



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
ALIMENTOS

PARTIÇÃO DE LACTOFERRINA EM SISTEMAS
AQUOSOS BIFÁSICOS

ANGÉLICA RIBEIRO DA COSTA

ITAPETINGA
BAHIA – BRASIL

2010

ANGÉLICA RIBEIRO DA COSTA

PARTIÇÃO DE LACTOFERRINA EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Área de concentração em Engenharia de Processos de Alimentos, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador:

Prof^a. *D.Sc.* Jane Sélia dos Reis Coimbra

Co-orientador:

Prof^o. *Ph.D* José Antônio Couto Teixeira

ITAPETINGA

BAHIA – BRASIL

2010

637.127 C87p	<p>Costa, Angélica Ribeiro da.</p> <p>Participação de lactoferrina em sistemas aquosos bifásicos./ Angélica Ribeiro da Costa. – Itapetinga: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2010. 56p.</p> <p>Dissertação do Programa de Pós-Graduação “<i>Strictu Senso</i>” do Curso de Especialização em Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Sob a orientação da Prof^a. D Sc. Jane Sélia dos Reis Coimbra e co-orientador Prof. D Sc. José Antonio Couto Teixeira.</p> <p>1. Soro de leite – Proteínas – Lactoferrina. 2. Operações unitárias – Extração líquido-líquido. 3. Sistema Aquoso Bifásico (SAB) – Separação de proteínas I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. II. Coimbra, Jane Sélia dos Reis. III. Teixeira, José Antonio Couto. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDD(21): 637.127</p>
-----------------	---

Catálogo na Fonte:

Cláudia Aparecida de Souza – CRB 1014-5ª Região
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para desdobramentos por assunto:

1. Soro de leite – Proteínas – Lactoferrina.
2. Operações unitárias – Extração líquido-líquido.
3. Sistema Aquoso Bifásico (SAB) – Separação de proteínas



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS



Área de Concentração: Engenharia de Processos de Alimentos

Campus de Itapetinga-BA

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: “PARTIÇÃO DE LACTOFERRINA EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS”

Autora: ANGÉLICA RIBEIRO DA COSTA

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Jane Sélia dos Reis Coimbra

Co-orientador: Prof. Dr. José Antonio Couto Teixeira

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENGENHARIA DE PROCESSOS DE ALIMENTOS, pela Banca Examinadora.


Prof^ª. Jane Sélia dos Reis Coimbra, DSc., UFV


Prof^ª. Renata Cristina Ferreira Bonomo, DSc., UESB


Prof. Genebaldo Sales Nunes, DSc., UESB

Data da Realização: 18 de maio de 2010.

*Aos meus amados pais, Sônia e Adalberto.
Aos meus preciosos irmãos, Júnior, Vinícius e Ana Júlia.
A minha avó Maria Angélica e aos meus tios.
Ao especial Leonardo e a minha linda sobrinha Yasmin.
Uma verdadeira torcida de perfil espetacular.*

Dedico

Agradecimentos

A Deus, pelo dom da vida, por ter me dado a graça de participar do programa de mestrado da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) em parceria com a Universidade Federal de Viçosa (UFV), e pela benção de poder concluí-lo. Por me mostrar sempre que tudo é possível quando Ele se faz presente, e por ter colocado em meu caminho pessoas para quem eu gostaria de deixar algumas palavras de agradecimentos.

À FAPESB pelo apoio financeiro atribuído através de uma bolsa de Mestrado.

À minha orientadora, Prof.^a Jane Coimbra, da Universidade Federal de Viçosa (UFV), eu agradeço por todas as oportunidades nessa caminhada do mestrado. A confiança depositada em mim, seus ensinamentos, orientação e motivação foram, sem dúvida, os pilares na construção deste trabalho. Agradeço ainda, a amizade e a oportunidade de ter conduzido minha investigação na Universidade do Minho (UM), em Portugal.

Ao Prof. José Teixeira, por ter viabilizado meu experimento na UM. A ele, agradeço todo o apoio técnico que tive no Departamento de Engenharia Biológica (DEB), seu otimismo e satisfação são contagiantes.

Aos professores do DEB, Antônio Vicente, pelo acolhimento e simpatia, e Lígia Rodrigues, pela atenção, orientação e gentileza. Ao Prof. João Carlos Marcos, do Departamento de Química (DEQ) pela confiança e por ter cedido, inquestionavelmente, todas as ferramentas do Laboratório de Bioquímica na UM para a condução deste trabalho.

À portuguesa Luisa Alexandre Ferreira, por todos os conhecimentos transmitidos com muito boa vontade, pelas longas e divertidas conversas, pela simpatia, pelo acolhimento, e principalmente pela cumplicidade desde o primeiro instante que nos levou a uma verdadeira amizade.

Aos meus pais sempre, por terem investido em mim tanto amor, compreensão, carinho e confiança, juntamente com toda minha família. E ao Leonardo por ter acreditado em mim sempre.

Às meninas lá de casa (Viçosa), em ordem alfabética, Carla, Daniela, Jamilly, Márcia e Patrícia, não tenho palavras para agradecer a compreensão, atenção e o chamado sentimento fiel de afeição, apreço, estima ou ternura, como define o mini Aurélio a amizade.

A Fabíola, Rita, e Rosana pelo apoio científico doado a longa distância, e mais importante do que isso, a amizade, otimismo e satisfação em cada palavra cedida, sobretudo pessoalmente.

Aos meus amigos e colegas da UESB, Graziella, Arianne, Maycon, Normane, Lucas, Gabrielle e aos amigos mestres Renata, Rafael e Paulo. Aos amigos e colegas da UFV, Lizzy, Jaqueline, Toninho, Magno, Aline, Débora, Camila, Rafael, Regina, Luciana, Bruna Mara e Júnia, pela convivência e por todos os momentos de aprendizado e descontração.

Aos professores, da UESB e da UFV, pelos valiosos conhecimentos transmitidos e pelo indispensável serviço dos funcionários.

Durante a fase experimental, na cidade de Braga – Portugal, gostaria de agradecer a todos do Laboratório de Instalações Piloto da UM, aos colegas do Departamento de Química, e aos colegas e amigos da Residência Santa Tecla, Daiane, Mariah e especialmente Bárbara que foi, desde o primeiro momento, companheira, amiga e irmã.

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

RESUMO

COSTA, Angélica Ribeiro da. **Partição de lactoferrina em sistemas aquosos bifásicos**. Itapetinga-BA: UESB, 2010, 56p. (Dissertação – Mestrado em Engenharia de Processos de Alimentos).*

A extração líquido-líquido, usando sistemas aquosos bifásicos, foi empregada para particionar a proteína lactoferrina presente no soro de leite. Para tanto, foram determinados dados de equilíbrio de fases para sistemas aquosos bifásicos compostos por polietileno glicol de massas molares 1000 g.mol^{-1} e 4000 g.mol^{-1} , e sal citrato de sódio, na temperatura de $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, e nos valores de pH da fase salina 5,5, 6,5 e 7,5. Dados do coeficiente de partição da proteína nos diferentes sistemas avaliados foram obtidos. Observou-se que as curvas binodais deslocaram para menores concentrações de polímero e sal com o aumento da massa molar do polímero e do valor de pH. A lactoferrina particionou preferencialmente para a fase inferior, rica em sal.

Palavras-chave: Dados de equilíbrio de fases, lactoferrina, partição de proteína, sistemas aquosos bifásicos.

*Orientadora: Prof^a. D.Sc. Jane Sélia dos Reis Coimbra, UFV e Co-orientador: Prof^o. Ph.D José Antônio Couto Teixeira, UM.

ABSTRACT

COSTA, Angélica Ribeiro da. **Partitioning of lactoferrin in aqueous two-phase systems.** Itapetinga-BA: UESB, 2010, 56p. (Dissertation – Master's degree in Engineering of Process of Foods).⁽¹⁾

The liquid-liquid extraction, using aqueous two phase systems, was employed for partitioning the lactoferrin (Lf) present in bovine whey. To this end, phase diagrams of systems composed of polyethylene (glycol) (molecular weight: 1000 and 4000) + sodium citrate + water were determined at pH 5.5, 6.5 and 7.5, at 298.15 K. The partition coefficient of protein was measured in aqueous two phase systems studied. Binodal curves shifted toward to lower polyethylene and citrate concentrations with the increase in PEG molar and pH value. The obtained data indicates that Lf is preferentially partitioned into the lower phase, rich in salt.

Keywords: Phase equilibrium data, lactoferrin, protein partitioning, aqueous two-phase systems.

⁽¹⁾ Adviser: Jane Sélia dos Reis Coimbra, *D.Sc.*, UFV and Co-adviser Prof^o. *Ph.D* José Antônio Couto Teixeira, UM.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos de Sistemas Aquosos Bifásicos	18
Tabela 2. SAB formados por PEG e sal utilizados na separação de proteínas e enzimas.....	27
Tabela 3. Número de resíduos de aminoácidos da lactoferrina bovina e humana.	30
Tabela 4. Métodos para separação e purificação da lactoferrina.	32
Tabela 5. Parâmetros a , b e c e o coeficiente de determinação (R^2) obtidos para os sistemas PEG e citrato de sódio pela equação de MERCHUK et al. (1998).....	39
Tabela 6. Dados de equilíbrio para os sistemas formados por PEG 1000 e citrato de sódio em diferentes valores de pH, a 25°C.....	40
Tabela 7. Dados de equilíbrio para os sistemas formados por PEG 4000 e citrato de sódio em diferentes valores de pH, a 25°C.....	40
Tabela 8. Valores das inclinações das linhas de amarração observados experimentalmente e os valores calculados pela equação 8.....	43
Tabela 9. Coeficientes de partição e recuperação teórica da lactoferrina e CLA nos sistemas PEG 1000 e citrato de sódio e PEG 4000 e citrato de sódio.	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de fase para sistemas aquosos bifásicos, expresso em coordenadas retangulares.	19
Figura 2. Representação planar parcial da molécula de PEG com os sítios disponíveis para as interações com os demais componentes do sistema.	26
Figura 3. Estrutura tridimensional da lactoferrina bovina a 2,8 Angströms.	29
Figura 4. Diagrama de fases para sistemas PEG1000-citrato de sódio a pH 5,5 (▲), 6,5 (■) e 7,5 (●) e PEG4000-citrato de sódio a pH 5,5 (Δ), 6,5 (□) e 7,5 (○).	38
Figura 5. Efeito do pH nas composições das fases em equilíbrio. PEG1000-citrato de sódio a pH 5,5 (▲), 6,5 (■) e 7,5 (●) e PEG4000-citrato de sódio a pH 5,5 (Δ), 6,5 (□) e 7,5 (○).	41
Figura 6. Efeito da massa molar do PEG na composição das fases em equilíbrio para pH 5,5. PEG1000-citrato de sódio (●) e PEG4000-citrato de sódio (○).	41
Figura 7. Efeito da massa molar do PEG na composição das fases em equilíbrio para pH 6,5. PEG1000 (■) e PEG4000 (□).	42
Figura 8. Efeito da massa molar do PEG na composição das fases em equilíbrio para pH 7,5. PEG1000-citrato de sódio (▲) e PEG4000-citrato de sódio (Δ).	42
Figura 9. CLA dos SAB PEG1000-citrato de sódio a pH 5,5 (▲), 6,5 (■) e 7,5 (●) e PEG4000-citrato de sódio a pH 5,5 (Δ), 6,5 (□) e 7,5 (○), em função ΔP . Δ é a diferença entre as frações mássicas do PEG nas fases em equilíbrio.	43
Figura 10. Distribuição dos coeficientes de partição nos SAB formados por PEG 1000 e PEG 4000 e citrato de sódio.	47
Figura 11. Influência do comprimento da linha de amarração, da massa molar do polímero e do pH sobre o coeficiente de partição da lactoferrina.	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

SAB – Sistemas Aquosos Bifásicos

PEG – Polietileno glicol

K_p – Coeficiente de Partição

Lf – Lactoferrina

LA – Linha de Amarração

CLA – Comprimento da Linha de Amarração

ILA – Inclinação da Linha de Amarração

$[\Delta\text{PEG}]$ – Diferença de concentração de PEG nas fases superior e inferior, % (m/m)

$[\Delta\text{Sal}]$ – Diferença de concentração de sal nas fases superior e inferior, % (m/m)

pI – Ponto Isoelétrico;

W_{FI} – Concentração de equilíbrio da proteína particionada na fase inferior

W_{FS} – Concentração de equilíbrio da proteína particionada na fase superior

CLAE – Cromatografia Líquida de Alto Desempenho

BSA – Albumina de Soro Bovino

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

GMP – Glicomacropéptido

α -Ia – α -lactoalbumina

β -Ig – β -lactoglobulina

MM_s – massa molar da proteína,

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

V^s e V^i – Volume da fase superior e inferior, respectivamente

R – Constante universal dos gases

T – temperatura

ΔG° – Variação da energia livre de Gibbs padrão

ΔH° – Variação da entalpia padrão

ΔS° – Variação da entropia padrão

ρ – densidade, $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$

y_{inf} – Recuperação teórica da proteína na fase inferior, %

Φ_i^s e Φ_i^i – Frações volumétricas do componente “i” na fase superior e inferior, respectivamente

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Extração líquido-líquido.....	15
2.2 Sistemas Aquosos Bifásicos.....	15
2.2.1 Tipos de Sistemas Aquosos Bifásicos.....	17
2.2.2 Aspectos Fundamentais Sobre SAB.....	18
2.2.3 Diagrama de Equilíbrio de Fases	19
2.2.4 Fatores que Influenciam a Formação e Partição em SAB.....	21
2.2.5 Coeficiente de Partição	25
2.2.6 Componentes dos Sistemas	25
2.2.7 Aplicação dos Sistemas Aquosos Bifásicos na Separação de Proteínas	27
2.3 Soro de Leite e suas proteínas.....	28
2.3.1 Lactoferrina.....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 Materiais.....	33
3.2 Determinação dos dados de equilíbrio de fases para o sistema PEG 1000, citrato de sódio, e água e PEG 4000, citrato de sódio, e água, a 25 °C.....	33
3.2.1 Medida do volume das fases	34
3.2.2 Coleta das fases.....	34
3.3 Experimentos com Sistemas Aquosos Bifásicos.....	36
3.3.1 Preparo dos Sistemas Aquosos Bifásicos.....	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 Estudo do efeito da massa molar do polímero e dos valores de pH nos dados de equilíbrio de fase	38
4.2 Coeficiente de partição da Lactoferrina	43
4.2.1 Influência da concentração do polímero, da massa molar e do pH na partição da Lactoferrina.....	47
5. CONCLUSÃO	49
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

1. INTRODUÇÃO

Existe uma grande necessidade de técnicas de biosseparação eficientes, efetivas e econômicas em larga escala, que permitam atingir elevado grau de pureza e rendimento de recuperação, mantendo a atividade biológica da molécula, posto que a maior parte dos custos de produção para um produto biológico reside na estratégia de purificação.

Sistemas aquosos bifásicos (SAB), formados por fases imiscíveis, constituem uma excelente alternativa para separação, concentração e purificação de moléculas bioativas, pois são uma variante da extração líquido-líquido convencional, que favorecem a estabilidade de moléculas com origem em sistemas biológicos. No processamento de bioprodutos sensíveis como proteínas, a extração líquido-líquido com solventes orgânicos tem apresentado aplicação limitada devido à baixa solubilidade das moléculas no solvente e do seu efeito desnaturante.

A utilização dos SAB permite isolar e concentrar moléculas com atividade biológica de misturas complexas, como as proteínas, pois as fases constituídas majoritariamente por água, entre 70% a 90%, oferecem um ambiente adequado e com condições favoráveis à distribuição das mesmas nesses sistemas, além do baixo custo para implementação da técnica e facilidade de aplicação em larga escala.

Os SAB são formados pela mistura de espécies quimicamente distintas em concentrações além das definidas pela zona de transição das fases, sob certas condições de composição e temperatura. Essas espécies podem ser polímeros, como polietileno glicol (PEG) e dextrana (DEX), e sais como o citrato de sódio.

A distribuição do soluto entre as duas fases do sistema pode ser quantificada por meio do coeficiente de partição (K). Vários fatores, tais como temperatura, pH, composição do sistema, presença de sais, massa molar, como também características das proteínas, influenciam na transferência de soluto entre as fases.

Os dados de equilíbrio de fases dos SAB podem ser representados em diagramas de equilíbrio, em temperatura e pressão definidas. A representação dos dados termodinâmicos dos SAB é de grande importância para os estudos de separação de biomoléculas, já que são usados como ferramenta básica de ponto de partida para o desenvolvimento de um processo de extração. Há na literatura diversos dados de equilíbrio para sistemas formados por polímero-polímero, o PEG de diversas massas molares e DEX e polímero-sal, como PEG e sais de fosfato, de sulfato e citrato de sódio. Muitos desses sistemas estão sendo utilizados para a concentração e purificação de proteínas, e um grupo de proteínas que tem merecido destaque são as proteínas do soro de leite, devido seu elevado valor biológico e funcional, tanto tecnológico como em aplicações terapêuticas.

Dentre as proteínas do soro, destaca-se a lactoferrina que encontra aplicação em formulações infantis, iogurtes, suplementos nutricionais, além de cosméticos para cuidados com a pele e dietas especiais de cães e gatos para alívio de inflamações.

Assim, objetivou-se neste trabalho a utilização da lactoferrina (Lf) como modelo de estudo em sistemas aquosos bifásicos, compostos por polietileno glicol e citrato de sódio caracterizados em função da massa molar do polímero, de sua concentração e do pH.

Os objetivos específicos foram: determinar dados de equilíbrio para os sistemas PEG de massas molares 1000 e 4000 e citrato de sódio, nos valores de pH 5,5, 6,5 e 7,5; e determinar dados de coeficiente de partição para a lactoferrina nos sistemas formados por PEG 1000 e PEG 4000 e citrato de sódio, nos valores de pH 5,5, 6,5 7,5.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Extração líquido-líquido

A extração líquido-líquido, chamada algumas vezes de extração com solventes, é a separação dos componentes de uma solução líquida pelo contato com outro líquido imiscível. É uma operação utilizada na indústria química para separação e purificação de componentes metálicos, no refino de derivados do petróleo, na obtenção de produtos farmacêuticos, como a penicilina, e na indústria de alimentos, como por exemplo, na produção de lecitina de soja por extração com acetona, além da aplicação na indústria metalúrgica e de tratamento de resíduos (TREYBAL, 1981).

Esta operação unitária apresenta muitas vantagens, que a torna bastante atrativa como processo de separação, tais como a facilidade na aplicação em larga escala e o fato de normalmente não envolver equipamentos de difícil operação e o uso de energia térmica (MATIASSEN et al., 1987). No processamento de bioprodutos como proteínas, a extração líquido-líquido tem apresentado aplicação limitada devido à baixa solubilidade das moléculas e ao efeito desnaturante dos solventes orgânicos (SUBRAMANIAM, 1998). Além disso, esses solventes normalmente são tóxicos, cancerígenos e inflamáveis. Com o crescimento das indústrias de biotecnologia e química fina gerou-se uma demanda por processos de extração com sistemas não convencionais devido às rigorosas exigências do mercado no tocante a pureza e qualidade dos produtos, muitos deles de elevado valor comercial (COIMBRA, 1995).

Uma variante da extração líquido-líquido tradicional, compatível com os processos de biosseparações, é a partição em SAB, a qual vem sendo usada com sucesso no isolamento de proteínas e de outros biocompostos. Uma das principais vantagens dos SAB é o ambiente aquoso que oferece condições adequadas à distribuição dessas biomoléculas, tais como as proteínas, nas fases, sem que ocorram mudanças na sua conformação e conseqüente perda de atividade biológica (COIMBRA e TEIXEIRA, 2009).

2.2 Sistemas Aquosos Bifásicos

Quando misturadas espécies quimicamente distintas em concentrações além das definidas pela zona de transição de fases, sob condições críticas de composição e temperatura, por exemplo, é formado um sistema com duas fases líquidas imiscíveis, predominando cada um dos componentes numa ou na outra fase. As fases são denominadas aquosas devido à

predominância de água na sua constituição, e por isso, tornam-se um ambiente favorável para biomoléculas (ALBERTSSON, 1986; DA SILVA e LOH, 2006; ZASLAVSKY, 1995).

A maioria dos custos de produção para um produto biológico simples reside na estratégia de purificação. Existe uma grande necessidade de se estabelecer técnicas de biosseparação eficientes, efetivas e econômicas em larga escala, que permitam atingir elevado grau pureza e rendimento de recuperação, mantendo a atividade biológica da molécula. A utilização dos SAB, compatível com os processos de biosseparações, permite isolar moléculas com atividade biológica de misturas complexas, e oferece vantagens como curto tempo de processamento, baixo custo e facilidade de aplicação tanto em escala piloto como em escala industrial (ALBERTSSON, 1986; COIMBRA E TEIXEIRA, 2009; DIAMOND E HSU, 1992; ZASLAVSKY, 1995).

A formação dos SAB foi descrita pela primeira vez no final do século 19. Em 1896, Beijerinck, um microbiologista holandês, descobriu que soluções aquosas de gelatina e agar ou gelatina e amido solúvel, misturadas em uma dada faixa de temperatura e concentração, se separavam em duas fases aquosas, sendo a fase mais densa enriquecida em agar (ou amido) e a fase superior em gelatina, e que a água era o componente majoritário em ambas as fases. Posteriormente, Ostwald e Hertel em 1929, continuaram os estudos sobre esses sistemas e verificaram que amidos provenientes de origens distintas (arroz, milho, etc.), isto é, possuindo diferentes frações de amilose e amilopectina, produziam diferentes diagramas de fase. Esses resultados mostravam a grande influência que pequenas variações nas interações intermoleculares têm sobre as composições das fases em equilíbrio. Com objetivo de verificar uma possível generalidade do fenômeno de separação de fase em sistemas contendo macromoléculas, Dobry e Boyer-Kawenoki, no final da década de 40, estudaram a miscibilidade de um grande número de diferentes pares de polímeros, dissolvidos em solventes orgânicos ou em soluções aquosas. Estes autores constataram que dos 35 pares de macromoléculas estudados, apenas 4 não produziram a formação das duas fases, e puderam concluir que a incompatibilidade entre polímeros era um fenômeno geral (DA SILVA e LOH, 2006; DIAMOND e HSU, 1992).

Depois de 60 anos da descoberta de formação de fases por compostos imiscíveis, Albertsson e sua equipe, em meados da década de 50, desenvolveram várias aplicações no campo de separação por sistemas aquosos bifásicos, propondo a partição e purificação de materiais biológicos (ALBERTSSON, 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 nucléicos, vírus, metais, entre outros (HATTI-KAUL, 2001).

Os SAB 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. Essas fases estão separadas por uma interface que é a região na qual as propriedades termodinâmicas intensivas de cada fase transitam para valores diferentes, sempre tendendo para o valor daquela propriedade no seio da outra fase em equilíbrio (CARVALHO, 2004).

A técnica de separação em SAB é aconselhável para purificação de proteínas em larga escala porque possibilita separação seletiva, uma baixa tensão superficial, boa biocompatibilidade 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 (CASCONI et al., 1991).

2.2.1 Tipos de Sistemas Aquosos Bifásicos

Até o momento, existem duas classes de SAB. Aqueles formados por dois polímeros, como PEG e DEX e aqueles que contêm polímero e sal, como PEG e citrato de sódio. Nestes casos uma das fases é rica em polímero e a outra no outro polímero ou sal (ZASLAVSKY, 1995). Existe uma grande variedade de polímeros hidrofílicos, naturais ou sintéticos, capazes de formar fases quando misturados com um segundo polímero ou com um sal. Os SAB PEG-DEX ou PEG e sais são amplamente utilizados, por se encontrarem disponíveis em grandes quantidades no mercado e não serem tóxicos (SINHA et al. 1996). O sistema polímero-polímero mais comum é composto de dextrana e PEG, mas a dextrana é de custo elevado o que inviabiliza o seu uso em larga escala. 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). Na Tabela 1, encontram-se alguns exemplos de sistemas aquosos bifásicos.

Tabela 1. Exemplos de Sistemas Aquosos Bifásicos

Polímero	Polímero
Polipropileno glicol	Polietileno glicol (PEG) Dextrana (DEX) Polivinil álcool (PVA) Maltodextrina (MD)
Polietileno glicol	Dextrana (DEX) Ficoll Hidroxipropil-amido (HPS) Polivinil alcohol (PVA) Polivinil pirrolidona (PVP) Maltodextrina (MD)
Polímero	Componente de baixa massa molar
Polietileno glicol e copolímeros	Sais inorgânicos: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{NH}_2\text{CO}_2\text{NH}_4$, Na_2HPO_4 , K_2CO_3 , K_3PO_4 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , Na_2SO_4 , Li_2SO_4 , FeSO_4 , $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$
Polietileno glicol	Glicose, maltose
Polipropileno glicol	Sais inorgânicos: K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , Glicerol

Fonte: ZASLAVSKY, 1995.

Apesar da grande variedade de sistemas de duas fases aquosas, a quantidade de sistemas realmente aplicáveis para extração líquido-líquido fica reduzida basicamente aos formados por PEG-sal (fosfato/citrato/sulfato) e PEG-DEX, quando se levam em considerações fatores importantes do ponto de vista industrial, como custo e possibilidade de reciclagem dos reagentes, tempo de separação das fases, possibilidade de esterilização, a toxicidade e faixa de aplicação. Devido a tais fatores, os estudos mais recentes tendem a se concentrar mais nesses dois sistemas, sendo o sistema PEG-sal o mais estudado devido ao seu baixo custo e menor tempo de separação das fases em relação sistema PEG-DEX (COIMBRA, 1995).

2.2.2 Aspectos Fundamentais Sobre SAB

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. (DA SILVA e LOH, 2006).

2.2.3 Diagrama de Equilíbrio de Fases

Os componentes dos sistemas aquosos bifásicos, dois polímeros, ou um polímero e um sal, quando misturados com água, só irão formar fases quando a composição dos constituintes se encontrar acima de determinados concentrações limites (DIAMOND e HSU, 1992). Os diagramas de equilíbrio, ou diagramas de fases, representam graficamente a composição dos constituintes do sistema em temperatura e pressão definidas (OLIVEIRA, 2006). A Figura 1 representa um exemplo de diagrama de fases, mostrando a composição das fases em equilíbrio, em coordenadas retangulares, sendo omitida a concentração do solvente, neste caso a água.

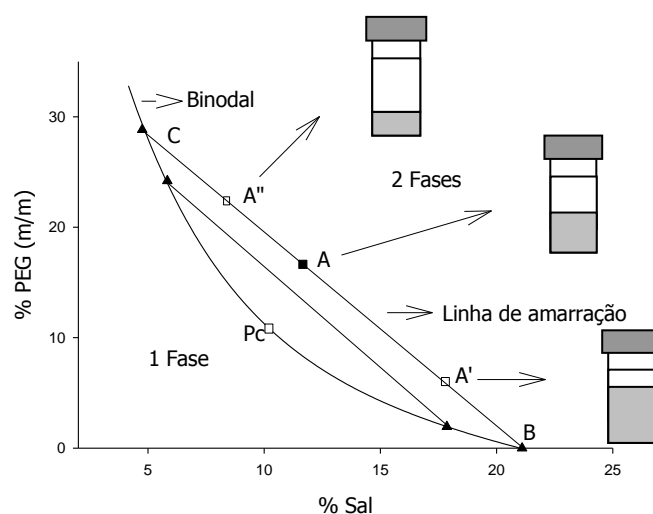


Figura 1. Diagrama de fase para sistemas aquosos bifásicos, expresso em coordenadas retangulares.

O diagrama de fases, representado pela Figura 1, pode ser dividido em duas regiões por uma linha convexa chamada binodal ou curva de equilíbrio. Sistemas cuja composição fica abaixo da binodal formam uma fase somente, enquanto que sistemas cuja composição se situa acima da binodal formam duas fases homogêneas. 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 (ALBERTSSON, 1986).

No diagrama de fases (Figura 1) também estão representadas as linhas de amarração (LA - linha CAB) que, para determinada composição global do sistema (ponto A), fornece a concentração dos solutos nas duas fases em equilíbrio, representadas pelos pontos C (fase superior) e B (fase inferior). Qualquer conjunto de pontos globais ou de mistura (A, A', A'') que pertença à região bifásica e que esteja sobre a mesma LA fornecerá fases superiores que possuirão propriedades termodinâmicas intensivas iguais (composição, 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 LA (ZASLAVSKY, 1995, DA SILVA e LOH, 2006).

Para se estudar a separação de fases em SAB, faz-se uso de uma medida numérica de referência, o comprimento da linha de amarração (CLA), comumente utilizado para medir a diferença das propriedades intensivas entre as fases em equilíbrio. O CLA é determinado considerando a linha de amarração a hipotenusa de um triângulo, em que os catetos são formados pela diferença de concentração dos componentes nas duas fases, podendo ser calculado pela equação 1:

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

em que $[\Delta PEG]$ e $[\Delta Sal]$ correspondem a diferença de concentração de PEG e sal nas fases superior e inferior expressa em % em massa, respectivamente. À medida que aumenta o valor do CLA, torna-se maior a diferença de composição entre as fases, elevando, conseqüentemente, a eficiência da extração e/ou partição do soluto de interesse. Outra característica importante dos diagramas de fases é a inclinação da linha de amarração (ILA). A ILA é uma medida de como a composição das fases pode variar com a alteração de uma propriedade físico-química, como a temperatura e a massa molar, por exemplo, (CARVALHO, 2004). O valor da inclinação pode ser calculado por:

$$ILA = \frac{\Delta PEG}{\Delta Sal} \quad (2)$$

em que $[\Delta PEG]$ e $[\Delta Sal]$ foram definidas acima. Este parâmetro apresenta-se atualmente como uma característica importante dos diagramas de fases uma vez que o seu valor é geralmente constante, quando está presente um SAB de polímeros (ALBERTSSON, 1986) e a sua avaliação, comparação com uma média para um dado sistema e nova medição para valores afastados dessa média é provavelmente o melhor método para obter diagramas de fases confiáveis (ZASLAVSKY, 1995).

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. 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). Este ponto pode ser obtido pela intersecção de uma linha que passa pelo ponto médio de várias linhas de amarração, com a binodal. O ponto limite é o ponto onde a binodal é tangente à linha que une os segmentos iguais

nos eixos do diagrama. A posição relativa do ponto limite e do ponto crítico define a simetria do diagrama de fases. Quando estes dois pontos coincidem o diagrama de fases considera-se simétrico (RODRIGUES, 2001).

2.2.4 Fatores que Influenciam a Formação e Partição em SAB

São diversas as variáveis que influenciam na formação e na partição de biomoléculas dos sistemas bifásicos aquosos. Entretanto, ao se fazer um estudo da partição de biomoléculas é necessário conhecer os dados de equilíbrio para todos os sistemas. Para cada sistema seja polímero/polímero ou polímero/sal existe um diagrama de fases que define as proporções entre os componentes formadores das fases. Alguns desses diagramas estão disponíveis na literatura (ALBERTSSON, 1986; ZASLAVSKY, 1995), porém é importante que ao testar um novo sistema se construa um diagrama nas condições de trabalho a serem utilizadas na extração (temperatura, pH, massa molar do PEG e adição de suspensões biológicas).

A partição de moléculas entre duas fases é um fenômeno complexo devido ao envolvimento de muitos fatores que podem ser inerentes ao próprio sistema (por exemplo: componentes do sistema, massa molar do polímero, concentração do polímero ou do sal, pH e temperatura) ou à biomolécula alvo (por exemplo: hidrofobicidade, distribuição de cargas, conformação (estruturas secundária, terciária e quaternária), tamanho, ponto isoelétrico e massa molar) (COSTA et al., 1998; COSTA et al., 2000; DA SILVA e LOH, 2006; OLIVEIRA et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2003; MADEIRA et al., 2005; 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 da interação entre o soluto particionado e os componentes que formam as fases como ligações de hidrogênio, interações entre cargas, forças de van der Waals, interações hidrofóbicas, efeito estérico e interações iônicas das biomoléculas com as fases do sistema (GÜNDÜZ e KORKMAZ, 2000; HACHEM et al., 1995).

2.2.4.1 Massa molar e concentração do polímero

Os polímeros são conhecidos por terem a capacidade de estabilizar estruturas particuladas e com atividades biológicas (ALBERTSSON, 1986). De uma forma geral, quanto maior for a massa molar do polímero do sistema de duas fases aquosas, para uma determinada composição de fases, tanto menor será a concentração necessária, desse mesmo polímero, para que ocorra separação de fases e, menor será a partição de material biológico para a fase rica em polímero. Quanto maior for a massa molar do polímero, menor será 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 de exclusão) 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., 1994). 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 (ALBERTSSON, 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).

2.2.4.2 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 e LOH, 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).

2.2.4.3 Tipo e Concentração de Sal

ALBERTSSON (1960) observou que a separação de fases em misturas contendo polieletrólitos depende fortemente da força iônica e do tipo de íon presente no sistema. Mais especificamente, verificou-se que a concentração de PEG necessária à separação de fases no sistema, PEG-sulfato de dextrana-água adicionado de sais, dependia do tipo de sal usado. E ainda, que se uma quantidade suficiente de sal fosse adicionada, não seria necessário adicionar PEG ao sistema para que ocorresse a separação das fases. Desta forma, surgiram os primeiros SAB do tipo polímero-sal-água (CARVALHO, 2004).

ZAFARANI-MOATTAR e GASEMI, (2001) investigaram a formação de fases com os seguintes sais: Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 e Na_3PO_4 , todos apresentando o mesmo cátion, porém com ânions de diferentes valência. Os autores verificaram que o aumento da carga do ânion diminui a concentração de sal necessária para a separação de fases. Similar tendência foi observada por ANANTHAPADMANABHAN e GODDARD (1987) para SAB com NaOH, Na_2SO_4 e Na_3PO_4 . A eficiência do ânion na formação de fases foi encontrada na seguinte ordem decrescente: $\text{PO}_4^{-3} > \text{SO}_4^{-2} > \text{OH}^-$. Os autores postularam que ânions com uma maior valência são melhores agentes *salting-out* do que ânions com valência mais baixa, porque o ânion torna-se mais hidratado e assim diminui a quantidade disponível para hidratar o PEG.

Comparando-se sais que contém o mesmo cátion, mas ânions diferentes com mesma carga (NaH_2PO_4 e NaHSO_4), a eficiência é aumentada do sal de sulfato para o sal de fosfato, pois a solubilidade deste em água é mais baixa do que o sal de sulfato (ZAFARANI-MOATTAR e GASEMI, 2001). Em relação aos sais que apresentam o mesmo ânion, mas com cátions monovalentes de diferentes tamanhos (K_2HPO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, Na_2HPO_4), pode-se observar que a região bifásica aumenta quando o tamanho do cátion decresce (ZAFARANI-MOATTAR e GASEMI, 2002). Este comportamento pode ser analisado considerando dois cátions (ou dois ânions) da mesma valência. Considerando dois íons de diferentes raios e, portanto diferentes densidades de carga, o íon de menor raio (e maior densidade de carga) irá interagir com o PEG em maior proporção, favorecendo a interação entre o PEG e o sal, resultando na maior quantidade de sal necessária à saturação da cadeia do polímero e na diminuição da região bifásica (CARVALHO, 2004).

Considerando-se a partição de todas as espécies de moléculas e partículas celulares a composição do sal também deve ser avaliada (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).

2.2.4.4 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). A atração entre as moléculas de PEG aumenta com o aumento da temperatura, enquanto a interação entre as moléculas de PEG e as moléculas de água diminui. Em outras palavras, as moléculas de PEG tornam-se mais hidrofóbicas com o aumento da temperatura, e conseqüentemente as moléculas de PEG podem ser dissolvidas em quantidade de matéria igual a da água. Alguns trabalhos relatam um aumento do coeficiente de partição com a temperatura (JOHANSSON et al., 1984); outros que não há relação entre o coeficiente de partição e a temperatura (TJERNELD et al., 1985), demonstrando a necessidade de estudos mais aprofundados para se esclarecer o efeito deste parâmetro sobre a partição.

2.2.5 Coeficiente de Partição

Em geral, materiais biológicos adicionados em SAB distribuem-se entre as duas fases, sem perda da atividade biológica. A distribuição de proteínas entre as duas fases aquosas dos SAB 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):

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

em que W_{FS} e W_{FI} são as concentrações de equilíbrio da proteína particionada nas fases rica 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:

$$K_p = K_{amb} + K_{est} \quad K_p = K_{amb} + K_{est}$$

(4)

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:

$$\ln_p = \ln K_{el} + \ln K_{hidrof} + \ln K_{hifil} + \ln K_{conf} + \ln K_{lig} \quad (5)$$

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.

2.2.6 Componentes dos Sistemas

2.2.6.1 Polietileno glicol (PEG)

O polietileno glicol, $\text{HO}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{H}$ (Figura 2), 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 são higroscópicos e absorvem quantidades significativas de água quando expostos a alta umidade. Para evitar decomposição oxidativa, antioxidantes são freqüentemente adicionados ao PEG (ALVES, 2003).

A capacidade do PEG em ser solúvel em soluções aquosas e em solventes orgânicos torna-o adequado para derivatização de grupo terminal e de conjugação química com moléculas biológicas sob condições fisiológicas leve. Estudos com solução de PEG mostraram que ele normalmente se liga a 2-3 moléculas de água por unidade de óxido de etileno. Devido à alta flexibilidade da cadeia principal e da ligação com as moléculas de água, a molécula de PEG age como se fosse de cinco a 10 vezes maior do que uma proteína solúvel de peso molecular semelhante. Estes fatores têm sido apontados como a razão para a capacidade do PEG em excluir proteínas e células de superfície e evitar a degradação de células de mamíferos e enzimas (ROBERTS et al., 2002).

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 Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, 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.

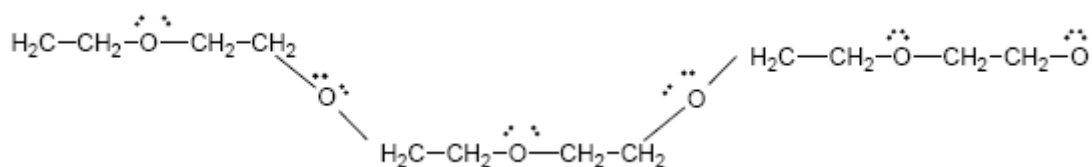


Figura 2. Representação planar parcial da molécula de PEG com os sítios disponíveis para as interações com os demais componentes do sistema.

2.2.6.2 Sal

O citrato de sódio, também chamado de citrato trissódico (C₆H₅O₇ Na₃), 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⁻¹. 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 aquosa de 50 g.L⁻¹ de citrato trissódico dihidratado. É usado em fotografia como agente sequestrante 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 citrato de sódio tem sido usado como substituto dos sais de sulfato e fosfato em sistemas aquosos bifásicos com o PEG, como uma alternativa para sistemas ambientalmente seguros, e muito adequados para extração de materiais biológicos como proteínas (DA SILVA et al., 2009; VERNAU e KULA, 1990; ZAFARANI-MOATTAR e SADEGHI, 2001).

2.2.7 Aplicação dos Sistemas Aquosos Bifásicos na Separação de Proteínas

Os SAB vem sendo empregados com muito sucesso na separação de diversas biomoléculas. Encontram-se na literatura diversos trabalhos que evidenciam o seu potencial de aplicação a nível industrial e que auxiliam a identificar os sistemas mais adequados à separação de certas biomoléculas, a Tabela 2 apresenta algumas proteínas e enzimas separadas por SAB formados por PEG e os tipos de sais mais utilizados.

Tabela 2. SAB formados por PEG e sal utilizados na separação de proteínas e enzimas.

Sais	Biomolécula	Referência
FFP ¹	α - la, β -lg	ALVES et al. 2000; CHEN, 1992; COIMBRA et al., 1994; GIRALDO-ZUNIGA et al., 2005
	BSA, α - la, β -lg	COPEZIO et al., 2005
	BSA, lisozima	CHEN et al., 1999
	CMP ²	DA SILVA et al., 2007
	Fumarase	PAPAMICHEL et al., 1991
	Bromelina e PPO ³	BADU et al., 2008
	β -glucosidase	GAUTAN e SIMON, 2006
	Pectinase	LIMA et al., 2002
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	BSA, β -lg, α -1 antitripsina	BOAGLIO et al., 2006
	Tripsina e α -quimotripsina	TUBIO et al., 2007
	GMP	DA SILVA et al., 2009
$\text{K}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	BSA	YAN-MING et al., 2010
MgSO_4	β -lg, antitripsina, caseína	HARRIS et al, 1997
	Ovomucoide	OLIVEIRA et al., 2009
	Proteinase	KLOMKLAO et al., 2005
Na_2SO_4	Lisozima	SU e CHIANG, 2006
	Lisozima e conalbumina	SOUSA et al., 2009
$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	BSA, tripsina e lisozima	DALLORA et al., 2007

¹Fosfato de potássio, ²Caseinomacropéptido, ³Polifenol oxidase

Devido à atenção que vem sendo dada à produção de proteínas pela engenharia genética e dos diversos meios biológicos ricos nessas biomoléculas, renovaram-se os interesses pelos processos de separação de proteínas e suas descrições quantitativas que servem de base para o “scale up”. Um grupo de proteínas que vem sendo estudado e que tem merecido destaque são as proteínas do soro de leite.

2.3 Soro de Leite e suas proteínas

O substancial poder poluente do soro de leite, com uma demanda bioquímica de oxigênio cerca de 175 vezes maior do que típicos efluentes de esgoto, levou os governos e outras autoridades reguladoras a restringir e/ou proibir o escoamento do soro de leite não tratado. A pressão de comunidades, nomeadamente em áreas regionais, também forçou fábricas de leite a reconsiderar a forma como administram o elevado e crescente volume de soro de leite produzido a partir da fabricação de queijo e da caseína (SMITHERS, 2008). Em 2008, somente no Brasil, foram produzidas 6,3 milhões de toneladas de soro segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (ANUALPEC, 2009). O desenvolvimento científico de abordagens e técnicas modernas ajudou a promover uma maior compreensão em nível molecular das características dos componentes do soro, principalmente proteínas e peptídeos. Esse entendimento foi estendido para um maior conhecimento das interações entre seus componentes, e a influência destas interações na funcionalidade dos mesmos. Em paralelo foram observados também avanços nas tecnologias de processamento de soro, como unidades eficientes e de custo viável para concentração, transformação, fracionamento e desidratação de soro de leite (SMITHERS, 2008).

As proteínas do soro de leite são usadas em formulação de alimentos infantis e alimentos dietéticos devido as suas excelentes propriedades nutricionais e funcionais (tais como emulsificação, gelificação, e capacidade de formar espumas), além disso tem sido relevantes as pesquisas sobre suas propriedades biotecnológicas e médicas (DE WIT, 1998; SMITHERS, 2008). Assim, a utilização do soro de indústrias produtoras de queijo tem a dupla vantagem de reduzir a carga poluente dos efluentes (com todos os benefícios econômicos, diretos e indiretos que podem ser obtidos dessa ação) e da obtenção de produtos de valor agregado.

A fração protéica do soro corresponde a cerca de 20% das proteínas do leite, sendo constituída pelas seguintes proteínas: α -lactoalbumina, β -lactoglobulina, GMP, soroalbumina, imunoglobulinas, lactoperoxidase, lactoferrina e as proteases-peptonas (FOX, 2001).

2.3.1 Lactoferrina

Dentre as proteínas presentes no soro destaca-se a lactoferrina (Lf), a qual foi primeiramente fracionada em 1939 como uma desconhecida fração vermelha do leite de vaca por Sørensen e Sørensen. Desde 1960, quando foi purificada, a proteína vermelha dos leites bovino e humano tem sido assunto em intensos estudos estruturais e funcionais (GROVES, 1960).

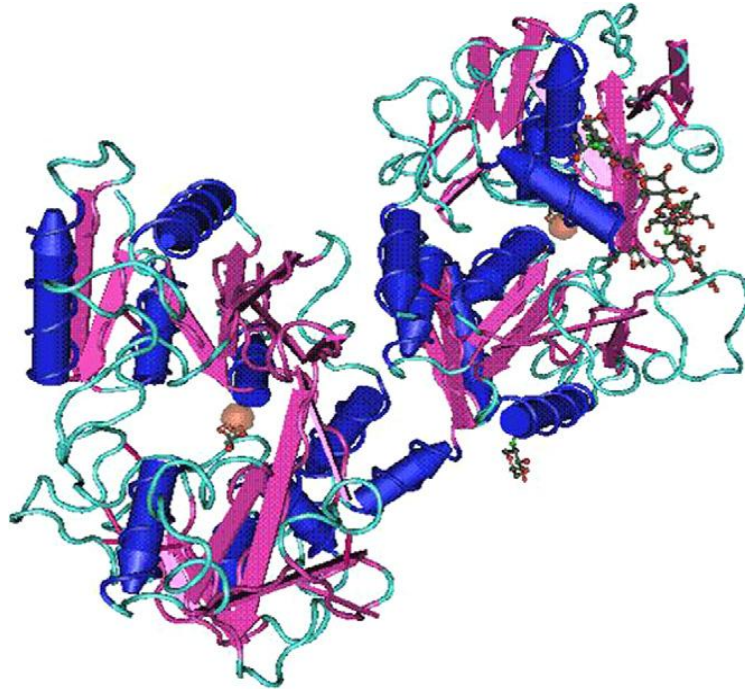


Figura 3. Estrutura tridimensional da lactoferrina bovina a 2,8 Angströms.

A Lf ou lactotransferrina apresenta massa molar de aproximadamente 80 kDa e faz parte de um grupo de proteínas chamadas transferrinas. Essas proteínas são glicoproteínas cuja sequência de aminoácidos consiste de cadeias polipeptídicas simples, contendo 689 resíduos, entre os quais estão presentes todos os essenciais (Tabela 3) com habilidade de se ligarem a íons Fe^{3+} , e concomitante e sinergisticamente a íons carbonato ou normalmente bicarbonato (BAKER, 1994; MOORE et al. 1997; STEIJNS e HOOIJDONK, 2000).

A molécula é dividida em dois lóbulos, N e C, (Figura 3) subdivididos em domínios N1 (1-90; 251-333) e N2 (91-251); C1 (345-431) e C2 (432-592), sendo que a sequência de aminoácidos 334-344 representa a conformação em trílice hélice que une os domínios. Devido a sua capacidade de se ligar reversivelmente aos íons de ferro, ela apresenta duas formas, a hololactoferrina (holo) saturada de ferro, e apolactoferrina (apo), predominantemente encontrada no leite, sem a presença do metal (BAKER, 2005; PIERCE et al. 1991; STEIJNS e HOOIJDONK, 2000). Além do ferro, outros íons metálicos podem se ligar a ela, como o Cu^{2+} ,

Mn³⁺, Co³⁺, Ce⁴⁺ e Zn²⁺ (VAN DER STRATE, 2001). Estudos biofísicos demonstraram que a lactoferrina livre de ferro é menos estável e menos compacta do que a forma ligada ao metal. Também é mais flexível e mais propensa a desnaturação térmica, enquanto a holo é mais rígida e mais estável. Tem caráter altamente básico, provavelmente devido à única região básica N-terminal da molécula. Uma importante consequência dessa propriedade é que a Lf pode se ligar de uma forma “pseudoespecífica” a muitas moléculas ácidas (BROCK, 2002).

Tabela 3. Número de resíduos de aminoácidos da lactoferrina bovina e humana.

	Leite bovino	Leite humano
Ácido aspártico	36	38
Ácido glutâmico	40	42
Alanina	67	63
Arginina	39	39
Asparagina	29	33
Cisteína	34	32
Fenilalanina	27	30
Glicina	48	54
Glutamina	29	27
Histidina	9	9
Isoleucina	15	16
Leucina	65	58
Lisina	54	46
Metionina	4	5
Prolina	30	35
Serina	45	50
Tirosina	22	21
Treonina	36	31
Triptofano	13	10
Valina	47	48
Numero total de resíduos	689	691

Fonte: PIERCE et al., 1991

Curiosamente, a Lf não é encontrada somente no soro de leite, mas também em secreções como a saliva, lágrima, sêmem e secreção vaginal, contudo ela é predominantemente encontrada em produtos de glândulas exócrinas localizadas na entrada dos aparelhos digestivo, respiratório e reprodutivo. Também pode ser encontrada no sangue e plasma derivada de neutrófilos, sendo liberada destas células em resposta a um estímulo inflamatório (BRITIGAN et al., 1994; IYER e LÖNNERDAL, 1993; LEVAY e VILJOEN, 1995; STEIJNS e VAN HOOIJDONK, 2000).

A primeira aplicação da Lf em produtos comerciais foi em suplementação de fórmulas infantis pela Morinaga Milk Industry em 1986. Atualmente, ela é utilizada em alimentos como fórmulas infantis, comprimidos de suplementação alimentar, iogurtes, leite desnatado, bebidas, em alimentos para animais de aquicultura, também para cães e gatos. O efeito esperado nesses produtos é que haja diminuição de infecções, melhoramento da micro-flora intestinal, imunomodulação, alívio em inflamações e atividade antioxidantes. Outras aplicações são em produtos de pele, como loções de limpeza para o rosto e cremes com o objetivo de contribuir para higiene, hidratação, e efeitos antioxidante. Produtos de cuidados orais contendo Lf incluem enxaguantes bucais, géis e pastas de dente e goma de mascar, com a expectativa de contribuir para higiene e hidratação da boca. Além da Lf, produtos de cuidado oral são, muitas vezes, combinados com outras proteínas de defesa da mucosa como lactoperoxidase e lisozima (TOMITA ET AL., 2002; WAKABAYASHI, 2006).

Atualmente, são isoladas e purificadas do leite e soro do leite, 20-30 toneladas de Lf em escala industrial no mundo todo. Como a Lf existe como uma proteína carregada positivamente, no leite e no soro, ela é facilmente adsorvida em colunas com resinas de troca catiônica e depois eluída com soluções salinas. A Lf bruta eluída é, então dessalinizada e concentrada usando membranas de ultrafiltração e diafiltração, a qual está sujeita a uma posterior pasteurização. A Lf em pó purificada com 95% de pureza ou mais é finalmente obtida por liofilização. Em processo alternativo, a microfiltração e secagem em spray-drying são realizadas ao invés de pasteurização e liofilização, respectivamente. Nos últimos anos, a pasteurização tornou-se necessária, não somente para inativar bactérias, mas também vírus como o da febre aftosa (TOMITA ET AL., 2002).

Muitos métodos para isolar a Lf do leite tem sido descritos (GROVES, 1960; WAKABAYASHI et al., 2006) para a separação e purificação da Lf com elevado grau de pureza disponível em escala laboratorial apresentados na Tabela 4. No entanto, quando se trabalha a uma escala industrial estas técnicas são invalidadas devido ao seu elevado custo de processamento, dificuldades em adquirir relevantes graus de pureza e a formação de efluentes indesejáveis (ZYDNEY, 1998).

Tabela 4. Métodos para separação e purificação da lactoferrina.

Cromatografia de filtração em gel	AL-MASHIKHI e NAKAI, 1987
Cromatografia com carboximetilcelulose de troca catiônica	ELAGAMY et al. 1996; YOSHIDA e YE, 1991
Cromatografia de interação hidrofóbica	SHIMAZAKI e NISHIO, 1991
Cromatografia de imunoafinidade	NOOPE et al., 2006
Cromatografia com membrana de adsorção	PLATE et al., 2006
Cromatografia de quelato	AL-MASHIKHI et al., 1988
Membranas de troca catiônica	CHIU e ETZEL, 1997
Processo semibatelada com espuma	SALEH e HOSSAIN, 2001
Purificação por microfiltração de afinidade	CHEN e WANG, 1991
Tecnologia de leito móvel simulado	ANDERSSON e MATTIASSON, 2006

Fonte: RODRIGUES et al., 2009

Neste sentido, a separação em SAB é uma técnica com potencial de aplicação na separação e purificação da Lf, visto que tem se mostrado eficiente na separação de outras proteínas do soro. COIMBRA (1995) e GIRALDO-ZUNIGA et al. (2005) estudaram a separação da α -lactoalbumina e β -lactoglobulina em sistemas formados por PEG e fosfato de potássio. SILVA e MEIRELLES (2000) estudaram a partição da α -la, β -lg e BSA, empregando sistemas PEG e maltodextrina. ISGROVE et al., (1998) também utilizaram sistemas PEG e DEX no fracionamento das protease-peptonas. Estas também foram estudadas em sistemas PEG e Reppal PES 100 (RODRIGUES et al., 2003). A partição do glicomacropéptido (GMP) foi estudada por SILVA et al. (2009) empregando sistemas PEG e citrato de sódio. Além disso, trata-se de uma técnica que fornece um ambiente adequado e com condições favoráveis à distribuição de biomoléculas, baixo custo operacional e facilidade de aplicação em larga escala (ALBERTSSON, 1986; COIMBRA, 1995).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho experimental foi realizado nos laboratórios do Departamento de Engenharia Biológica e Departamento de Química, da Universidade do Minho (UM), Braga-PT.

3.1 Materiais

A lactoferrina utilizada neste trabalho foi adquirida da DMV International Food (USA). Os reagentes utilizados na condução deste trabalho foram: polietileno glicol de massas molares médias $1000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ e $4000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (PEG 1000 e PEG 4000), adquiridos da Sigma Aldrich (USA) e MERCK (Germany), respectivamente, citrato trisódio dihidratado (Riedel-de Haën, Germany), ácido cítrico (Pronalab, Portugal) e ácido sulfúrico (Acros Organic, USA). Nos experimentos foram empregados água ultrapura (sistema Milli-Q, Millipore Inc., USA) e todos os reagentes usados foram de grau analítico, não necessitando de maiores purificações.

Soluções estoques dos reagentes foram preparadas, 50 % m/m dos polímeros e as soluções salinas nos valores de pH 5,5, 6,5 e 7,5, misturando volumes adequados de soluções concentradas ($1,2 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$) de citrato de sódio e ácido cítrico. Para a obtenção das soluções de citrato, a solução de ácido cítrico foi adicionada lentamente a solução salina até alcançado o pH desejado, um pHmetro (CRISON, microTT 2050, Spain) foi utilizado.

3.2 Determinação dos dados de equilíbrio de fases para o sistema PEG 1000, citrato de sódio, e água e PEG 4000, citrato de sódio, e água, a 25 °C

Diagramas de equilíbrio para os SAB PEG 1000-citrato de sódio e PEG 4000-citrato de sódio foram obtidos experimentalmente. Primeiramente, as curvas binodais foram determinadas pelo método turbidimétrico (ALBERTSSON, 1985). Diferentes sistemas bifásicos, com composições conhecidas de polímero e sal, foram preparados, em massa, em tubos de ensaio, com as soluções estoque de PEG 1000 e PEG 4000 e citrato de sódio nos valores de pH requeridos. Os tubos foram vigorosamente agitados em um vórtex e colocados em banho termostático (Grant Instruments, England) a $(25 \pm 0.1) \text{ }^\circ\text{C}$. Quantidades conhecidas de água foram sucessivamente adicionadas ao tubo até que uma fase homogênea fosse obtida. Depois de cada adição de água, os tubos foram agitados e colocados novamente em banho termostático para aferição da separação de fases. Calculou-se então a composição global do sistema considerando a quantidade total de água adicionada. Esta composição define um ponto da binodal. O processo foi repetido até se obterem os pontos suficientes. As curvas binodais foram

determinadas para diversas composições correspondentes a formação dos sistemas homogêneos. As curvas binodais experimentais foram determinadas e ajustadas a equação empírica sugerida por MERCHUK et al. (1998):

$$y = a \cdot \exp(b \cdot x^{0,5} - c \cdot x^3) \quad (6)$$

em que y e x são as composições em fração mássica do polímero e sal, respectivamente, a , b e c são parâmetros de ajuste da equação.

Três linhas de amarração foram determinadas para cada sistema PEG-sal. Os pontos que deram origem as linhas de amarração foram obtidos para cada condição de pH com composições conhecidas, em tubos de centrífuga graduados de fundo cônico, a partir da massa das soluções estoques de PEG e sal. A mistura foi agitada vigorosamente e então centrifugada (HERME Z36HK, Germany) a 1470 g por 10 minutos, a ± 23 °C, para acelerar a formação de fases. Os tubos foram mantidos em repouso, em banho termostático a $25 \pm 0,1$ °C, por um período de 20 horas. Todas as soluções e diluições foram preparadas cuidadosamente e usando uma balança analítica com precisão de $\pm 0,0001$ g (OHAUS, Explorer Pro Model EP214DC, Switzerland).

3.2.1 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.

3.2.2 Coleta das fases

Após 20 horas, atingido o equilíbrio, as duas fases límpidas serem observadas, a fase superior foi coletada com o auxílio de uma micropipeta (ORANGE Scientific, Belgium) 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.

3.2.3 Quantificação dos componentes do sistema

O citrato de sódio foi quantificado usando um cromatógrafo líquido de alto desempenho (CLAE, Knauer). Alíquotas de 20 µL das fases previamente diluídas foram manualmente injetadas. A coluna utilizada foi a Varian MetaCarb 67H (300x6,5 mm), para ácidos orgânicos, empregando-se ácido sulfúrico 0,01 N como fase móvel, em condições isocráticas, e fluxo de 0,7 mL.min⁻¹, à temperatura de 60 °C. A detecção do citrato foi monitorada por detectores UV (Jasco) a 210 nm. O tempo de corrida foi de 10 min. A concentração foi calculada por uma curva de calibração.

A concentração de PEG em cada fase constituinte dos SAB foi determinada usando medidas de índice de refração (Bellingham+Stanley Limited, England). Inicialmente foram preparadas soluções de PEG 1000 e PEG 4000 com concentrações conhecidas (entre 1 % e 50 % em massa) para a construção da curva analítica. Como o índice de refração é aditivo, a concentração do PEG nas fases foi determinada depois de corrigida a contribuição do citrato. A correção foi feita, através de uma curva de calibração do citrato de sódio com concentrações conhecidas (entre 0,05 M e 1 M). Conhecidas as concentrações de citrato de sódio nas fases dos sistemas pelo método cromatográfico citado acima, obteve-se com a curva analítica, o índice de refração do sal. Esses valores foram, então, utilizados como o termo independente da curva analítica construída para os polímeros.

A concentração de água presente nas fases foi determinada por balanço de massa subtraindo a quantidade total dos componentes adicionados pela quantidade de PEG e de sal presentes no sistema. O balanço de massa aplicado para as linhas de amarração foi dado pela relação:

$$M_G = M_S + M_I \quad [7]$$

em que M é a massa e os subscritos G , S e I indicam o ponto global e as fases superior e inferior, respectivamente.

3.3 Experimentos com Sistemas Aquosos Bifásicos

Os dados de equilíbrio para os estudos de partição da lactoferrina utilizados foram os diagramas de fases compostos por PEG 1000 e PEG 4000, citrato de sódio e água obtidos nesse trabalho, a 25 °C, em função da massa molar do PEG e dos valores de pH 5,5, 6,5 e 7,5. As análises foram conduzidas em duplicata com duas repetições.

3.3.1 Preparo dos Sistemas Aquosos Bifásicos

Sistemas aquosos bifásicos foram obtidos pela mistura de solução estoque de PEG 1000 e PEG 4000 (50 % em massa) e do sal citrato de sódio nos valores de pH desejados (5,5; 6,5; 7,5), pela mistura de volumes adequados de soluções concentradas ($1,2\text{mol.kg}^{-1}$) de citrato de sódio e ácido cítrico.

Os sistemas foram preparados adicionando, em tubos de centrífuga graduados, quantidade adequada das soluções estoques de PEG e sal de forma a se obter uma massa total 5 g. A quantidade de lactoferrina adicionada foi de 10% em massa relativa à massa de cada sistema, a partir de uma solução 5 g.L^{-1} da proteína, ou seja, para sistemas de 5 g, adicionou-se 0,5 g da solução da proteína. O sistema resultante foi misturado, manualmente, por aproximadamente 1 minuto, e logo após centrifugada a 1470 g por 10 minutos, a 25 °C para acelerar o processo de separação das fases. Na seqüência, os tubos foram mantidos em repouso por um período de 20 horas em banho termostático, a $25\text{ °C} \pm 0,1\text{ °C}$.

A medida do volume das fases foi feita seguindo o procedimento descrito no item 3.2.2

3.3.2 Quantificação da proteína

A concentração de proteína em cada fase foi determinada pelo método de BRADFORD (1976), com uma solução disponível comercialmente como Coomassie Plus (Pierce, USA), em microplacas (NUNC, Denmark), com leitor de microplacas (Spectrophotometer Varian Cary 50, USA). Uma curva analítica foi construída a partir de solução de lactoferrina pura em diferentes concentrações, e para corrigir a interferência do citrato e do PEG, as amostras foram diluídas e lidas contra o branco de mesma composição das fases.

O método de Bradford é uma técnica para a determinação de proteínas totais que utiliza o corante de "Coomassie brilliant blue" BG-250. Este método é baseado na interação entre o corante BG-250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de elevada massa molar e o

corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm (COMPTON, 1985).

3.3.3 Cálculo do coeficiente de partição

A distribuição da lactoferrina nas fases do sistema foi determinada a partir do coeficiente de partição, descrito pela equação 3, na seção 2.2.5, e utilizado para quantificar o grau de separação alcançado em um processo de extração. Para selecionar os SAB com melhor capacidade de purificação da lactoferrina, foi calculada uma recuperação teórica (y , %) nas fases superior e inferior respectivamente, por meio da seguinte Equação (PICÓ, 2006):

$$y(\%) = \frac{100}{1 + (1/RK_p)} \quad (8)$$

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

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudo do efeito da massa molar do polímero e dos valores de pH nos dados de equilíbrio de fase

Dados de equilíbrio de fases para os diferentes SAB foram obtidos em função da massa molar do polímero e dos valores de pH do sistemas. Os diagramas de fases foram determinados para PEG 1000 e PEG 4000 e estão representados na Figura 4. Os dados experimentais obtidos por turbidimetria para obtenção das curvas binodais dos sistemas foram correlacionados pela equação não linear (equação 6) desenvolvida por MERCHUK et al. (1998), a qual tem sido utilizada com sucesso por outros pesquisadores (HUDDLESTON et al., 2003; SILVÉRIO et al., 2008; ZAFARANI-MOATTAR e TOLOUEI, 2008). Os valores obtidos para os parâmetros a , b e c pela equação 6 com os correspondentes desvios padrão para os sistemas investigados estão apresentados na Tabela 5. Com base nos desvios padrões obtidos, conclui-se que os dados experimentais se ajustaram satisfatoriamente a equação. A Figura 4 apresenta a comparação entre as curvas binodais experimentais e correlacionadas, mostrando o bom ajuste a equação.

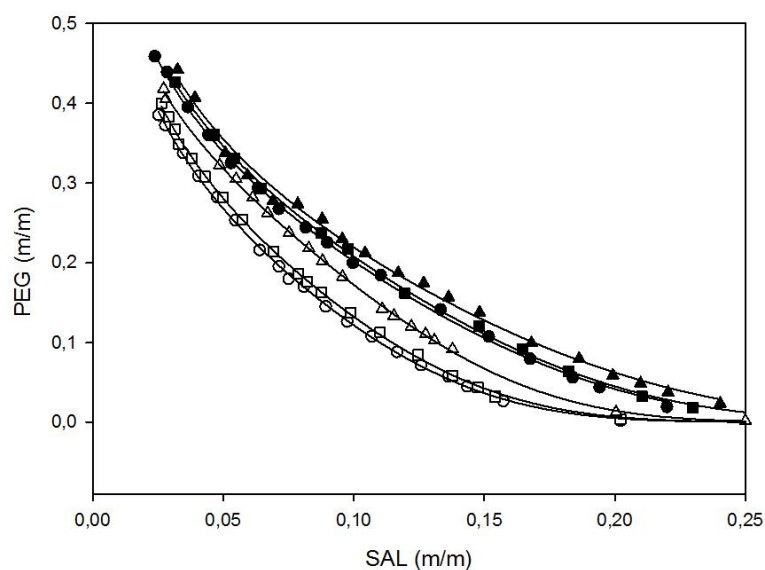


Figura 4. Diagrama de fases para sistemas PEG1000-citrato de sódio a pH 5,5 (\blacktriangle), 6,5 (\blacksquare) e 7,5 (\bullet) e PEG4000-citrato de sódio a pH 5,5 (\triangle), 6,5 (\square) e 7,5 (\circ).

Pode ser observado na Figura 4, que as curvas binodais tornam-se mais assimétricas, e deslocam-se para concentrações menores de PEG e sal com o aumento da massa molar do polímero. Esse comportamento é atribuído a diminuição de solubilidade do PEG em água, que

aumenta com a elevação da sua massa molar, por isso, menores concentrações são requeridas para separação de fases. A fase rica em PEG satura-se em concentrações relativamente baixas com o aumento da massa molar do polímero. Essa tendência está de acordo com resultados experimentais encontrados na literatura (SILVA et al., 1997; ZAFARANI-MOATTAR e SADEGHI, 2001; OLIVEIRA et al., 2008).

A influência do pH também pode ser observada no comportamento das curvas binodais. Para os diferentes valores de pH estudados o formato se manteve constante. Com o aumento do pH, a curva é deslocada em direção a concentrações mais baixas de PEG e sal, aumentando assim, a região de separação de fases. Esse efeito é mais pronunciado quando o pH muda de 5,5 para 6,5, principalmente para PEG 4000. Quando as concentrações de PEG e citrato de sódio assumem valores intermediários na curva binodal, uma menor concentração de citrato é necessária para separação de fase a valores de pH mais elevados, pois haverá maiores proporções de íons de citrato trivalentes do que divalentes ($pK_a = 6,4$). ANANTHAPADMANABHAN E GODDARD (1987) postularam que ânions com uma maior valência são melhores agentes *salting-out* do que ânions de valência mais baixa, porque quanto maior a valência, o ânion torna-se mais hidratado e, assim, diminui a quantidade de água disponível para hidratar o PEG. Essa mesma tendência foi observada por ZAFARANI-MOATTAR E SADEGHI (2001) ao investigar o efeito dos sais NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 e Na_3PO_4 em curvas binodais.

Tabela 5. Parâmetros a , b e c e o coeficiente de determinação (R^2) obtidos para os sistemas PEG e citrato de sódio pela equação de MERCHUK et al. (1998).

pH	a	b	c	R^2
PEG 1000				
5,5	$0,8871 \pm 0,018$	$-4,2215 \pm 0,099$	$146,4654 \pm 7,695$	0,9992
6,5	$0,9326 \pm 0,049$	$-4,2620 \pm 0,226$	$99,9276 \pm 11,486$	0,9956
7,5	$0,8982 \pm 0,029$	$-4,1832 \pm 0,143$	$140,5765 \pm 8,327$	0,9993
PEG 4000				
5,5	$0,8928 \pm 0,019$	$-5,1887 \pm 0,1096$	$352,2954 \pm 14,043$	0,9995
6,5	$0,9035 \pm 0,022$	$-5,0434 \pm 0,1257$	$327,1447 \pm 16,215$	0,9994
7,5	$0,8066 \pm 0,031$	$-4,0072 \pm 0,081$	$276,6556 \pm 9,014$	0,9997

As composições de equilíbrio para os sistemas estudados contendo PEG 1000 e PEG 4000 e citrato de sódio estão apresentados nas Tabelas 6 e 7, respectivamente, em que os dados referentes aos componentes das fases estão expressos em termos de fração mássica. Três linhas de amarração foram determinadas para os valores de pH estudados. Os dados de equilíbrio de composição de fase estão representados nas Figuras 5, 6, 7 e 8.

Tabela 6. Dados de equilíbrio para os sistemas formados por PEG 1000 e citrato de sódio em diferentes valores de pH, a 25°C.

LA	Composição Global		Fase Superior		Fase Inferior	
	Sal (m/m)	PEG (m/m)	Sal (m/m)	PEG (m/m)	Sal (m/m)	PEG (m/m)
pH = 5,5						
1	0,1400	0,1700	0,0885	0,2453	0,2291	0,0364
2	0,1500	0,1800	0,0661	0,3103	0,2903	0,0081
3	0,1600	0,1900	0,0598	0,3553	0,3117	0,0019
pH = 6,5						
1	0,1300	0,1800	0,0652	0,2974	0,2522	0,0115
2	0,1400	0,1900	0,0498	0,3408	0,2939	0,0026
3	0,1500	0,2000	0,0460	0,3776	0,3126	0,0012
pH = 7,5						
1	0,1200	0,1900	0,0682	0,2866	0,2206	0,0254
2	0,1300	0,2000	0,0520	0,3363	0,2893	0,0026
3	0,1400	0,2100	0,0427	0,3732	0,3027	0,0013

Tabela 7. Dados de equilíbrio para os sistemas formados por PEG 4000 e citrato de sódio em diferentes valores de pH, a 25°C.

LA	Composição Global		Fase Superior		Fase Inferior	
	Sal (m/m)	PEG (m/m)	Sal (m/m)	PEG (m/m)	Sal (m/m)	PEG (m/m)
pH = 5,5						
1	0,1000	0,1400	0,0513	0,2220	0,1822	0,0013
2	0,1050	0,1600	0,0399	0,2723	0,2068	0,0003
3	0,1100	0,1800	0,0325	0,2978	0,2372	0,0000
pH = 6,5						
1	0,1100	0,1400	0,0506	0,2430	0,2158	0,0018
2	0,1150	0,1600	0,0403	0,2653	0,2255	0,0005
3	0,1200	0,1800	0,0311	0,3013	0,2599	0,0000
pH = 7,5						
1	0,1200	0,1700	0,0494	0,2714	0,2265	0,0048
2	0,1250	0,1800	0,0445	0,3108	0,2492	0,0015
3	0,1300	0,1900	0,0411	0,3542	0,2805	0,0002

Para a maioria dos sistemas, a concentração de PEG na fase inferior é muito baixa, e em alguns casos, o PEG é quase que totalmente excluído dessa fase, enquanto que o comportamento contrário é observado na fase superior. Efeito similar foi observado para SAB formados por PEG e citrato (OLIVEIRA et al., 2008).

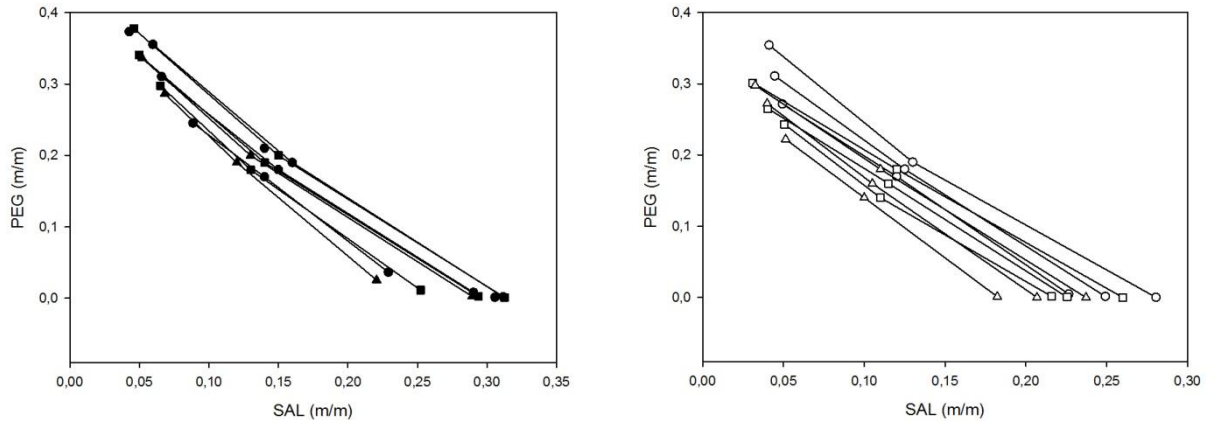


Figura 5. Efeito do pH nas composições das fases em equilíbrio. PEG1000-citrato de sódio a pH 5,5 (▲), 6,5 (■) e 7,5 (●) e PEG4000-citrato de sódio a pH 5,5 (Δ), 6,5 (□) e 7,5 (○).

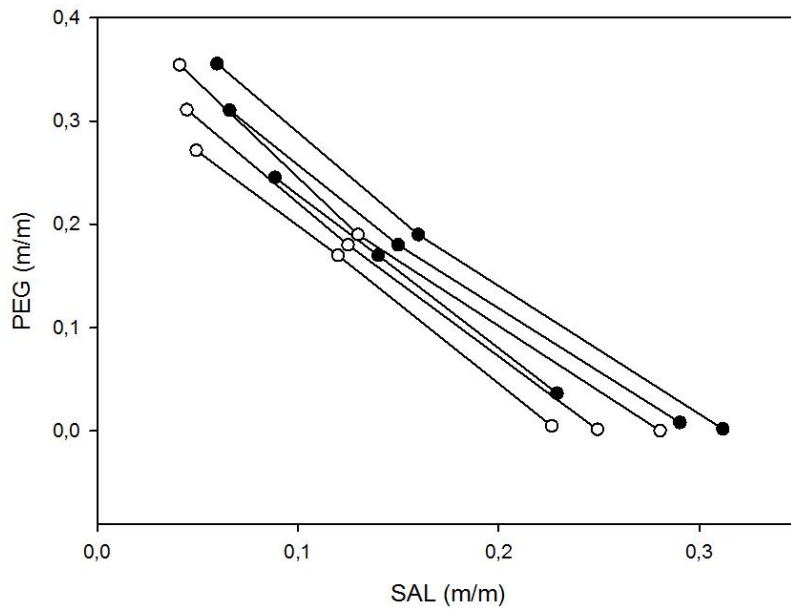


Figura 6. Efeito da massa molar do PEG na composição das fases em equilíbrio para pH 5,5. PEG1000-citrato de sódio (●) e PEG4000-citrato de sódio (○).

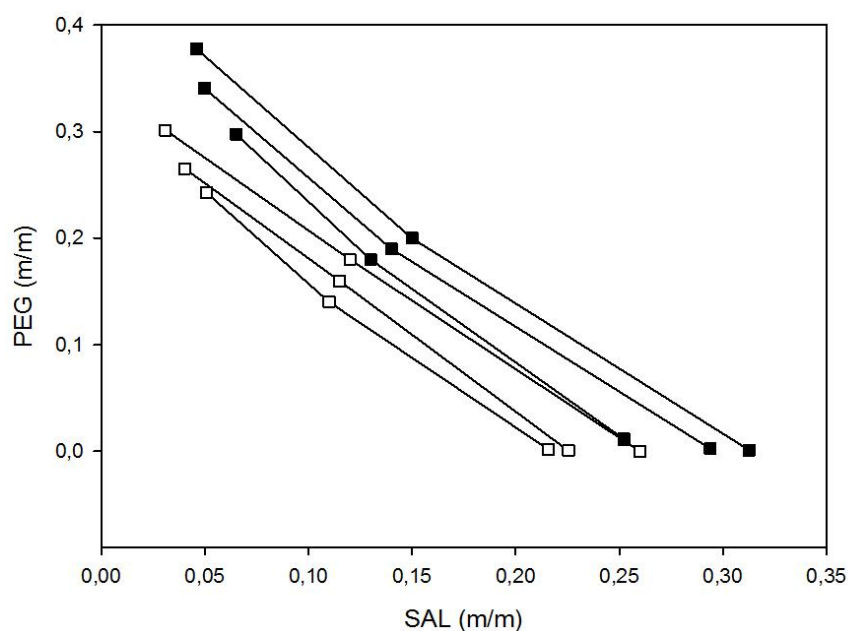


Figura 7. Efeito da massa molar do PEG na composição das fases em equilíbrio para pH 6,5. PEG1000 (■) e PEG4000 (□).

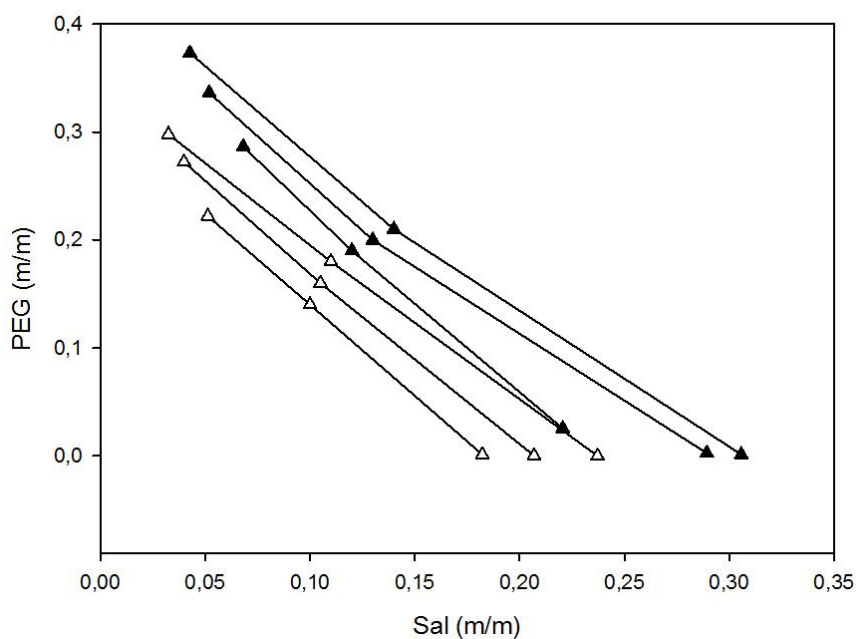


Figura 8. Efeito da massa molar do PEG na composição das fases em equilíbrio para pH 7,5. PEG1000-citrato de sódio (▲) e PEG4000-citrato de sódio (△).

ALBERTSSON foi o primeiro a relatar que as ILA são usualmente constantes para dados de SAB. A equação 8, proposta por MADEIRA et al. (2008), indica que há uma relação linear entre a variação de um componentes do sistemas (nesse caso, PEG), com o CLA, desde que as ILA sejam constantes.

$$CLA = \left[1 + \left(\frac{1}{ILA} \right)^2 \right]^{1/2} \Delta P_1 \quad (8)$$

em que ΔP_1 é a diferença entre as frações mássicas dos componentes do sistema, podendo ser o polímero ou o sal.

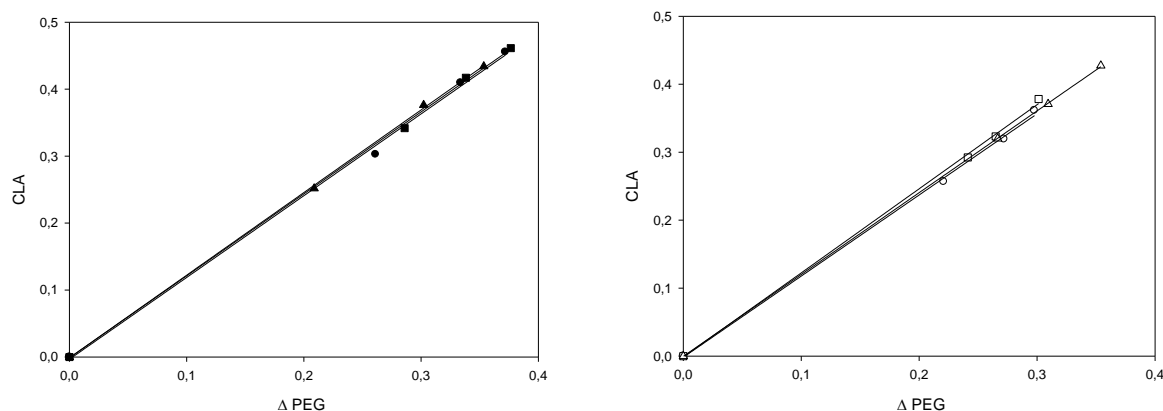


Figura 9. CLA dos SAB PEG1000-citrato de sódio a pH 5,5 (\blacktriangle), 6,5 (\blacksquare) e 7,5 (\bullet) e PEG4000-citrato de sódio a pH 5,5 (\triangle), 6,5 (\square) e 7,5 (\circ), em função ΔP . Δ é a diferença entre as frações mássicas do PEG nas fases em equilíbrio.

Os dados experimentais estão representados na Figura 9 para os sistemas aquosos bifásicos formados por PEG 1000 e 4000 e citrato de sódio, e os diferentes valores de pH, e, na Tabela 8, são apresentados os valores das inclinações das curvas lineares observadas experimentalmente e os preditos por essa equação. Observa-se pouca variação entre esses valores, confirmando que a equação proposta é uma forma simplificada de demonstrar a relação linear entre o comprimento da linha de amarração e a variação dos componentes das fases, sendo a ILA constante.

Tabela 8. Valores das inclinações das linhas de amarração observados experimentalmente e os valores calculados pela equação 8.

pH	PEG 1000		PEG 4000	
	Dados exper.	Valor calc.	Dados exper.	Valor calc.
5,5	$1,2346 \pm 0,018$	$1,2262 \pm 0,020$	$1,2378 \pm 0,027$	$1,2022 \pm 0,006$
6,5	$1,2216 \pm 0,038$	$1,2179 \pm 0,020$	$1,2038 \pm 0,005$	$1,2293 \pm 0,002$
7,5	$1,2246 \pm 0,021$	$1,2032 \pm 0,039$	$1,1939 \pm 0,030$	$1,1830 \pm 0,007$

4.2 Coeficiente de partição da Lactoferrina

Na tabela 9, estão apresentados os valores dos coeficientes de partição e os valores de recuperação teórica (%) da lactoferrina na fase inferior, para os sistemas aquosos bifásicos formados por PEG de diferentes massas molares (1000 e 4000) e citrato de sódio, nos valores de

pH 5,5, 6,5, 7,5, a temperatura de 25 °C. Observa-se que os valores de recuperação teórica são elevados para todos os sistemas avaliados. Podendo concluir que os sistemas formados por PEG e citrato de sódio avaliados neste trabalho são adequados para concentração da Lf na fase inferior, uma vez que os coeficientes de partição são menores que a unidade. Com o aumento na massa molecular média, os sistemas formados por PEG 4000 apresentam viscosidade maior que aqueles formados por PEG 1000. Dessa forma, recomenda-se o uso, em escala industrial, dos sistemas contendo PEG 1000, com o objetivo de tentar reduzir os gastos energéticos com maiores potência de bombas e agitadores para movimentar esses sistemas.

Tabela 9. Coeficientes de partição e recuperação teórica da lactoferrina e CLA nos sistemas PEG 1000 e citrato de sódio e PEG 4000 e citrato de sódio.

pH	PEG 1000			PEG 4000		
	CLA	Kp	y _{inf} (%)	CLA	Kp	y _{inf} (%)
5,5	0,252	0,017	97,69 ± 0,250	0,320	0,001	99,84 ± 0,053
	0,376	0,018	97,69 ± 0,024	0,371	0,013	98,38 ± 0,353
	0,434	0,019	97,59 ± 0,059	0,427	0,019	97,51 ± 0,010
6,5	0,342	0,025	96,90 ± 0,501	0,292	0,002	99,78 ± 0,033
	0,417	0,030	95,71 ± 0,576	0,323	0,002	99,73 ± 0,039
	0,461	0,020	97,34 ± 0,388	0,378	0,013	98,33 ± 0,207
7,5	0,302	0,021	96,31 ± 0,168	0,257	0,011	98,32 ± 0,003
	0,409	0,028	94,80 ± 0,764	0,319	0,011	98,48 ± 0,055
	0,455	0,030	95,53 ± 0,345	0,361	0,009	98,72 ± 0,057

O comportamento de partição dos solutos nos SAB 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 SAB com o soluto que particiona também determinam o comportamento de transferência. Essas interações são expressas no parâmetro termodinâmico denominado energia livre de Gibbs padrão (ΔG°). A avaliação de ΔG° em termos de processos moleculares é uma tarefa bastante complexa, pois envolve parâmetros de interações intermoleculares, ΔH° , e variáveis configuracionais, ΔS° , ambos relacionados à ΔG° 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 Lf nos SAB 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 SAB.

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 Lf é dada pela equação:

$$\ln K_p = \frac{MM_s}{\rho} \left(\frac{n^s}{V^s} - \frac{n^i}{V^i} \right) \quad (9)$$

em que K_p representa o coeficiente de partição da Lf, MM_s a massa molar da proteína, ρ 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 Lf 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 $\left(\frac{n}{V}\right)$ 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 SAB 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 SAB (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 Lf, segundo o modelo proposto por JOHANSSON et al., (1998) é dada pela Equação:

$$\ln K_p = -\frac{MMs}{RT} \left[\sum_{i=1(i \neq p)}^3 (\phi_i^S - \phi_i^I) \varepsilon_{ip} - \sum_{i=1(i \neq p)}^2 \sum_{j=i+1(j \neq p)}^3 (\phi_i^S \phi_j^S - \phi_i^I \phi_j^I) \varepsilon_{ij} \right] \quad (10)$$

em que ϕ_i^S e ϕ_i^I as frações volumétricas do componente “i” na fase superior e inferior, respectivamente.

A equação 10 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 Lf com todos os componentes presentes nas duas fases dos sistemas, em que ε_{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 Lf interaja mais entalpicamente, isto é, tenha o valor de ε_{ip} mais negativo (ou menos positivo). O segundo termo na equação 10 representa diferença de conteúdo entálpico de cada fase resultante das interações entre todos os diferentes componentes que formam cada uma das distintas regiões dos SAB, 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 Lf entre essas fases implica necessariamente na quebra e formação de novas interações. Assim a inserção da Lf 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 Lf 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. 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.

Nos sistemas estudados, formados por PEG e citrato de sódio, a Lf apresentou forte tendência em se transferir para a fase inferior, com valores de K_p muito menores que a unidade. A fase inferior é rica em sal e possui maior densidade numérica, assim, provavelmente a força motriz que governou o processo de transferência da Lf foi a entropia.

4.2.1 Influencia da concentração do polímero, da massa molar e do pH na partição da Lactoferrina

A Figura 10, mostra o efeito da massa molar do polímero na partição da Lf, em SAB formados por PEG 1000 e 4000 e citrato de sódio, nos valores de pH 5,5, 6,5, 7,5. Pode ser observado que a partição da proteína é dependente da massa molar do PEG. Houve uma diminuição no coeficiente de partição com o aumento da massa do polímero, como observado por outros autores (HUDDLESTON et al., 1996; JOHANSSON et al., 1998; BOAGLIO et al., 2006; DA SILVA et al., 2009). Esse comportamento está de acordo com o efeito do volume de exclusão devido à diminuição do volume livre disponível e a redução da solubilidade da proteína na fase superior, rica em PEG. A alta afinidade da proteína pela fase rica em citrato de sódio foi também observada por BOAGLIO et al. (2006), no estudo de partição da BSA, β -lg e α -antitripsina em sistemas PEG e citrato de sódio.

Em relação aos aspectos termodinâmicos, com o aumento da cadeia polimérica, ocorre a diminuição do efeito entálpico sobre a partição da Lf. O aumento no grau de polimerização do polímero formador do SAB diminui a entropia configuracional da fase enriquecida pelo mesmo, reduzindo o valor da entropia de transferência para esta fase, ou seja, o aumento da cadeia aumenta a diferença de entropia entre as fases do sistema, e seu efeito sobre a partição torna-se mais pronunciado.

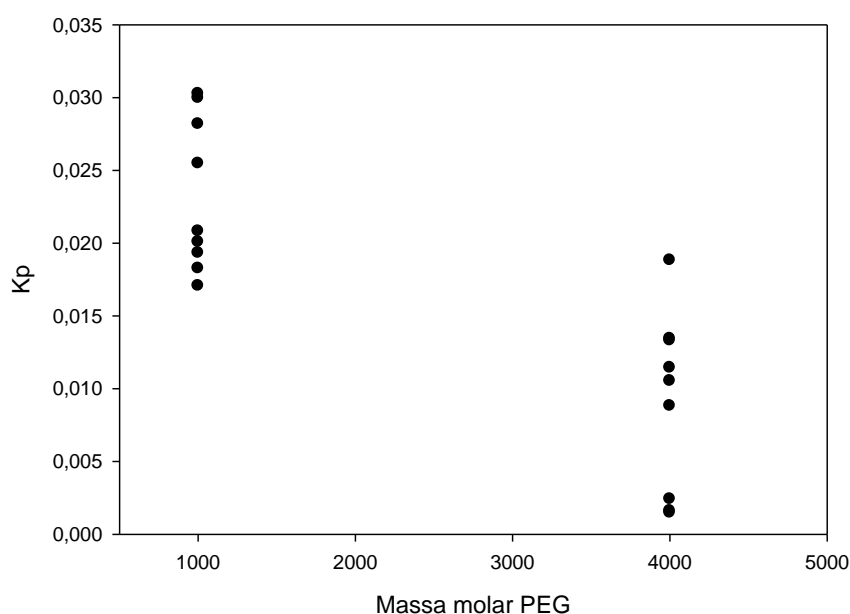


Figura 10. Distribuição dos coeficientes de partição nos SAB formados por PEG 1000 e PEG 4000 e citrato de sódio.

O efeito do comprimento da linha de amarração na partição da Lf nos sistemas estudados é apresentado na Figura 11. Com o aumento do CLA, houve uma maior partição da proteína para a

fase inferior nos sistemas formados por PEG 4000, nos valores de pH 5,5 e 6,5. À medida que aumenta a composição de PEG e sal, o número de unidades de polímeros envolvidos na separação da proteína também aumenta, resultando em um maior coeficiente de partição, ou seja, uma maior transferência de proteína para a fase PEG devido à interação hidrofóbica entre a proteína e o PEG. Além disso, ocorre um aumento na força iônica devido às maiores concentrações de sal, ocasionando uma maior transferência da proteína para fase rica em PEG, com conseqüente efeito de repulsão eletrostática (SARAVANAN et al. 2007; OLIVEIRA et al., 2008; DA SILVA et al., 2009; SOUSA et al., 2009;). No valor de pH 7,5, a interação da proteína com os componentes das fases indicou que a composição dos sistemas não afetou o valor de K_p .

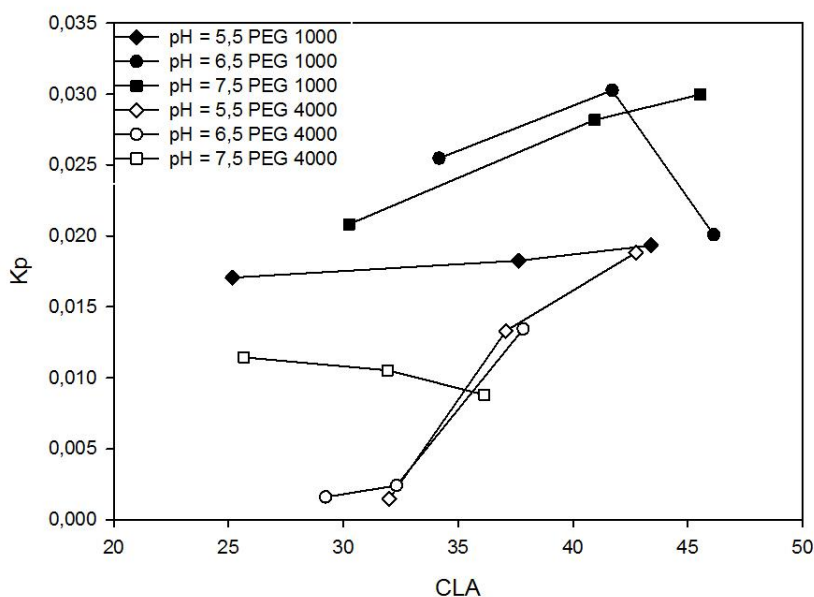


Figura 11. Influência do comprimento da linha de amarração, da massa molar do polímero e do pH sobre o coeficiente de partição da lactoferrina.

Como pode ser observado, para os SAB formados por PEG 1000, o aumento da composição das fases não influenciou significativamente no coeficiente de partição da proteína nos diferentes valores de pH estudados. Além da menor viscosidade dos sistemas formados por PEG 1000, como já mencionado, outro fato que corrobora a escolha desse sistema para escala industrial é que, assim como nos sistemas com o polímero de maior massa molar, a lactoferrina tende a particionar preferencialmente para a fase rica em sal, porém as condições de trabalho referentes ao pH e a composição dos sistemas são mais amplas, uma vez que pouco afetam o K_p .

5. CONCLUSÃO

Dados de equilíbrio para sistemas aquosos bifásicos formados por PEG 1000 e citrato de sódio e PEG 4000 e citrato de sódio foram determinados nos valores de pH 5,5, 6,5 e 7,5.

Para os sistemas formados por PEG 1000 e PEG 4000 e citrato de sódio, as curvas binodal apresentaram a mesma forma nos valores de pH estudados.

Observou-se, de uma forma geral, um deslocamento da região bifásica para a menores concentrações de polímero e sal com o aumento da massa molecular do PEG. Este comportamento era o esperado, pois quanto maior a massa molar do polímero, menor é a quantidade de sal necessária à formação do sistema aquoso bifásico.

A partição da lactoferrina nos sistemas aquosos bifásicos analisados neste trabalho se deu, preferencialmente, para a fase inferior, rica em sal. A força motriz dessa transferência é provavelmente de natureza entrópica.

Recomenda-se o uso dos SAB contendo PEG 1000, em escala industrial, para separação da lactoferrina, devido a menor viscosidade e amplas faixas de trabalho para os valores de pH e composição das fases estudados.

Devido às características da lactoferrina e de suas aplicações terapêuticas, este trabalho é de relevante importância para os processos de biosseparação, uma vez que não há na literatura, dados de partição em sistemas aquosos bifásicos para essa proteína.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTSSON, P.A. **Partition of cell and macromolecules**. New York: John Wiley, 1986.
- 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.
- ALVES, J. G. L. F., CHUMPITAZ, L. D. A., FRANCO, T. T., MEIRELES, 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.
- ANANTHAPADMANABHAN, K. P.; GODDARD, E. D. Aqueous biphasic formation in polyethylene oxide-inorganic salt systems. **Langmuir**. v. 3, p. 25-31, 1987.
- ANUALPEC, **Anuário da pecuária brasileira**, São Paulo: Argra CNP Pesquisas LTDA. 2009.
- ASENJO, J. A. **Separation Processes in Biotechnology**. Marcell Dekker Inc., New York, 1990.
- BABU, B. R.; RASTOGI, N.K.; RAGHAVARAO, K.S.M.S. Liquid–liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase system. **Chemical Engineering and Processing**. v. 47, p. 83–89, 2008.
- BAKER, E. N. Structure and reactivity of transferrins. **Adv. Inorg. Chem.** v. 41, p. 389–463, 1994
- BAKER, E. N.; BAKER, H. M. Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin. **Cell. Mol. Life Sci.** v. 62, p. 2531–2539, 2005.
- BAMBERGER, S.; BROOKS, D. E.; SHARP, K. A.; VAN ALSTINE, J. M.; WEBBER, T. J. “Preparation of phase system and measurement of their physicochemical properties. In: BROOKS, D. E.; WALTER, H.; FISCHER, D. **Partitioning in aqueous two-phase system**. Academic Press, Orlando, 1985.
- BOAGLIO, A., BASSANI, G., PICO, G., NERLI, B. Features of the milk whey protein partitioning in polyethyleneglycol-sodium citrate aqueous two-phase systems with the goal of isolating human alpha-1 antitrypsin expressed in bovine milk. **Journal of Chromatography B**. v. 837, p. 18–23, 2006.
- BRADFORD, M. M.; **Anal. Biochem.**, n°72, 248p., 1976.
- BRITIGAN, B. E.; SERODY, J. S.; COHEN, M. S. The role of lactoferrin as an anti-inflammatory molecule. **Adv. Exp. Med. Biol.** v. 357, p. 143–156, 1994
- BROCK, J. H. The physiology of lactoferrin. **Biochem. Cell Biol.** v. 80, p. 1–6, 2002

CAPEZIO, L.; ROMANINI, D.; PICO, G. A.; NERLI, B. Partition of whey milk proteins in aqueous two-phase systems of polyethylene glycol–phosphate as a starting point to isolate proteins expressed in transgenic milk. **Journal of Chromatography B**. v. 819, p. 25–31, 2005

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.

CHEN, J. P. Partitioning and separation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in PEG/potassium phosphate two phase systems. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. v. 73 (2), p. 140–147, 1992.

CHEN, J., MA, G. X., LI, D. Q. HPCPC separation of proteins using polyethylene glycol/potassium phosphate aqueous two phase. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**. v. 29 (1), p. 371–383, 1999.

COIMBRA, J. R., TOMMES, J., KULA, M. R. Continuous separation of whey proteins with aqueous two-phase systems in a Graesser contactor. **Journal of Chromatography**. v. 668(1), p. 85–94, 1994.

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

COIMBRA, J.S. R.; TEIXEIRA, J. **Engineering Aspects of Milk and Dairy Products**. Boca-Raton, CRC Press, 2009.

COIMBRA, J.S.R. **Desempenho de um extrator tipo Graesser na separação de proteínas do soro de queijo usando sistemas aquosos bifásicos**. Tese de doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 1995.

COMPTON, S. J.; JONES, C. G.; **Anal. Biochem.** 1985.

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

DA SILVA, C. A. S., COIMBRA, J. S. R., ROJAS, E. E. G., MINIM, L. A., DA SILVA, L. H. M. Partitioning of caseinomacropeptide in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**. v. 857, p. 205–210. 2007.

- DA SILVA, C. A. S.; COIMBRA, J.S.R.; ROJAS, E.E.G; TEIXEIRA J.A.C. Partitioning of glycomacropptide in aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**. v. 44, p. 1213-1216, 2009.
- DA SILVA, L. H.M.; LOH, W. Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. **Química Nova**. v. 29, p.1345-1351, 2006.
- DAIMOND, A. D.; HSU, J. T. **Aqueous Two Phase Systems for Biomolecule Separation. Advances in Biochemical Engineering**, Fiechter, A. (ed.) Springer-Verlag, Berlin, 47, 89-135, 1992
- 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.
- DE WITH, J. N. Nutritional and Functional characteristics of whey proteins in food products. **Journal Dairy Science**, v.81, n.6, p.597-609, 1998.
- DIAMOND, A. D.; HSU, J. T. Fundamental studies of biomolecules partitioning in aqueous two-phase systems. **Biotech. Bioeng.** v. 34, p. 1000–1014, 1989.
- FORCINITI, D.; HALL, C. K. Influence of polymer molecular weight in temperature on phase composition in ATPS. **Fluid Phase Equilibria**, v. 61, p. 243-262, 1991.
- FOX, P. F., Milk proteins as food ingredients. **International Journal of Dairy Technology**. v. 54, p. 41-55, 2001.
- GAUTAM, S.; SIMON, L. Partitioning of β -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.
- GIRALDO-ZUNIGA, A. D., COIMBRA, J. S. R., MINIM, L. A., ROJAS, E. E. G. Axial mixing in a Graesser liquid-liquid contactor using aqueous two-phase systems. **Chemical Engineering and Processing**. v. 44 (4): p. 441–446, 2005.
- GROVES, M. L. The isolation of a red protein from milk. **J. Am. Chem. Soc.** v. 82, p. 3345–3350, 1960.
- 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.
- HACHEM, F; ANDREWS , B. A.; ASENJO, J. A.. Hydrophobic partitioning of proteins in aqueous two-phase systems. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 19, p. 507-517, 1996.
- HARRIS, D. P.; ANDREWS, A. T.; WRIGHT, G.; PYLE, D. L.; ASENJO, J. A. The application of aqueous two phase systems to the purification of pharmaceutical proteins from transgenics sheep milk. **Bioseparation**. v. 7, p. 31–37, 1997.

- HATTI-KAUL, R. Aqueous Two-Phase Systems: A General Overview. **Molecular Biotechnology**, v. 19, p. 269-277, 2001.
- HUDDLESTON, J. G.; WILLAUER, H. D.; ROGERS, R. D. Phase Diagram Data for Several PEG + Salt Aqueous Biphasic Systems at 25 °C. **J. Chem. Eng. Data**. v. 48, p. 1230–1236, 2003.
- HUDDLESTON, J.; ABELAIRA, J.C.; WANG, R.; LYDDIATT, A. Protein partition between the different phases comprising poly(ethylene glycol)-salt aqueous two-phase systems, hydrophobic interaction chromatography and precipitation: A generic description in terms of salting-out effects **J. Chromatogr. B**. v. 680, p. 31-41, 1996.
- ISGROVE, F.H.; WILLIAMS, R.J.H.; NIVEN, G.W.; ANDREWS, A.T. Aqueous two-phase systems: a novel approach for the separation of proteose peptones. **Journal of Chromatography B**, v. 711, p. 91–96, 1998.
- IYER, S.; LONNERDAL, B. Lactoferrin, lactoferrin receptors and iron metabolism. **Eur. J. Clin. Nutr.** v. 47, p. 232–241, 1993.
- JOHANSSON, G.; ANDERSON, M.; AKERLUND, H.E. Counter distribution of yeast enzymes with polymer-bound triazine dye affinity ligands. **Journal of Chromatography**, v. 289, p. 483-493, 1984.
- JOHANSSON, H.O; KARLSTRÖM, G.; TJERNELD, F.; 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.
- KLOMKLAO, S.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; SIMPSON, B. K.; KISHIMURA, H. Partitioning and recovery of proteinase from tuna spleen by aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**. v. 40, p. 3061–3067, 2005.
- LEVAY, P. F.; VILJOEN, M. Lactoferrin: a general review. **Haematologica**. v. 80, p. 252–267, 1995.
- LIMA, A.S.; ALEGRE, R.M.; MEIRELLES, A.J.A. Partitioning of pectinolytic enzymes in polyethylene glycol/potassium phosphate aqueous two-phase systems. **Carbohydrate Polymers**. v. 50, p. 632-68, 2002.
- MADEIRA, P. P.; TEIXEIRA, J. A.; MACEDO E. A.; MIKHEEVAC, L. M.; ZASLAVSKY, B. Y. Correlations between distribution coefficients of various biomolecules in different polymer/polymer aqueous two-phase systems. **Fluid Phase Equilibria**. v. 267, p. 150–157, 2008
- MADEIRA, P.P.; XU, X.; 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. 47-155, 2005.
- MATIASSON, B.; LING, T. G. I. Extraction in aqueous for biotechnology. IN: VENAL, N.S., HUDSON, M.J. *Biochemistry and Biotechnology*. p. 270-292, 1897
- MERCHUK, J. C.; ANDREWS, B. A.; ASENJO, J. A. Aqueous two-phase systems for protein separation. Studies on phase inversion. **J. Chromatogr. B**. v. 711, p. 285–293, 1998.

MOORE, S. A.; ANDERSON, B. F.; GROOM, C. R.; HARIDAS, M.; BAKER, E. N. Three-dimensional structure of diferric bovine lactoferrin at 2–8 Å resolution. **J. Mol. Biol.** v. 274, p. 222–236, 1997.

OLIVEIRA, F. C.; COIMBRA, J. S. R.; SILVA, L. H. M.; ROJAS, E. E. G.; SILVA, M. C. H. Ovomucoid partitioning in aqueous two-phase systems. **Biochemical Engineering Journal.** v. 47, p. 55–60, 2009.

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

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

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

OLIVEIRA, R. M.; COIMBRA, J. S. R.; MINIM, L. A. SILVA, L. H. M.; FONTES, M. P. F. Liquid–Liquid Equilibria of Biphasic Systems Composed of Sodium Citrate + Polyethylene(glycol) 1500 or 4000 at Different Temperatures. **Journal of Chemical & Engineering Data,** v. 53, p. 895–899, 2008.

PAPAMICHEL, N., BORNER, B., HUSTEDT, H. Continuous aqueous phase extraction of proteins: automated on-line monitoring of fumarase activity and protein concentration. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology.** v. 50, p. 457–467, 1991.

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.

PIERCE, A.; COLAVIZZA, D.; BENAÏSSA, M.; MAES, P.; TARTAR, A.; MONTREUIL, J.; SPIK, G. Molecular cloning and sequence analysis of bovine lactotransferrin. **Eur. J. Biochem.** v. 196, p. 177–184, 1991.

ROBERTS, M.J.; BENTLEY, M.D.; HARRIS, J.M. Chemistry for peptide and protein PEGylation. **Advanced Drug Delivery Reviews.** v. 54, p. 459–476, 2002

RODRIGUES L., TEIXEIRA J., SCHMITT F., PAULSSON M., MÅNSSON H. L. Lactoferrin and Cancer Disease Prevention, **Food Science and Nutrition,** v. 49, p. 203–217, 2009.

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.

RODRIGUES, L. R., VENANCIO, A., TEIXEIRA, J. A. Partitioning and separation of *a*-lactalbumin and *b*-lactoglobulin in polyethylene glycol/ammonium sulphate aqueous two-phase systems. **Biotechnology Letters**. v. 23, p. 1893–1897, 2001.

RODRIGUES, L. R., VENANCIO, A., TEIXEIRA, J. A. Recovery of the proteose peptone component 3 from cheese whey in Reppal PES 100/polyethylene glycol aqueous two-phase systems. **Biotechnology Letters**. v. 25: p. 651–655, 2003.

SARAVANAN, S.; RAO, JR; MURUGESANB, T.; NAIR B.; RAMASAMI T. Partition of tannery wastewater proteins in aqueous two-phase poly (ethylene glycol)–magnesium sulfate systems: effects of molecular weights and pH. **Chem Eng Sci**. v.62, p.969–78, 2007.

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

SCHMIDT, A. S.; VENTON, A. M. and ASENJO, J. A. Partitioning and purification of α -amylase in aqueous two-phase. **Enzyme Microbiology Technology**. v. 16, p. 131-142, 1994.

SILVA, L. H. M., COIMBRA, J. S. R.; MEIRELLES, A. J. A. Equilibrium Phase Behavior of Poly(ethylene glycol) + Potassium Phosphate + Water Two-Phase Systems at Various pH and Temperatures. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 42, n. 2,p. 398-401, 1997.

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

SILVÉRIO, S. C.; MADEIRA, P. P.; RODRÍGUEZ,O.; TEIXEIRA, J. A.; MACEDO, E. A. Δ G(CH₂) in PEG-Salt and Ucon-Salt Aqueous Two-Phase Systems. **J. Chem. Eng. Data**. v. 53,p. 1622–1625, 2008.

SINHA, R.; SINGH, S.P.; AHMED, S.; GARG, S.K. Partition of Bacillus alkaline protease in aqueous two-phase systems. **Bio-source Technology**. v. 55, p. 163-166, 1996.

SMITHERS, G. W. Whey and whey proteins—From ‘gutter-to-gold’. **International Dairy Journal**. v. 18, p. 695– 704, 2008.

SOUSA, R. C. S.; COIMBRA, J. S. R.; SILVA, L. H. M.; SILVA, M. C. H. ROJAS, E. E. G.; VICENTE, A. A. Thermodynamic studies of partitioning behavior of lysozyme and conalbumin in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**. v. 877, p. 2579–2584, 2009.

STEIJNS, J.; VAN HOOIJDONK, A. Occurrence, structure, biochemical properties technological characteristics of lactoferrin. **Br. J. Nutr**. v. 84, p. S11-S17, 2000.

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

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

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

TOMITA, M.; WAKABAYASHI, K.; YAMAUCHI, K.; TERAGUCHI, S; HAYASAWA, H. Bovine lactoferrin and lactoferricin derived from milk: production and applications. **Biochem. Cell Biol.** v.80, p. 109–112, 2002.

TREYBAL, R.E. **Mass transfer Operations**, 3rd Edn, McGraw-Hill, New York, 1981

TUBIO, G.; NERLI, B.; PICÓ, G. Partitioning features of bovine trypsin and α -chymotrypsin in polyethyleneglycol-sodium citrate aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**, v. 852, p. 244–249, 2007.

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.

VAN DER STRATE, B.W.A.; BELJAARS, L.; MOLEMA, G.; M.C. HARMSSEN; D.K.F. MEIJER. Antiviral activities of lactoferrin. **Antiviral Research**. v. 52, p. 225–239, 2001.

VERNAU, J.; KULA, M. R. Extraction of Proteins from Biological Raw Materials Using Aqueous Poly(ethylene) glycol-Citrate Phase Systems. **Biotechnol. Appl. Biochem.** v. 12, 397-404, 1990.

WAKABAYASHI, H., YAMAUCHI, K., TAKASE, M. Lactoferrin research, technology and applications. **International Dairy Journal**. v. 16, p. 1241–1251, 2006.

YAN-MIN, LU.; YAN-ZHAO, Y.; XI-DAN, Z.; CHUAN-BO, X. Bovine serum albumin partitioning in polyethylene glycol (PEG)/potassium citrate aqueous two-phase systems. **Food and Bioproducts processing**. v. 88, p. 40–46, 2010.

ZAFARANI-MOATTAR, M. T.; GASEMI, J. Liquid-liquid equilibria of aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol and ammonium dihydrogen phosphate or diammonium hydrogen phosphate. Experiment and correlation. **Fluid Phase Equilib.** v. 198, p. 281-291, 2002.

ZAFARANI-MOATTAR, M. T.; SADEGHI, R. Liquid-liquid equilibria of aqueous two-phase systems containing polyethyleneglycol and sodium dihydrogen phosphate or disodium hydrogen phosphate. Experiment and correlation. **Fluid Phase Equilib.** v. 181, p. 95-112, 2001.

ZAFARANI-MOATTAR, M.T.; TOLOUEI, S. Liquid-liquid equilibria of aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol 4000 and di-potassium tartrate, potassium sodium tartrate, or di-potassium oxalate: Experiment and correlation. **Computer Coupling of Phase Diagrams and Thermochemistry**. v. 32, p. 655-660, 2008.

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

ZYDNEY, A. L., Protein separations using membrane filtration: new opportunities for whey fractionation. **International Dairy Journal**, v 8, p. 243–250, 1998.