina de interação hidrofóbica Streamline Phenyl (Amershan Pharmacia Biotech, Suécia), em valores de pH de 7,0, concentração de sal (0,3; 0,5; 0,8 e 1,0)  $\text{mol L}^{-1}$  para NaCl,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , a temperatura de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### **2.2.1 Dados de equilíbrio**

Os dados de equilíbrio para obtenção das isotermas de adsorção da proteína ovomucoide foram obtidos por meio de ensaios em batelada, variando a concentração e o tipo de sal (NaCl,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) nos experimentos.

Antes da realização dos experimentos, fez-se necessário um pré-condicionamento da resina, na qual encontrava-se, em solução aquosa de 20% etanol. Para isso, foi transferido cerca de 20 mL do adsorvente para um tubo centrífugo de 50 mL, acrescentando a mesma quantidade de água ultra pura (Milli-Q, Millipore Inc., USA). Os tubos foram agitados por 5 minutos e posteriormente centrifugados (Eppendorf Mod. 5804, Alemanha), sendo então o sobrenadante descartado. O mesmo procedimento foi repetido 3 vezes e, em seguida, mais 2 vezes utilizando, no entanto, um tampão fosfato. Foi obtida uma pasta de resina pré-condicionada, que permaneceu em estufa por cerca de 10 horas para secagem.

Posteriormente à secagem, foram pesados  $50 \text{ mg} \pm 5 \text{ mg}$  da resina, com auxílio de uma balança analítica (Denver M-310 Analytical Balance, USA), diretamente em tubos eppendorf de 2,0 mL, sendo posteriormente acrescentado 1 mL do tampão fosfato  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0, contendo o sal avaliado ( $\text{NaCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) em concentrações pré-definidas. Os tubos foram deixados sob leve agitação, em um sistema simulando um tanque agitado, como proposto por FERREIRA (2001) por um período de 16 horas para condicionamento da resina. Após este período, aos vários tubos contendo a resina pré-condicionada, foi adicionado diferentes volumes (0 a 1000)  $\mu\text{L}$  de solução de ovomucoide, de forma a obter-se variadas concentrações de proteína nos tubos. A faixa de concentração de proteína variou de (0 a 20)  $\text{mg mL}^{-1}$ . Os tubos foram deixados sob leve agitação por um período de 16 horas para condicionamento da resina. Após este período, aos vários tubos contendo a resina pré-condicionada, foram adicionados diferentes volumes de solução de ovomucoide, de forma a obter-se diferentes concentrações de proteína nos tubos. Em seguida, foi incorporado o tampão fosfato para completar o volume de solução para 2 mL. Os tubos foram agitados por 20 horas, sob temperatura controlada (DBO Mod. 101M/3 Eletrolab®, Brasil) de forma a se estabelecer o equilíbrio. No final do período de agitação, os tubos foram centrifugados (microcentrífuga Labnet Force 7, Denver Instrument Company, USA) a  $7500g$  por 15 minutos.

Os experimentos foram realizados em pH 7,0, temperatura de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  e concentrações de sal (0,3; 0,5; 0,8 e 1,0)  $\text{mol L}^{-1}$  para o  $\text{NaCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

### **2.2.2 Análises de proteína**

A concentração de proteína, presente na solução, foi determinada pelo método espectrofotométrico (Spectrophotometer Care 50 Probe, Varian, USA) de leitura direta a 280 nm, considerando o branco do ensaio como absorvância zero. As curvas analíticas foram obtidas utilizando soluções de ovomucoide com concentrações conhecidas (0,04 a 2,0)  $\text{mg mL}^{-1}$ . A concentração de proteína adsorvida na resina aniônica (q) tem relação direta com a concentração do soluto na fase líquida, observada por meio das curvas de calibração e determinada por um balanço de massa no sistema, do qual resulta:



$$q = \frac{V}{m}(C_0 - C_b) \quad (1)$$

em que V (mL) é o volume total do sistema, m (g) é a massa do adsorvente que é colocado em contato com um volume de solução protéica de concentração  $C_0$  (mg/mL) e  $C_b$  (mg/mL) é a concentração de proteína em solução no final do experimento de adsorção.

### 2.2.3 Modelagem dos dados de equilíbrio

Muitos modelos de isothermas diferentes, tais como, a isoterma Linear, a de Langmuir, a bi-Langmuir, a de Freundlich e a de Langmuir- Freundlich, têm sido propostas para estudar a adsorção de solutos em solução sobre uma superfície sólida. Entre estes modelos o de Langmuir é o mais utilizado devido a sua simplicidade e é bem ajustável aos dados experimentais (LAN et al., 2001). O modelo da isoterma de Langmuir (Langmuir, 1916), com base em conceitos do equilíbrio termodinâmico, foi empregado para ajustar e descrever os dados de equilíbrio, utilizando a Equação:

$$q = \frac{q_m C}{K_d + C} \quad (2)$$

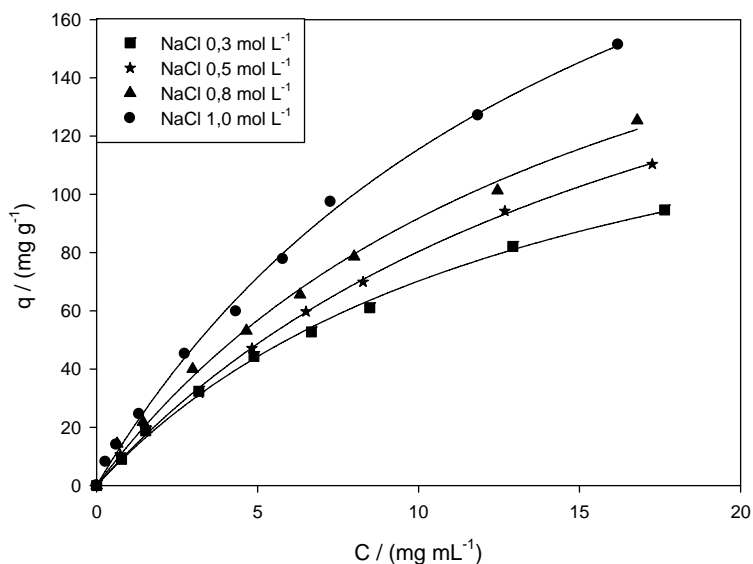
onde Q, é a quantidade de proteína adsorvida por unidade de massa de adsorvente ( $\text{mg g}^{-1}$ ); c, a concentração de proteína na fase líquida, no equilíbrio ( $\text{mg mL}^{-1}$ );  $q_m$ , a quantidade máxima de soluto adsorvida ( $\text{mg g}^{-1}$  resina); e  $K_d$ , a constante de dissociação ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) do complexo soluto-adsorvente, representa a afinidade entre o soluto e o adsorvente.

O modelo da isoterma de Langmuir foi ajustado aos dados experimentais utilizando SigmaPlot 10 SystatSoftware Inc.

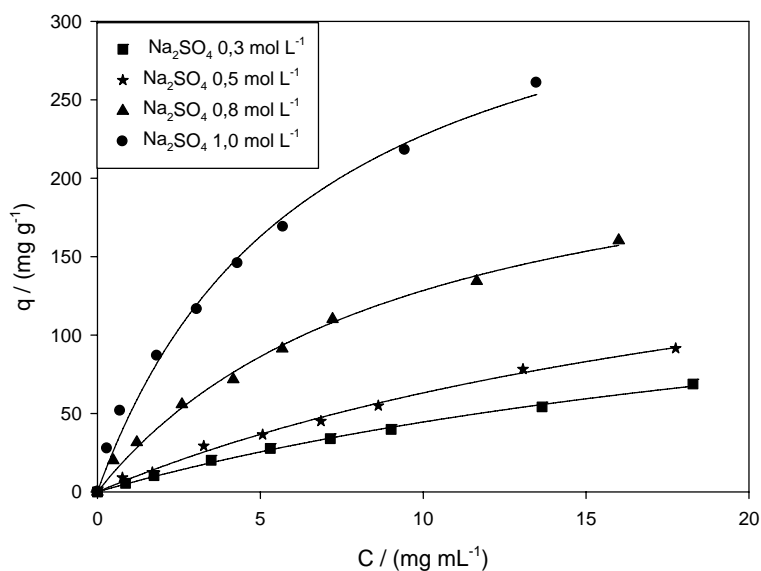
## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Efeito do tipo e concentração de sal sobre a adsorção da ovomucoide

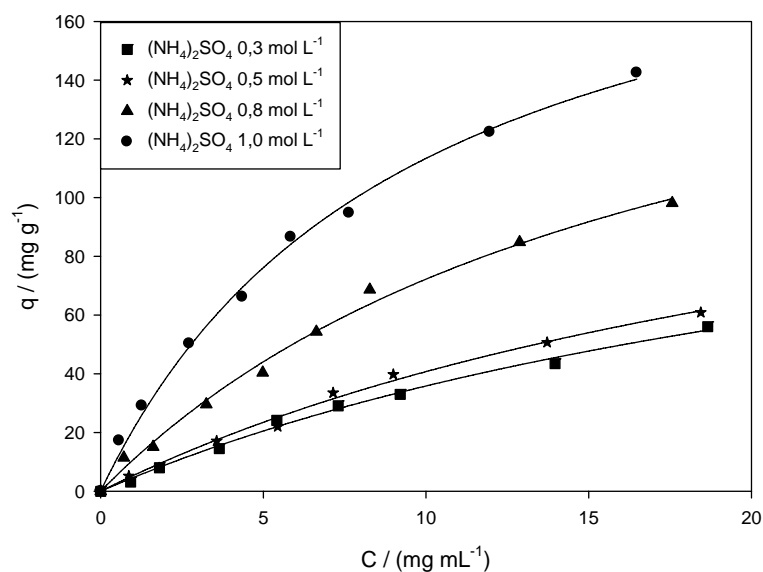
Os dados experimentais foram ajustados segundo o modelo de Langmuir. As isotermas de adsorção para a ovomucoide em diferentes tipos de sais e concentrações são apresentadas nas Figuras 1, 2 e 3.



**Figura 1.** Isotermas de adsorção de Ovomucoide em resina de interação hidrofóbica (Streamline phenyl) em diferentes concentrações de NaCl, pH 7,0 e temperatura de 25 °C, em que os símbolos representam os dados experimentais e (-) representa o ajuste do modelo de Langmuir.



**Figura 2.** Isotermas de adsorção de Ovomucoide em resina de interação hidrofóbica (Streamline phenyl) em diferentes concentrações de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7,0 e temperatura de 25 °C, em que os símbolos representam os dados experimentais e (-) representa o ajuste do modelo de Langmuir.



**Figura 3.** Isotermas de adsorção de Ovomucoide em resina de interação hidrofóbica (Streamline phenyl) em diferentes concentrações de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , pH 7,0 e temperatura de 25 °C, em que os símbolos representam os dados experimentais e (-) representa o ajuste do modelo de Langmuir.

A adsorção da ovomucoide na resina aumenta com o incremento da concentração de sal, para todos os sais utilizados. Estes resultados são consistentes com os encontrados, por CHEN et al (2003) e ARAKAWA (1986), na interação de proteína em colunas hidrofóbicas de octil-sepharose e polissacarídeo, respectivamente, em solução com sulfato de amônio, e com os de ROJAS et al. (2006), na interação das proteínas da clara, ovalbumina, conalbumina e lisozima, com resina hidrofóbica Streamline Phenyl.

Algumas considerações podem ser feitas visando explicar as fortes interações hidrofóbicas em altas concentrações de sal nos sistemas de interação hidrofóbica. De acordo com LIN et al. (2001), a água ligada às proteínas impede que as mesmas possam adsorver na superfície do ligante do adsorvente hidrofóbico. Porém, na presença de sal, a proteína pode ser desidratada devido à influência das moléculas de sal em sua vizinhança. Assim, as zonas hidrofóbicas da proteína podem ser gradualmente expostas com o incremento da concentração de sal, fortalecendo a interação hidrofóbica entre a proteína e a superfície adsorvente.

Pode-se explicar o aumento das interações hidrofóbicas quando o processo adsorptivo ocorre em altas concentrações de sal, levando-se em consideração a

distribuição de moléculas e cargas elétricas (íons) na interface da proteína e no interior da solução. No pH igual a 7, a proteína encontra-se carregada negativamente (pI=4,1), tendo ao seu redor uma distribuição de íons de mesmo sinal e de sinal contrário à carga da superfície da proteína. Além disso, moléculas de H<sub>2</sub>O também se distribuem e se reorientam nas proximidades da interface proteína/solução. A distribuição destes íons gera uma diferença de potencial elétrico entre a interface da proteína e um ponto qualquer na solução. Por sua vez, esta diferença de potencial elétrico também influencia a distribuição destes íons. A região descrita acima é conhecida como dupla camada elétrica (SIERRA, 2007).

A interação dos íons e das moléculas de água com a interface da proteína é regida por três fatores termodinâmicos que (Equação 2), no equilíbrio, permanecem constantes (ADAMSON, 1990).

$$\mu^o + RT \ln x_i + z_i e \Delta \phi N = \text{constante} \quad (2)$$

em que  $\mu^o$  é o potencial da espécie química que está interagindo molecularmente com a superfície da proteína. Assim, quanto maior for a interação molecular, maior será a adsorção da espécie *i* na interface da proteína. No sistema estudado são as moléculas de água que estão em maior concentração na interface proteína/solução. Estas moléculas estão orientadas tendo, por isto, uma baixa entropia configuracional, quando comparada às moléculas do interior da solução.

O termo  $RT \ln x_i$  expressa a contribuição da entropia configuracional sobre a distribuição dos íons. Quanto mais simétrica em termos de cargas elétricas for a distribuição dos íons, maior será a entropia configuracional. Já o termo  $z_i e \Delta \phi N$  expressa a contribuição das interações eletrostáticas na distribuição iônica da dupla camada elétrica. Quanto maior for a carga elétrica da proteína, maior será o valor de  $\Delta \phi$  e, conseqüentemente, mais assimétrica será a distribuição dos íons, ou seja, maior número de cátions estarão próximos à interface da proteína, enquanto os ânions estarão concentrados longe da interface.

Em resumo, pode-se afirmar que existem basicamente duas regiões ao redor da proteína. A primeira, bem próxima à interface, dominada por interações moleculares fortes, é formada por moléculas e íons orientados, com uma forte diminuição da entropia configuracional. Esta camada é chamada de região interna da dupla camada elétrica. A segunda é formada por espécies químicas que interagem

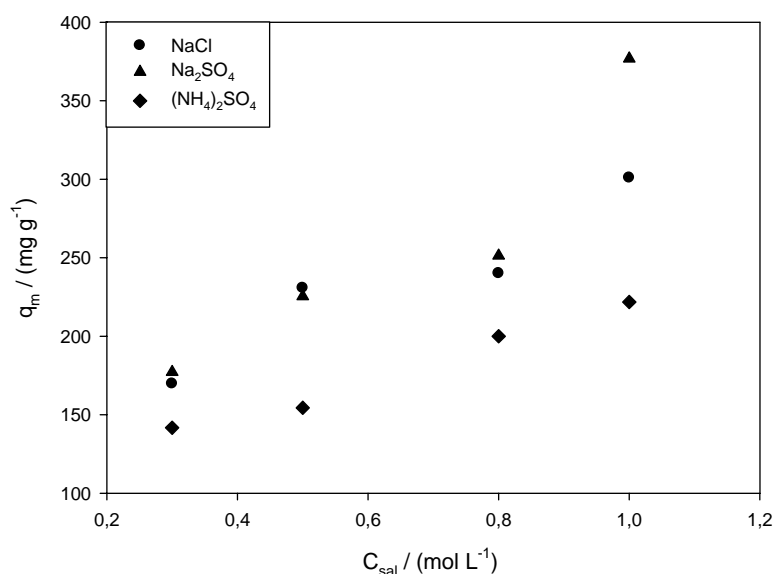
preferencialmente por interação eletrostática e são também dominadas por aspectos entrópicos. Esta região é denominada de camada difusa.

A função do sal é modificar as interações intermoleculares provenientes da dupla camada elétrica, alterando, assim, a distribuição molecular e iônica desta região. Em baixas concentrações de sal, é a região difusa a primeira a mudar a distribuição de íons pois, aumentando-se a concentração de cátions e ânions nesta região, diminui-se a diferença de densidade de carga, reduzindo assim o valor de  $\Delta\varphi$  e, conseqüentemente, a interação dos íons com a proteína. Este efeito geralmente é denominado blindagem eletrostática da região difusa da dupla camada elétrica. Aumentando-se ainda mais a concentração do sal, poderá ocorrer a interação de seus íons com as moléculas de água presentes na camada interna dessolvando a interface da proteína, isto é, alterando  $\mu_i^o$  (ADAMSON, 1990).

O processo de adsorção da proteína pode ser esquematizado nas seguintes etapas: primeiramente ocorre a deionização da camada difusa da proteína e, em seguida, a dessolvatação da interface protéica, permitindo, assim, a exposição das regiões hidrofóbicas. Finalmente, ocorre a interação proteína-substrato. Desta forma, o aumento da interação hidrofóbica verificada com o aumento da concentração do eletrólito, pode ser atribuído a um menor custo energético para deionizar e dessolvatar a proteína durante o processo de adsorção (SIERRA, 2007).

O tipo de sal usado na retenção hidrofóbica também é um parâmetro importante na otimização do processo de separação de proteínas por CIH (MAHN et al., 2004). Isto porque cada sal interage de forma diferente com a água, sendo que alguns tipos de sais interagem mais fortemente com a água, gerando uma maior dessolvatação da proteína, expondo mais grupos hidrofóbicos da proteína para interagir com a resina, aumentando a adsorção. De acordo com a Figura 4 pode-se observar que a ordem de adsorção da ovomucoide na resina, em maiores concentrações de sal, é  $\text{Na}_2\text{SO}_4 > \text{NaCl} > (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , sendo que em baixas concentrações salinas quase não foi observado diferença na adsorção quando se utilizou o  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e  $\text{NaCl}$ . Resultados semelhantes em outras proteínas foram relatados na literatura (HORVATH et al., 1976; GENG et al., 1990; CHEN e SUN, 2003). ROJAS et al. (2006) estudaram a adsorção das proteínas da clara, lisozima, conalbumina e ovoalbumina, e foi observado que o efeito do tipo de sal depende da

proteína utilizada, para a ovoalbumina a capacidade máxima de adsorção quanto ao tipo de sal seguiu a mesma seqüência encontrada para a ovomucoide.



**Figura 4.** Efeito do tipo de sal sobre a capacidade máxima de adsorção ( $q_m$ ) da ovomucoide em resina de interação hidrofóbica, à 25 °C em diferentes concentrações de sal.

#### 4. CONCLUSÃO

Este trabalho avaliou os dados de equilíbrio de adsorção da proteína ovomucoide em resina de interação hidrofóbica (Streamline Phenyl). O modelo de Langmuir foi ajustado a todos os dados experimentais. Os resultados mostraram que os processos de adsorção da ovomucoide na resina são dependentes do tipo e da concentração do sal. O aumento da concentração de sal ocasionou um aumento da capacidade de adsorção da ovomucoide, sendo que quando se utilizou o  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  obteve-se um maior valor para a capacidade máxima de adsorção.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMSON, A. W. **Physical Chemistry of surfaces**. 5ª edition New York: John Wiley & Sons, 1990, 777 p.

ARAKAWA, T. Thermodynamic analysis of the effect of concentrated salts on protein interaction with hydrophobic and polysaccharide columns. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. V. 248 (1), p. 101-105, 1986.

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

BONOMO, R.C.; MINIM, L. A., COIMBRA, J. S. R.; FONTAN, R. C. I.; MENDES DA SILVA, L. H.; MINIM, V. P. R. Hydrophobic interaction adsorption of whey proteins: Effect of temperature and salt concentration and thermodynamic analysis. **Journal of Chromatography B**. V. 844, p 6-14, 2006.

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

CHEN, J.; LUO Q.; BRENNEMAN C. M.; CRAMER S. M. Classification of protein adsorption and recovery at low salt conditions in hydrophobic interaction chromatography systems. **Journal of Chromatography A**. No. 1139, 236-246, 2007.

CHEN, J.; SUN, Y. Modeling of the salt effects on hydrophobic adsorption equilibrium of protein. **Journal of Chromatography A**. V. 992, p. 29-40, 2003.

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

CHEN, W-Y., HUANG, H-M., LIN, C-C., LIN, F-Y., CHAN, Y-C. Effect of temperature on hydrophobic interaction between proteins and hydrophobic adsorbents: Studies by isothermal titration calorimetry and the van't Hoff equation. **Langmuir**. V. 19, p. 9395-9403, 2003.

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

GENG, X. D., GUO, L. A.; CHANG, J. Study of the retention mechanism of proteins in hydrophobic interaction chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 507, p. 1-23, 1990.

HORVATH, C., MELANDER W., MOLNAR I. Solvophobic interactions in liquid chromatography with nonpolar stationary phases. **Journal of Chromatography A**, v. 125, p. 129-156, 1976.

JULIÀ, S.; SÁNCHEZ, L.; Pérez, M. D.; LAVILHA M.; CONESA, C.; CALVO, M. Effect of treatment on hen's egg ovomucoid: An immunochemical and calorimetric study. **Food Research International**, v. 40, p. 603-612, 2007.

LAN, Q.; BASSI, A. S., ZHU, J. J., MARGARITIS, A. A modified Langmuir model for the prediction of the effects of ionic strength on the equilibrium characteristics of protein adsorption onto ion exchange/affinity adsorbents. **Chemical Engineering Journal**, v. 81, p. 179 – 186, 2001.

LANGMUIR, I. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. **Journal of American Chemical Society**. V.30, p.2263-2295, 1916.

LIN, F. Y.; CHEN, C. S.; CHEN, W. Y.; YAMAMOTO, S. Microcalorimetric studies of interaction mechanisms between proteins and Q-Sepharose at pH near the isoelectric point (pI) – effects of NaCl concentration, pH value and temperature. **Journal of Chromatography A**, v. 912, p. 281-289, 2001.

LINDEN, G.; LORIENT, D. **Bioquímica agroindustrial.**, Zaragoza: Editorial Acribia, S.A. 1996.

MAHN, A.; ZAPATA-TORRES, G.; ASENJO, J. A. A theory of protein-resin interaction in hydrophobic interaction chromatography. **Journal of Chromatography A**. No. 1066, 81-88, 2005.

MINE, Y., BERGOUGNOUX Adsorption properties of cholesterol reduced egg yolk low-density liprotein at oil-in- water interfaces. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 2152-2158, 1998.

MINE, Y., RUPA, P. Immunological and biochemical properties of egg allergens. **World's Poultry Science Journal**, v. 60, p. 321 - 330, 2004.

MINE, Y., SASAKI, E., ZHANG, J.W., Reduction of antigenicity and allergenicity of genetically modified egg white allergen, ovomucoid third domain. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 302, p. 133-137, 2003.

MINE, Y., ZHANG, J.W., Identification and fine mapping of IgG and IgE epitopes in ovomucoid. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 292, p. 1070–1074, 2002.

QUEIROZ J.A., TOMAZ C.T., CABRAL J.M.S. Hydrophobic interaction chromatography of proteins. **Journal of Biotechnology**, 87, 143-159, 2001.

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

RUPA P., MINE Y. Engineered recombinant ovomucoid third domain can modulate allergenic response in Balb/c mice model. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 342, p. 710–717, 2006.

SIERRA, O. A. P. **Adsorção de glicomacropéptido por interação hidrofóbica em leite expandido.** Viçosa, MG: UFV, 2007. 105 p. Dissertação (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de Viçosa



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

URISU A., ANDO H., MORITA Y., WADA E., YASAKI T., YAMADA K., KOMADA K., TORII S., GOTO M., Wakamatsu T. Allergenic activity of heated and ovomucoid-depleted egg white. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v 100 (2) p. 171-176, 1997.

VANKOVA, K.; ANTOSOVA, M.; POLAKOV, M. Adsorption equilibrium of fructosyltransferase on a weak anion-exchange resin. **Journal of Chromatography A**, v. 1162, p. 56-61, 2007.

WONG, Y. C.; HERALD, T. J.; HACHMEISTER, K. A. Comparison between irradiated and thermally pasteurised liquid egg white on functional, physical and microbiological properties. **Poultry science**, v. 75(6), p. 803-808, 1996.

ZHANG, S.P.; SUN, Y. Ionic strength dependence of protein adsorption to dye-ligand adsorbents. **AIChE Journal**, v. 48, p. 178-186, 2002.

## CONCLUSÃO GERAL

Os resultados mostraram que ambas as técnicas (extração líquido-líquido utilizando sistemas aquosos bifásicos e adsorção em tanques agitados) podem ser utilizadas em etapas iniciais no processo de separação e purificação da proteína ovomucoide.

A partir dos resultados obtidos por meio dos sistemas analisados pode-se observar que a partição da ovomucoide depende do tipo de sistema estudado e que de acordo com o sal utilizado a proteína se concentra ou na fase inferior (rica em sal) ou na fase superior (rica em polímero). Quando se utilizou o sulfato de magnésio obteve-se a maior porcentagem de recuperação da ovomucoide na fase inferior. Já quando utilizou o carbonato de sódio obteve-se a maior porcentagem de recuperação na fase superior. Desta torna-se necessário estudos termodinâmicos para melhor entendimento do processo de transferência da ovomucoide.

No estudo de adsorção da ovomucoide empregando resina de troca aniônica (Streamline Q XL), os resultados mostraram que com o incremento da concentração de sal (NaCl) e do pH houve uma diminuição da capacidade de adsorção da proteína na resina.

Já no estudo de adsorção utilizando resina de interação hidrofóbica (Streamline phenyl) o aumento da concentração de sal resultou num aumento da capacidade de adsorção da proteína na resina. E quanto ao tipo de sal, obteve-se uma maior adsorção quando se utilizou o sulfato de sódio.