



**PARTIÇÃO DE GLUTENINA DE FARINHA DE TRIGO
ESPECIAL EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS**

INGRID SILVA BARBERINO DO NASCIMENTO

2008

INGRID SILVA BARBERINO DO NASCIMENTO

**PARTIÇÃO DE GLUTENINA DE FARINHA DE TRIGO
ESPECIAL EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS**

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

Orientador (a): Jane Sélia dos Reis Coimbra

Co-orientador(a): Renata Cristina Ferreira Bonomo

ITAPETINGA
BAHIA - BRASIL
2008

*Aos meus amados pais, Cláudio (in memoriam) e Miriam;
À minha avó Aurelina;
Aos meus irmãos Ítalo e Claudiane;
Aos meus cunhados André e Yvean;
Aos meus sobrinhos João, Júlia, Beatriz, Sofia e Isabela,
Por me fazerem tão feliz.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, em Quem tenho crido e estou certa que é Poderoso, minha imensa e eterna gratidão pelo seu amor e fidelidade.

À minha mãe, pelo exemplo de vida, honestidade e justiça. Pelo seu amor incondicional, apoio, força, proteção, orações, carinho, conselhos e presença constante.

À minha avó pela torcida e incentivo.

Aos meus irmãos pela cumplicidade, amor fraternal e conselhos, sempre tão sábios.

Aos meus cunhados pelas palavras de incentivo e torcida constante.

Aos meus sobrinhos pelos momentos de alegria.

À Universidade Estadual do Sudoeste de Bahia (UESB) e o Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos (PPG-EAL), pela oportunidade concedida.

À FAPESB e à minha mãe pelo auxílio financeiro.

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

À minha orientadora, Profa. Jane Sélia dos Reis Coimbra. Pela orientação, incentivo, amizade, presença, confiança e, sobretudo paciência.

Aos professores e amigos, Renata Bonomo, Paulo Bonomo e Rafael Fontan, pela confiança, apoio, incentivo, orientação, motivação e amizade.

Ao professor Luís Henrique Mendes da Silva, pela atenção, cuidado, apoio, incentivo e orientação.

Ao professor e amigo Marcos Antônio Couto, pelo incentivo, confiança e exemplo.

À professora Mônica Pirozi, pelo conhecimento compartilhado, material concedido e atenção constante. Muito obrigada!

Ao Professor Antônio Modesto Chaves, pelo apoio e confiança.

Aos colegas de curso, Rafael, Ellen, Hallana, Tatiana, Daniela, Andréia, Eron, Michelle, Gabrielle, Lidiane, Cândida e Alex, pelo respeito e companheirismo.

Aos amigos do Laboratório de Processos de Separação (LPS), Aline, Rosana, Fabíola, Bruna Mara, Janaína (Jajá), Roney, Priscilla, Toninho e Carol, pelos momentos agradáveis.

Às amigas Daniela e Rita por todo apoio, generosidade e amizade.

Ao meu amigo de todas às horas, Leandro. Pela presença constante, generosidade, exemplo de fé, tranquilidade, por todos os conselhos e incentivo.

À Ana Carolina Cordeiro, pelo cuidado, carinho, atenção, generosidade e amizade.

À Gabriela Poliana pela torcida constante, amizade, companheirismo e cumplicidade.

Às minhas eternas irmãs, Shirley, Márcia, Ciléia, Yure, Elis, Verônica, Carmem, Roberta (*in memoriam*), Dâmella, Danielle, Dyala, Alana, Juliana, Manuela, Karyna e Thaís que embora não estejam tão próximas, estão sempre presentes. Obrigada pela amizade.

Aos amigos Andréia, Rogério, Ivan, Iago e às meninas do “101”, pelos momentos de alegria.

Aos funcionários do DTA-UFV pela paciência, dedicação e lealdade.

À Bárbara (MEALI-IT) pela paciência, compreensão e fidelidade.

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

“Valeu demais, o tempo e o contratempo que essa história traz; todos os vão momentos ficaram cheios de esperança e da certeza da presença do Senhor em cada passo por onde eu for...”

(Autor desconhecido)

RESUMO

NASCIMENTO, Ingrid Silva Barberino do, **Partição de Glutenina de farinha de trigo especial usando sistemas aquosos bifásicos**. Itapetinga-BA: UESB, 2008. 68p. (Dissertação - Mestrado em Engenharia de Processos de Alimentos).*

Neste trabalho, estudou-se a aplicação da extração líquido-líquido para a separação de glutenina de farinha de trigo especial, por meio de sistemas aquosos bifásicos (SAB), compostos por polietileno glicol (PEG), sais inorgânicos e água. Esta técnica pode ser usada para purificação de biomoléculas em larga escala pela possibilidade de partição seletiva com altos rendimentos. Os sistemas são formados pela adição, à água, de dois polímeros ou de um polímero e um sal em concentrações determinadas. A partição da glutenina foi conduzida em sistemas de diversas composições, a (5, 25, 35 e 45)°C, e o comportamento da proteína nesses sistemas foi avaliado por meio do coeficiente de partição, em função do tipo de sal (fosfato de potássio, sulfato de lítio e sulfato de sódio), massa molar do polímero (PEG 1500 e PEG 4000) e concentração das fases, a fim de se obter o melhor sistema para a separação da biomolécula. O conteúdo protéico em cada fase foi quantificado por espectrofotometria por meio da leitura da absorbância a 595 nm. Os resultados mostraram que o coeficiente de partição variou entre de 0,2 e 8,0 (oito), ou seja, a proteína migrou preferencialmente para a fase superior, rica em PEG. Os maiores valores do coeficiente de partição foram obtidos em sistemas compostos por PEG 4000-Sulfato de lítio a 45 °C, seguido do PEG 1500 fosfato de potássio a 25 °C. As diferentes tendências apresentadas pelo coeficiente de partição em função das propriedades dos sistemas mostra que é possível separar adequadamente a proteína da mistura, o que define esse sistema como uma alternativa a ser considerada no planejamento de processos de recuperação e purificação de biomoléculas da farinha de trigo.

Palavras-chave: Proteína, glutenina, sistemas aquosos bifásicos (SAB).

*Orientador (a): Jane Sélia dos Reis Coimbra, *D.Sc.*, UFV e Co-orientadores: Renata Cristina Ferreira Bonomo, *D.Sc.*, UESB e Luís Henrique Mendes da Silva, *D.Sc.*, UFV.

ABSTRACT

NASCIMENTO, Ingrid Silva Barberino do, **Partitioning of gluten in flour of wheat special using aqueous two-phase systems**. Itapetinga: UESB, 2008. 68p. (Dissertação - Mestrado em Engenharia de Processos de Alimentos).*

In this work, separation of gluten in was studied using liquid-liquid extraction with aqueous two-phase systems (ATPS) composed by poly (ethylene glycol) (PEG) and an inorganic salt. This technique is an advisable purification process applied to large scale since it provides a selective partition with high yields. The systems are formed by the addition, water, two polymers or a polymer and salt in a certain concentrations. The partition behavior of gluten in ATPS was investigated studying the influence of the type of salt (potassium phosphate, lithium sulfate or sodium sulfate), polymer molar mass (PEG1500 and PEG4000), phase concentrations (tie line length) and temperature in the system. The amount of protein in each phase was made by spectrophotometer through the reading of extinction to 595nm. The results showed that the partition coefficient ranges from 0.2 to 8.0 of (eight), or the protein preferentially migrated to the upper stage, rich in PEG. The highest values of the partition coefficient were obtained in systems composed of PEG-4000 lithium sulphate at 45 °C, followed by phosphate potassium - PEG 1500 at 25 °C. The different trends for the partition coefficient according to the properties of the systems shows that it is possible to separate the properly protein of the mixture, which states that system as an alternative to be considered in the planning processes of recovery and purification of biomolecules.

Keywords: Protein, glutenin, aqueous systems two-phase.

* Advisor (a): Jane Sélia dos Reis Coimbra, D.Sc., UFV and Co-guiding: Renata Cristina Ferreira Bonomo, D.Sc., UESB and Luis Luis Henrique Mendes da Silva, D.Sc., UFV.

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Classificação do trigo.....	5
Tabela 2: Sistemas aquosos bifásicos típicos.....	13
Tabela 3: Aplicações de extração de biomoléculas com SAB	14
Tabela 4: Teor protéico total da farinha de trigo.....	34
Tabela 5: Concentração de glutenina em solução de ácido propiônico	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Grão de trigo	5
Figura 2: Representação planar parcial da molécula de PEG com os sítios disponíveis para as interações com os demais componentes do sistema.	15
Figura 3: Diagrama de fases genérico para um sistema contendo PEG e sal, expresso em coordenadas retangulares.....	19
Figura 4: Espectro de radiação eletromagnética, com destaque para a região do visível.....	27
Figura 5: Influência da massa molar do PEG sobre k , em função da temperatura, para SABs formados por PEG- FFP.....	37
Figura 6: Influência da massa molar do PEG sobre k , em função da temperatura, para SABs formados por PEG – Sulfato de Lítio.	38
Figura 7: Influência da massa molar do PEG sobre k , em função da temperatura, para SABs formados por PEG – Sulfato de Sódio.	38
Figura 8: Influência da temperatura sobre k , em função da massa molar do polímero, para SABs formados por PEG – Sulfato de Lítio.	40
Figura 9: Influência da temperatura sobre k , em função da massa molar do polímero, para SABs formados por PEG – Sulfato de Sódio.	41
Figura 10: Influência da temperatura sobre k , em função da massa molar do polímero, para SABs formados por PEG – Fosfato de Potássio.	41
Figura 11: Influência do tipo e concentração do sal sobre k , para SABs formados por PEG 1500, Sais de fosfato de potássio (FFP), sulfato de lítio (SL) e sulfato de sódio (SS) a 5 °C.....	43
Figura 12: Influência do tipo e concentração de sal sobre k , para SABs formados por PEG 1500, Sais de fosfato de potássio (FFP), sulfato de lítio (SL) e sulfato de sódio (SS) a 25°C	44
Figura 13: Influência do tipo e concentração de sal sobre k , para SABs formados por PEG 4000, Sais de fosfato de potássio (FFP), sulfato de lítio (SL) e sulfato de sódio (SS) a 5°C.....	44
Figura 14: Influência do tipo e concentração de sal sobre k , para SABs formados por PEG 4000, Sais de fosfato de potássio (FFP), sulfato de lítio (SL) e sulfato de sódio (SS) a 25°C.....	45
Figura 15: Influência do tipo e concentração de sal sobre k , para SABs formados por PEG 4000, Sais de fosfato de potássio (FFP), sulfato de lítio (SL) e sulfato de sódio (SS) a 35°C.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

SAB - Sistemas Aquosos Bifásicos;

pI - Ponto Isoelétrico;

BSA - Albumina do Soro Bovino;

PEG – Polietilenoglicol;

K_p - Coeficiente de Partição

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

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

TLL - Comprimento da Linha de Amarração;

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

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

K_2HPO_4 - Fosfato de Potássio Dibásico;

KH_2PO_4 - Fosfato de Potássio Monobásico;

Li_2SO_4 - Sulfato de Lítio

Na_2SO_4 - Sulfato de Sódio;

V_s - Volume da fase superior;

V_i - Volume da fase inferior.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 O Trigo.....	4
2.1.1 Classificação do trigo.....	5
2.1.2 Características Nutricionais do Trigo.....	6
2.1.3 Proteínas do Trigo.....	7
2.2 Técnicas de Fracionamento em Proteínas.....	10
2.2.1 Flow Field Flow Fractionation.....	10
2.2.2 Cromatografia Líquida de Alto Desempenho.....	10
2.2.3 Sistemas Aquosos Bifásicos.....	11
2.2.4 Partição de Proteínas em SABs.....	22
2.3 Espectrofotometria.....	26
2.3.1 O método de Bradford.....	29
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	30
3.1 Materiais.....	30
3.2. Métodos.....	30
3.2.1 Escolha dos sistemas de trabalho.....	30
3.2.2 Quantificação do Conteúdo Protéico Total da Farinha de Trigo.....	31
3.2.3 Preparo da Solução de Glutenina usando Ácido Propiônico.....	31
3.2.4 Preparo dos Sistemas Aquosos Bifásicos.....	31
3.2.5 Quantificação da Proteína presente nas Fases dos SABs.....	32
3.2.6 Cálculo do Coeficiente de Partição.....	32
3.2.7 Cálculo do Comprimento da Linha de Amarração.....	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1 Quantificação do conteúdo protéico total da farinha de trigo.....	34
4.2 Quantificação de proteína em solução de ácido propiônico.....	34
4.3 Estudos dos Sistemas Aquosos Bifásicos.....	35
4.3.1 Determinação do Coeficiente de Partição da Proteína.....	35

4.3.2 Efeito da Temperatura sobre o K	39
4.3.3 Efeito do Eletrólito sobre o K	42
5. CONCLUSÕES	47
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

1. INTRODUÇÃO

Entre as farinhas de cereais, apenas a farinha de trigo tem a capacidade de formar uma massa forte (ideal para panificação) e coesa que retém gás e produz produtos assados aerados e leves. Acredita-se que as proteínas do trigo, e mais especificamente as proteínas do glúten são responsáveis por essa característica especial do trigo (MACRITCHIE, 1992; SHEWRY, 1995; SHEWRY et al, 1994, 1995; SHEWRY e TATHAM, 1997; GIANIBELLI et al, 2001).

Um dos objetivos da ciência dos cereais é relacionar a composição do grão de trigo às suas propriedades funcionais. Sabe-se que a composição protéica do trigo controla propriedades especiais que tornam a farinha de trigo adequada para a obtenção de produtos fermentados. Atribui-se à glutenina a capacidade de conferir, à massa da farinha, resistência à extensão. Entretanto, ainda estão sendo estudadas as razões dessa relação, e por isso, tem se tornado relevante, determinar o comportamento individual, ou em misturas complexas, das proteínas do glúten, de maneira que essas possam ser diretamente aplicadas para melhorar a qualidade do processamento. Acredita-se que, do ponto de vista tecnológico, somente a determinação da composição protéica quanto à quantificação das subunidades de proteínas são importantes (MACRITCHIE et. al., 1997).

Vários trabalhos de pesquisa publicados nas últimas décadas trazem o perfil de composição protéica de trigos produzidos em diversos países (LAWRENCE *et al*, 1987; NG & BUSHUK, 1988; MANSUR *et al*, 1990; DONG et al, 1992; MARGIOTTA *et al*, 1996; GIANIBELLI *et al*, 1998; MARGIOTTA *et al*, 2000), porém, no Brasil ainda não foi concluído um trabalho extensivo de identificação das subunidades protéicas mais diretamente relacionadas com a qualidade de panificação. Estudos iniciais indicam que a qualidade tecnológica em algumas variedades de trigo brasileiro, pode estar relacionada à presença de subunidades ainda não apontadas como as responsáveis por quaisquer características de qualidade (PIROZI, et. al., 2002).

Muitas técnicas têm sido utilizadas para separar e quantificar as proteínas do glúten, como “Flow Field-Flow-Fractionation” (Flow FFF) e a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

“Flow Field-Flow-Fractionation” (Flow FFF) é uma técnica que permite o fracionamento de macromoléculas por tamanho. A separação é atingida pela eluição dos componentes através de um canal fino em forma de fita, sujeito a um campo (centrífugo, elétrico ou térmico) perpendicular ao fluxo do canal. Componentes que apresentam maior resposta à força exercida pelo campo são deslocadas para regiões mais distantes do centro, em direção à parede do canal. Flow FFF foi aplicada para o fracionamento de proteínas do trigo por Stevenson e Preston em 1995. Os estudos

demonstraram claramente o tamanho extremamente grande dos maiores polímeros de glutenina e o potencial promissor da Flow FFF para a caracterização das gluteninas poliméricas na farinha de trigo (STEVENSON e PRESTON, 1995).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é uma técnica valiosa na caracterização da composição de proteínas. A aplicação da técnica para proteínas de cereais foi iniciada por Bietz em 1986. Em combinação com ultrassom, a CLAE por exclusão molecular é uma técnica muito utilizada para caracterização de proteínas do trigo (MacRITCHIE, 1999) e uma das mais difundidas atualmente. Dados de CLAE por exclusão molecular têm sido usados com sucesso para demonstrar a relação entre cada subunidade protéica do trigo com sua função tecnológica (GUPTA, BATEY E MACRITCHIE, 1992; MACRITCHIE, 1999; ANTES & WIESER, 2001). O princípio de separação baseia-se na habilidade de um componente em penetrar os poros do empacotamento da coluna cromatográfica. Moléculas com diâmetros menores penetram nos poros menores, que são inacessíveis àquelas de maiores diâmetros, sendo assim separadas.

A dificuldade, porém, na utilização das técnicas citadas para as proteínas do glúten, reside em separá-la da farinha, de forma intacta ou nativa, pois, devido ao tamanho relativamente grande, essas proteínas são fracionadas antes de serem separadas. Tal condição tem levado ao desenvolvimento e/ou melhoria de uma técnica de separação que possibilite a extração de tais proteínas em condições que mantenham sua estrutura nativa, evitando que ocorra seu fracionamento e a conseqüente perda da sua funcionalidade.

Nos últimos anos, tem adquirido importância na biotecnologia a concentração e separação de proteínas usando os Sistemas Aquosos Bifásicos (SABs).

O emprego de SABs nos processos de separação de biomoléculas constitui-se uma metodologia viável, pois permite isolar proteínas de misturas complexas (como o complexo do glúten) e oferece vantagens como rapidez na separação, alta relação massa da proteína/volume total da solução, possibilidade de separação das fases em modo contínuo, assim como baixo custo e facilidade de aplicação em grande escala (ALBERTSSON, 1986).

A extração da glutenina utilizando Sistemas Aquosos Bifásicos (SABs) surge como uma alternativa viável para a sua purificação, uma vez que a técnica vem sendo utilizada com sucesso no isolamento de proteínas e de outros materiais de origem biológica sem que haja perda de sua atividade biológica (ALBERTSSON, 1986).

Os SABs resultam da incompatibilidade de dois polímeros em soluções, ou entre um polímero e um sal. O material a ser separado se divide entre as duas fases aquosas do sistema sendo o grau de separação quantificado por meio do coeficiente de partição (K). Este coeficiente é função de uma série de variáveis experimentais como pH, temperatura, presença de sais, massa molar,

concentração dos polímeros, como também características da proteína. Assim, por meio do controle dessas variáveis pode-se separar a proteína de interesse.

O presente trabalho buscou determinar as melhores condições de separação da glutenina em sistemas aquosos bifásicos compostos por polímeros e sais, em função da massa molar do polímero e de sua concentração, do tipo de sal e da temperatura.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O Trigo

O trigo é o nome comum dado aos cereais pertencentes à família Gramíneae, gênero *Triticum*. É uma planta anual, com altura média de 1,2 metros e folhas que aparecem apenas no início do desenvolvimento, seguidas pela emergência de uma haste esguia a qual termina numa espiga formada por grãos. É considerado um dos mais importantes grãos para a humanidade. O cereal é matéria-prima utilizada em larga escala na elaboração de vários produtos, principalmente na indústria alimentícia (COLLE, 1998; ROSSI et. al., 2004). O tipo de maior interesse comercial é o *Triticum aestivum L.* (trigo comum) utilizado na panificação, produção de bolos, biscoitos, massas e produtos de confeitaria.

As primeiras sementes de trigo foram trazidas ao Brasil por Martin Afonso, em 1534, as quais foram plantadas na Capitania de São Vicente, hoje correspondente ao Estado de São Paulo. A partir de então se estenderam pelo planalto na direção Sul, onde as condições climáticas eram mais favoráveis à sua cultura. De acordo com SANTOS (2001), a cultura do trigo se desenvolve melhor em temperaturas de clima temperado e frio.

A partir de 1969/70, a cultura do trigo expandiu-se para as áreas de solos mais férteis do norte e oeste do Paraná e, em 1979, o estado assumiu a liderança na produção de trigo no Brasil. A maior área semeada e a maior produção foram registradas em 1986/87 quando, em 3.456 mil ha., o país produziu 6 (seis) milhões de toneladas do grão.

A produção mundial de trigo representa cerca de 30% da produção total de cereais (FAO, 1999). Seu cultivo é bastante disseminado no mundo inteiro. A produção de trigo na América do Sul representa apenas 2,5% da produção mundial. O Brasil, apesar de contar com somente 16% da produção total da América do Sul, ocupa o lugar de segundo maior produtor da América latina.

O trigo consumido no Brasil é de procedência nacional e importado. Os estados brasileiros de maior produção são Paraná, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul e São Paulo. Há cinco anos, o país tornou-se o maior importador mundial de trigo (SANTOS, 2008). Segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, esta liderança vem se consolidando desde a safra 1999/00. De acordo com a estimativa do Governo, as importações brasileiras de trigo bateram recorde na safra 2006/07 e as despesas com as importações superaram US\$ 1,2 bilhão (ROCHA, 2007). As principais importações provem dos Estados Unidos, Argentina, Canadá e Alemanha.

Os cereais têm um papel de destaque na produção agrícola da maioria dos países devido a sua importância na nutrição humana. O trigo, juntamente com o arroz e o milho, constitui-se numa importante fonte de calorias e proteínas na nutrição humana.

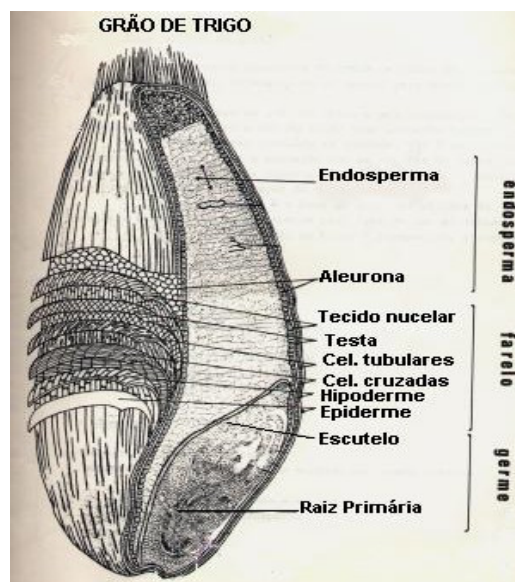


Figura 1: Grão de trigo

O grão de trigo (figura 1) contém em média: Endosperma (80% do grão), Casca (17,5% do grão) e Germe ou Embrião (2,5% do grão).

O Endosperma é a fonte de farinha de trigo branca. Contém a maior parte da proteína do grão inteiro, e ainda carboidratos, ferro, algumas vitaminas do complexo B, como riboflavina, niacina e tiamina, amido e fibras. O germe é o embrião da semente, contém mínimas quantidades de proteínas, mas grande parte de vitaminas e traços de minerais.

2.1.1 Classificação do trigo

De acordo com a Normativa nº 07 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), os cultivares estão classificados (de acordo com a alveografia e o Índice de Queda) em cinco classes:

Tabela 1: Classificação do trigo

Classe	Alveografia (10-4J) (mínimo)	Número de Quedas (segundos) (mínimo)
Trigo Brando	50	200
Trigo Pão	180	200
Trigo Melhorador	300	250
Trigo para outros usos	Qualquer	< 200
Trigo Durum	-	250

Fonte: MAPA (2003)

Alveografia é o teste que analisa as propriedades de tenacidade e de extensibilidade da massa. Considera somente o parâmetro que indica a força ou trabalho mecânico, necessário para expandir a massa. Esse parâmetro é determinado a partir da curva obtida pelo equipamento (alveógrafo), segundo o método padrão indicado pelo fabricante.

Índice de queda (“Falling Number”) é a medida indireta da concentração da enzima alfa-amilase determinada pelo método de Hagberg, descrito pela Cereal Chemistry (1991). O teste não quantifica a atividade enzimática, mas permite a comparação entre diferentes farinhas, discriminando aquelas que apresentam níveis adequados para panificação (AACC, 1983; GUARIENT, 1996). O valor expresso no “Falling Number” é dado em segundos. Quanto menor o tempo, maior o teor de enzima.

As diferentes classes de trigo são utilizadas para fins distintos, conforme segue:

- Em trigo brando, são enquadrados os grãos de genótipos de trigo aptos para a produção de bolos, bolachas (biscoitos doces), produtos de confeitaria, pizzas e massa do tipo caseira fresca.
- Na classe trigo pão, estão os grãos de genótipos de trigo com aptidão para a produção do tradicional pãozinho (do tipo francês ou d’água) consumido no Brasil. Esse trigo também pode ser utilizado para a produção de massas alimentícias secas, de folhados ou em uso doméstico, dependendo das características de força do glúten.
- A classe de trigo melhorador, envolve os grãos de genótipos de trigo aptos para mesclas com grãos de genótipos de trigo brando, para fim de panificação, produção de massas alimentícias, biscoito do tipo crackers e pães industriais (como pão de forma e pão para hambúrguer).
- Na classe do trigo durum, especificamente os grãos da espécie *Triticum Durum L.*, estão os grãos de genótipos de trigo para a produção de massas alimentícias secas (tipo italiana).
- Trigos para outros usos são os destinados à alimentação animal ou uso industrial. Estes envolvem os grãos de genótipos de trigo com qualquer valor de força de glúten, mas não enquadrados em nenhuma das outras classes, por apresentarem número de queda (falling number) inferior a 200.

2.1.2 Características Nutricionais do Trigo

Os alimentos derivados do trigo, tanto os básicos resultantes da moagem, quanto os industrializados com ingredientes adicionais estão largamente presentes nas mesas dos brasileiros.

São boas fontes de carboidratos, vitaminas, ferro, zinco, traços de outros elementos, e ainda, são considerados como uma das principais fontes de proteína na nutrição humana. São normalmente pobres em gordura e açúcar. Entre produtos incluem-se pães, biscoitos creme crackers, massas secas (macarrão, espaguete, etc.) frescas, recheadas, etc. e outros.

2.1.3 Proteínas do Trigo

Tradicionalmente, as proteínas do trigo são divididas em dois grupos, um deles formado pelas albuminas e globulinas (não formadoras de glúten), representando 15% das proteínas totais do trigo e outro, formado pela gliadinas e gluteninas (formadoras de glúten), que compreendem os 85% das proteínas do grão. As gliadinas e gluteninas combinadas possuem a propriedade de formar com água, associada à energia mecânica, uma rede tridimensional viscoelástica, denominada glúten, extremamente importante devido à sua capacidade de influenciar a qualidade dos produtos finais em panificação. Orth & Bushuk (1972) detectaram que a qualidade de panificação de uma farinha está intrinsecamente relacionada à qualidade das proteínas formadoras do glúten.

As proteínas formadoras do glúten apresentam diferenças estruturais que interferem na função que as frações protéicas desempenham na massa obtida com a farinha de trigo.

As gliadinas são um largo grupo de proteínas com propriedades similares. Têm a massa molar média de 40.000 Da e é extremamente pegajosa quando hidratada. Constituem-se de cadeias polipeptídicas simples (monoméricas) apresentando apenas ligações intramoleculares. Esta conformação confere uma baixa elasticidade a estas proteínas, as quais parecem ser as responsáveis pela coesividade da massa que formam (HOSENEY, 1998).

As gluteninas são um grupo heterogêneo de proteínas poliméricas formadas por subunidades ligadas por ligações dissulfeto. Essas subunidades podem ser divididas em dois grupos de acordo com suas massas molares: subunidade de glutenina de alta massa molar (HMW – GS) com massas molares entre 90-140 KDa (BUSHUK, 1994) e subunidades de glutenina de baixa massa molar (LMW – GS) cujas massas molares estão entre 40-50 KDa. (LEW et. al., 1992). São fisicamente, elásticas e flexíveis. A elasticidade é uma propriedade característica do glúten de trigo próprio para a panificação e, segundo HOSENEY (1990), nenhum outro cereal apresenta proteínas com capacidade para a formação de massa como a do trigo.

As proteínas do glúten são as proteínas de reserva do trigo. Elas são facilmente isoladas em forma relativamente pura, pois são insolúveis em água. Quando isolado a partir da farinha de trigo, o glúten contém (em base seca), aproximadamente 80% de proteína e 8% de lipídios, o restante é composto por carboidratos e cinzas.

O glúten é responsável pela estrutura do pão. Forma uma rede elástica e contínua que retém o gás carbônico liberado durante o processo de fermentação da massa pelas leveduras, permitindo, assim, sua expansão (MANDARINO, 1993). Acredita-se que as proteínas do glúten são responsáveis não apenas pelas propriedades viscoelásticas da massa de farinha de trigo, mas também pela capacidade de retenção de gás durante a fermentação, e ao menos em parte, pelo endurecimento da massa durante o cozimento (HOSENEY, 1998).

Ainda é desconhecido porque as proteínas do glúten interagem entre si para formar uma massa forte. Entretanto, vários fatores podem estar relacionados com essa capacidade, como: proporção glutenina-gliadina; distribuição média da massa molar, presença de certos grupos de glutenina com alta massa molar, e presença de certas subunidades de gliadina.

As proteínas classificam-se ainda de acordo com sua solubilidade: Hidrossolúveis (albuminas), solúveis em solução salina (globulinas), solúveis em álcool (prolaminas) e solúveis em solução ácidas e álcalis (glutelinas). A prolaminas e glutelinas do trigo são conhecidas como gliadinas e gluteninas, respectivamente (POMERANZ, 1987). As gliadinas são prolaminas monoméricas que podem ser divididas em três grupos com base no conteúdo de enxofre e massa molar: As α -, γ e ω -gliadinas. As gluteninas contem dois grupos de subunidades; os de baixa massa molar (LMW) e de alta massa molar (HMW) (SHEWRY *et al.*, 1986). As subunidades de gluteninas LMW têm pesos moleculares de 40000 a 50000. As subunidades de gluteninas HMW têm pesos moleculares de 95000 a 136000 (SHEWRY *et al.*, 1986). A massa molar de uma molécula de glutenina polimérica pode ser de vários milhões (WAHLUND *et al.*, 1996). As subunidades diferem em hidrofobicidade, sendo as LMW as mais hidrofóbicas e as MMW as menos hidrofóbicas (SEILMEIR *et al.*, 1987).

2.1.3.1 Proteínas Monoméricas

As proteínas monoméricas são aquelas que apresentam cadeias com ligações simples ou que apresentam em sua estrutura apenas ligações dissulfídicas intramoleculares. Existem três classes principais neste grupo de proteína: albuminas, globulinas e gliadinas.

Albuminas e globulinas são compostos com baixa massa molar, sendo na maioria enzimas ou enzimas inibidoras. Apresentam massa molar inferior aos encontrados para as gliadinas (< 30000 Da). A composição de aminoácidos difere das proteínas do glúten. Apresentam baixa quantidade de ácido glutâmico e muita lisina (MACRITCHIE & LAFIANDRA, 1997; GIANIBELLI *et al.*, 2001).

As gliadinas são prolaminas monoméricas que podem ser divididas em quatro grupos com base na mobilidade em “Acid-PAGE”, α -(mobilidade mais alta), β -, γ -, e ω -gliadinas (mobilidade mais baixa). A massa molar varia de 30000 a 40000 Da para os tipos α -, β - e γ -gliadinas, e 60000 a

80000 Da para o tipo ω -gliadinas. Apresentam extensivo polimorfismo podendo ser utilizadas na identificação de cultivares de trigo hexaplóide e tetraplóide (MECCHAM e KASARDA, 1978; MacRITCHIE e LAFIANDRA, 1997; GIANIBELLI et al, 2001).

As gliadinas são geralmente correlacionadas às características de viscosidade e extensibilidade do glúten. Embora, alguns autores associem gliadinas específicas com qualidade de panificação, estas proteínas não devem ter um efeito direto na qualidade do trigo em termos de força da massa (GIANIBELI et al, 2001). Segundo Pylar (1988) frações de gliadina com massa molar mais elevada afetam significativamente as propriedades de mistura e reológicas da massa de trigo.

2.1.3.2 Proteínas Poliméricas

Proteínas poliméricas são aquelas que apresentam ligações dissulfídicas intramoleculares e intermoleculares. São considerados três grupos principais, albuminas de alta massa molar, tritricinas e glutenina (SANTOS, 2008).

As gluteninas são proteínas poliméricas de elevada massa molar, variando de ≈ 100000 Da a milhões Da. São formadas por dois grupos de subunidades, as de baixa massa molar (LMW-GS) e de alta massa molar (HMW-GS) (SHEWRY *et al.*, 1986). As subunidades de gluteninas LMW-GS se subdividem de acordo com a mobilidade em SDS-PAGE em dois grupos, subunidade B e C, com peso molecular igual a 40000Da e 50000Da, respectivamente (SING e SHEPERD, 1988). As subunidades de gluteninas HMW-GS ou tipo-A têm massa molares de 95000 a 136000 Da (SHEWRY *et al.*, 1986).

As subunidades LMW-GS representam 60% do total de gluteninas presente no endosperma do trigo, entretanto recebem menos atenção por parte dos pesquisadores que as HMW-GS. Isto ocorre em parte pela similaridade de massas molares com as gliadinas o que dificulta a identificação em SDS-PAGE unidimensional (BIETZ e WALL, 1973; GIANIBELLI et al, 2001) A composição de aminoácidos e a estrutura das LMW-GS são consideradas similares as γ -gliadinas (KASARDA, 1989).

As subunidades de HMW-GS embora seja um dos componentes minoritários das proteínas do endosperma de trigo são primordiais no processo de panificação, por ser o principal determinante da elasticidade do glúten (TATHAM et al 1985). Muitas variedades apresentam quatro ou cinco subunidades de HMW-GS. Frequentemente elas diferem em mobilidade em SDS-PAGE podendo ser divididas em tipo x e y (PAYNE et al., 1984). Em variedades com cinco subunidades, três delas apresentam elevada mobilidade (subunidade x) e duas de baixa mobilidade (subunidade y). Em variedades com quatro subunidades, duas são tipo y e duas x (KASARDA, 1989). Subunidades de HMW-GS apresentam conteúdo elevado de prolina e glicina e baixo conteúdo de lisina.

2.2 Técnicas de Fracionamento em Proteínas

Osborne (1907) realizou uma das primeiras reportagens científicas no fracionamento das proteínas dos cereais. Por adição de uma solução salina à farinha, as frações de albumina e globulina foram extraídas. A partir desse extrato, as globulinas foram precipitadas por diálise. Em um passo seguinte, as prolaminas foram extraídas com solução aquosa de etanol (70%) e as gluteninas foram posteriormente extraídas por uma solução de ácido acético diluído. Essas frações foram denominadas de “Classes Protéicas de Osborne”. Mais tarde, outros procedimentos de fracionamento foram desenvolvidos com diferentes solventes, como uréia (POMERANZ, 1965), dodecil sulfato de sódio (SDS) (DANNO et. al., 1982; BOTTOMLEY et. al., 1982), bem como, outras técnicas foram utilizadas, que não baseadas na solubilidade das proteínas, como as que seguem.

2.2.1 Flow Field Flow Fractionation

“Flow Field-Flow-Fractionation” (flow FFF) é uma técnica que permite o fracionamento de macromoléculas por tamanho. A separação é atingida pela eluição dos componentes através de um canal fino em forma de fita, sujeito a um campo (centrífugo, elétrico ou térmico) perpendicular ao fluxo do canal. Componentes que apresentam maior resposta à força exercida pelo campo são deslocadas para regiões distantes do centro, em direção à parede do canal. Uma vez que o fluxo laminar através do canal produz um perfil parabólico, a ordem de eluição dos componentes é determinada pela posição relativa. A linha de fracionamento, a resolução e o tempo de corrida podem ser ajustados variando o fluxo do canal e a força do campo.

Flow FFF foi aplicado para o fracionamento de proteínas do trigo por Stevenson e Preston em 1995. Os estudos demonstraram claramente o tamanho extremamente grande dos maiores polímeros de glutenina e o potencial promissor da flow FFF para a caracterização das gluteninas poliméricas na farinha de trigo. Entretanto, é necessário o fracionamento da glutenina em suas subunidades para a aplicação desta técnica. Adicionalmente, o tamanho reduzido das amostras utilizadas na técnica (aproximadamente 1 µg) pode ser uma desvantagem quando o isolamento da proteína é solicitado para estudos posteriores (STEVENSON & PRESTON, 1995).

2.2.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica valiosa na quantificação da composição de proteínas. A aplicação de CLAE para proteínas de cereais foi iniciada por Bietz em 1986. Em combinação com ultrassom, a CLAE por exclusão molecular é uma técnica poderosa para caracterização de proteínas do trigo (MacRITCHIE, 1999).

A técnica tem sido extensivamente utilizada em estudos de proteínas do endosperma de cereais, particularmente no trigo, para analisar a distribuição molar das proteínas poliméricas (Gupta et al. 1993), alguns parâmetros como a percentagem de proteínas poliméricas (PPP), percentagem de gliadinas (PG), relação glutenina/gliadina (GLU/GLI), proteínas poliméricas na farinha (FPP), e percentagem de proteínas poliméricas não extraíveis (%UPP), e parâmetros utilizados para medir a qualidade da farinha em panificação (HUEBNER & WALL, 1976; DACHKEVITCH & AUTRAN, 1989; MacRITCHIE & LAFIANDRA, 1997).

O princípio de separação baseia-se na habilidade de um componente em penetrar os poros do empacotamento na coluna de extração. Moléculas com diâmetros menores penetram nos poros menores, inacessíveis àquelas de maiores diâmetros, sendo assim separadas. A dificuldade reside em separá-la da farinha, em forma intacta ou nativa, para que possa ser devidamente caracterizada em termos funcionais.

Assim como na Flow-FFF, nessa técnica existe a necessidade de quebrar a proteína em suas subunidades, o que impossibilita estudos de suas propriedades em seu estado nativo. Tal condição tem levado à necessidade do desenvolvimento ou melhoria de uma técnica de separação que possibilite a extração da proteína em condições que mantenham a sua estrutura evitando seu fracionamento e a conseqüente perda da funcionalidade.

2.2.3 Sistemas Aquosos Bifásicos

O primeiro pesquisador a detectar e relatar a possibilidade de formação de duas fases em que o principal constituinte de ambas é a água foi Beijerinck, em 1896.

Ao misturar ágar e gelatina, em água, observou a formação de duas fases: uma inferior rica em ágar e uma superior rica em gelatina. Posteriormente, obteve a formação de fases aquosas com um sistema água-amido-ágar. Porém, apenas em 1956 Albertsson iniciou os estudos sobre a partição de compostos de origem biológica por meio de tais sistemas e descreveu uma série de compostos que, quando em solução aquosa, promovem a formação de fases; normalmente, pares de polímeros ou um polímero e um sal cujas soluções apresentam miscibilidade parcial entre si.

Desde então, as pesquisas na área têm-se aprofundado, tornando a utilização dos SABs, importante ferramenta na partição e concentração de compostos como células vegetais ou animais, microorganismos, fungos e seus esporos, cloroplastos, enzimas, proteínas, vírus, entre outros (HATTI-KAUL, 2001), de maneira que se têm acumulado conhecimentos sobre características de partição de diversas substâncias nesses sistemas.

Os Sistemas Aquosos Bifásicos são capazes de promover a partição de solutos em um meio pouco agressivo de forma que substâncias, como, macromoléculas, partículas virais, fragmentos de

células ou mesmo organelas celulares possam ser particionadas e purificadas sem perda de atividade biológica. A descrição de diversos SABs tipo polímero-polímero e polímero-sal, com representativo número de dados para o equilíbrio de fases e partição/purificação de diferentes compostos, é encontrada na literatura (ALBERTSSON, 1971; ZASLAVSKY, 1995).

Os SABs são formados por duas fases líquidas que se encontram em equilíbrio termodinâmico. Resultam, por exemplo, da incompatibilidade de dois polímeros em soluções, como polietilenoglicol (PEG) e dextrana ou entre um polímero e um sal (PEG e Fosfato de Potássio) (COIMBRA, 1995; ALBERTSSON, 1986). Essas espécies químicas quando misturadas em determinadas composições e temperaturas, dividem-se em duas fases de composições diferentes, porém em equilíbrio termodinâmico. As fases possuem propriedades termodinâmicas intensivas distintas, como índice de refração, composição e densidade. Essas fases são separadas por uma interface que é a região onde as propriedades termodinâmicas intensivas de cada fase transitam para valores diferentes, sempre tendendo ao valor daquela propriedade no seio da outra fase em equilíbrio (CARVALHO, 2004). A purificação é resultado de uma partição diferenciada da molécula-alvo e impurezas entre as duas fases líquidas.

Dentre os diferentes SABs, o mais estudado e comumente empregado é aquele composto por PEG, dextrana e água. Separações de macromoléculas biológicas, membranas celulares e células, realizadas com esses sistemas, geram uma fase superior rica em PEG, e outra inferior rica em dextrana. As fases contêm entre 80% e 90% de água o que favorece a estabilidade de biomoléculas durante a separação, quando comparada com sistemas de extração orgânicos tradicionais (TJERNELD, 1992). Os SABs apresentam ainda, outras vantagens em relação aos métodos de separação e purificação de biocompostos, como: simplicidade e rapidez na preparação; baixo custo e possibilidade de aplicação em grande escala e ainda, permite concentrar a proteína de interesse em uma das fases controlando o volume das mesmas.

As biomoléculas, ou solutos, presentes nos SABs distribuem-se entre as duas fases aquosas segundo o coeficiente de partição, K_r , definido como:

$$k_r = \frac{[M]_{\text{sup.}}}{[M]_{\text{inf.}}} \quad (1)$$

Onde $[M]_{\text{sup.}}$ e $[M]_{\text{inf.}}$ são as concentrações do soluto na fase superior e inferior. Essa distribuição é governada por um grande número de fatores, tais como: natureza e tamanho da partícula alvo; constituição, tamanho e estrutura molecular do polímero; temperatura; natureza do eletrólito e pH do sistema (ALBERTSON, 1986).

O K_r depende tanto das características da biomolécula que se distribui (massa molar, carga, hidrofobicidade superficial, etc.) quanto da natureza do SAB usado, como reagentes que formam as fases, massa molar, concentração dos reagentes, pH, força iônica, entre outras. Embora a manipulação das propriedades do sistema, tornando predominante um tipo de interação, venha a ser uma forma de controlar a partição, a predição e a interpretação da partição de biopartículas em sistemas aquosos bifásicos ainda é uma difícil tarefa (HATTI-KAUL, 2001).

Os SABs podem ser classificados em dois grupos principais: os compostos por diferentes polímeros e os que contêm apenas um polímero. A tabela 2 apresenta alguns exemplos de SABs.

Tabela 2: Sistemas aquosos bifásicos típicos

Polímero	Polímero
Polietileno glicol	Dextrana (Dx) Ficoll Hidroxipropil-amino (HPS) Polivinil álcool (PVA) Polivinil pirrolidona (PVP) Maltodextrina (MD)* Maltodextrina**
Polipropileno glicol	Polietileno glicol (PEG)
Polímero	Sal
PEG-copolímeros	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $\text{NH}_2\text{CO}_2\text{NH}_4$ Na_2HPO_4 K_2CO_3 K_3PO_4 $\text{K}_2\text{HPO}_4, \text{KH}_2\text{PO}_4$ Na_2SO_3 FeSO_4

(ROGERS, 1999; MACHADO, 1999).

Em princípio, todos os tipos de SABs podem ser empregados na separação de biomoléculas, embora para uso em escala industrial, a dextrana apresente custo muito alto. Os sistemas PEG - Sais

apresentam custo reduzido e propriedades físicas favoráveis à operação em larga escala, como por exemplo, elevada seletividade e diferenças de densidade e viscosidade entre as fases adequadas para o trabalho com equipamentos de extração disponíveis no mercado (SINHÁ, 1996). A separação de fases é atingida mais rapidamente em função da menor densidade da fase salina em relação à fase polimérica, o que facilita o uso de sistemas polímero-sal em aplicações industriais. Estes sistemas são formados a temperatura ambiente, sendo a fase superior rica em PEG e a fase inferior rica em sal (HUSTED, 1985; ZUÑIGA, 2000). A purificação de proteínas, em grande escala, empregando SABs em uma das etapas do processo é considerada uma técnica alternativa e economicamente viável aos processos tradicionais de purificação de biomoléculas.

Algumas aplicações de SABs são listadas na tabela 3.

Tabela 3: Aplicações de extração de biomoléculas com SAB

Biomolécula	Sistema
Pululanase	PEG-Dx
Formaldeído desidrogenase	PEG-Dx
Fumarase	PEG-fosfato
β -galactosidade	PEG-fosfato
α -glucosidade	PEG-fosfato
Superóxido dismutase	PEG-fosfato
Lactato desidrogenase	PEG-aquafase

(COIMBRA, 2003).

2.2.3.1 Fundamentos sobre a formação dos SABs

A formação de duas fases durante o processo de mistura de soluções aquosas de dois polímeros (ou de um polímero e de um sal) dependerá das interações intermoleculares - expressas em termos da energia livre - entre os constituintes formadores do sistema. Serão também estas mesmas interações as responsáveis por todas as propriedades físico-químicas presentes nas duas fases, como por exemplo, a distribuição dos diferentes componentes no sistema, da relação de volumes entre as fases, da diferença de potencial elétrico e do excesso de energia livre associados à interface, do coeficiente de partição de um soluto específico, etc. (DA SILVA & LOH, 2006).

Para cada sistema, têm-se pares de componentes que possuirão interações termodinamicamente favoráveis e pares que gerarão interações que aumentarão a energia livre do

sistema e, por isto, serão consideradas desfavoráveis. Naturalmente estas interações serão dependentes do estado termodinâmico do sistema, isto é, da composição, temperatura e pressão (DA SILVA & LOH, 2006).

Para que ocorra a separação de fases entre duas soluções aquosas de polímeros é necessário que a energia livre de Gibbs do sistema, quando os polímeros estão em fases distintas, seja minimizada.

O critério termodinâmico fundamental para o equilíbrio de fases é a igualdade dos potenciais químicos ou eletroquímicos dos componentes em todas as fases do sistema (SMITH et al., 2000; LEVINE, 1995).

Existem na literatura muitos modelos para representar o comportamento de fases dos SAB's. Estes têm sido desenvolvidos para descrever o mecanismo de separação de fases na ausência de dados experimentais. Esta tentativa visa facilitar a compreensão das interações que governam a partição de solutos e partículas em sistemas aquosos bifásicos (ZASLAVSKY, 1995).

O mecanismo molecular para a formação dos sistemas aquosos bifásicos que será apresentado a seguir foi proposto por Da Silva & Loh (2000) para sistemas formados por PEG 3350, sulfato de lítio ou sulfato de sódio e água. Este modelo é fundamentado em dados calorimétricos e em dados de equilíbrio.

Para uma melhor compreensão do mecanismo proposto, deve-se conhecer a estrutura molecular do polímero, no caso do presente trabalho, o polietilenoglicol (PEG) [HO-(CH₂-CH₂-O)_n-H]. O polietileno glicol, (Figura 2), é formado por unidades de óxido de etileno, em que cada unidade contém sítios ativos (oxigênios portadores de pares de elétrons livres), onde são formadas as interações com as moléculas de água e com os íons dissociados do sal (cátions e ânions).

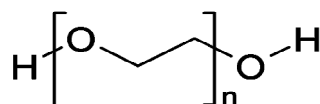


Figura 2: Fórmula estrutural do polietilenoglicol.

Quando inicialmente, PEG, sal e água são misturados, uma solução é formada em decorrência da energia livre de Gibbs (G) da solução ser menor do que o somatório das energias livres de Gibbs dos componentes puros, como relacionado pela Equação :

$$G_{sol} < G_{peg}^* + G_{sal}^* + G_{água}^* \quad (2)$$

sendo G_{sol} a energia livre de Gibbs; da solução, o asterisco corresponde à cada componente no seu estado puro.

Quando em determinada proporção os três componentes são misturados, forma-se um sistema aquoso bifásico. As duas fases líquidas serão formadas após o tempo necessário para que o equilíbrio seja atingido. A formação do SAB ocorre, pois o somatório da energia livre de Gibbs de cada fase é menor do que a energia livre de Gibbs do sistema homogêneo naquelas concentrações de polímero e de sal (Equação 3).

$$G^a + G^b < G_{sol} \quad (3)$$

sendo G^a e G^b as fases do sistema aquoso bifásico.

Desta forma, pode-se dizer que os SAB's são formados para diminuir a G de uma solução aquosa de PEG, sal e água, pois em determinadas proporções destes componentes, o sistema formado por duas fases separadas apresenta menor nível energético, sendo mais favorável do que a solução. Sabendo-se que G é função da entalpia e da entropia, pode-se concluir que são estas duas propriedades termodinâmicas que determinam a separação das fases em sistemas aquosos bifásicos. Os SAB's são formados a partir da compensação dos fatores entálpicos e entrópicos de forma que se minimize a energia livre de Gibbs, à temperatura e pressão constantes.

Para que a análise entálpica de SAB's compostos por polímero-sal-água seja feita, deve-se comparar os tipos e magnitudes das interações intermoleculares antes e depois da separação das fases. Primeiramente, para que ocorra a mistura dos componentes puros, é necessário o rompimento das interações entre as moléculas de água (água-água), assim como das interações entre as moléculas do polímero (PEG-PEG) e do sal (íon-íon). Para romper estas interações, deve-se fornecer energia ao sistema. E, à medida que estas interações são quebradas outras interações são formadas, com liberação de energia, como as interações PEG-água, íon-água e PEG-íon. Desta forma:

$$\Delta_{sol}H = \underbrace{\Delta_{a-a}H + \Delta_{p-p}H + \Delta_{s-s}H}_{\text{endotérmicas} \dots} + \underbrace{\Delta_{a-p}H + \Delta_{a-s}H + \Delta_{p-s}H}_{\text{exotérmicas}} \quad (4)$$

sendo ΔH a variação da entalpia. O subscrito *a-a* corresponde às interações entre as moléculas de água, *p-p* entre as moléculas do polímero, *s-s* entre as moléculas do sal, *a-p* entre a água e o polímero, *a-s* entre a água e o sal e *p-s* entre o polímero e o sal.

E, segundo dados experimentais de entalpia de solução, a dissolução de eletrólitos em solução aquosa de PEG é um processo exotérmico (DA SILVA & LOH, 2000). Isto significa que na formação de uma solução aquosa de PEG e sal a liberação de energia na formação das interações (PEG-água, íon-água e PEG-íon) é maior do que a quantidade de energia absorvida na quebra das interações entre os componentes puros.

Para avaliar o efeito entrópico, deve-se analisar a entropia de duas maneiras: em relação à configuração (número de formas diferentes de se arranjar as moléculas na solução) e em relação à conformação (estrutura molecular).

Quando se mistura PEG, sal e água aumenta-se a entropia configuracional do sistema em relação aos componentes nos estados puros, pois o aumento do tipo e da quantidade de substâncias aumenta o número de formas diferentes de se arranjar as mesmas na solução. No entanto, as interações PEG-água são caracterizadas pela formação de camadas de solvatação ao redor das moléculas de PEG, diminuindo a entropia translacional das moléculas de água. O mesmo é válido quando as interações íon-água são estabelecidas, ou seja, o grau de liberdade translacional das moléculas de água diminui devido à solvatação dos íons do sal. Mas, como ao mesmo tempo são formadas interações íon-PEG, a entropia configuracional do sistema aumenta, ou seja, para que os íons se aproximem da cadeia do polímero, as moléculas de água que antes solvavam os íons e o PEG devem ser afastadas (quebrando as camadas de solvatação e liberando as moléculas de água no meio) possibilitando a aproximação do sal com o polímero e a interação íon-PEG. À medida que as moléculas de água são liberadas das camadas de solvatação, o grau de liberdade translacional das mesmas aumenta, com conseqüente incremento da entropia configuracional do sistema.

A entropia conformacional do polímero irá variar com a sua concentração na solução. Em soluções diluídas do polímero, as ligações carbono-carbono estão na forma TRANS, devido à sua interação com as moléculas de água, tornando a cadeia da macromolécula linear. Ao concentrar uma solução polimérica, a conformação muda espontaneamente para a forma CIS, pois as ligações passam da forma TRANS para a CIS (enovelada e mais energética) aumentando a diferença de entropia entre as fases do sistema (CARVALHO, 2004).

A partir da definição da energia livre de Gibbs pode-se vincular os efeitos entálpicos e entrópicos:

$$\Delta_{mix}G = \Delta_{mix}H - T\Delta_{mix}S \quad (5)$$

sendo H a entalpia, S a entropia, T a temperatura e o subscrito *mix* relativo à mistura.

Desta forma, a variação da entalpia de solução na formação da solução aquosa de PEG e sal é exotérmica, ou seja, negativa e favorável para a minimização de G, mas ainda não se sabe se a entropia do sistema é positiva ou negativa. Então, se pode dizer apenas que para que ocorra a formação da solução aquosa de PEG e sal é necessário que a compensação dos fatores entálpicos e entrópicos resulte na minimização da G.

Para que ocorra a separação de fases na solução deve-se aumentar a concentração do sal até que ocorra a saturação do polímero pelo sal. Esta saturação não implica que todos os sítios do PEG

estejam ocupados pelos íons do sal, mas sim que o sistema atingiu um estado energético no qual a formação de mais interações PEG-sal não é favorável. O ponto de saturação é aquele em que a densidade de cargas elétricas (dos cátions e ânions) ao longo da cadeia do polímero atingiu um ponto máximo. Este estado energético desfavorável, que leva à saturação do polímero, pode ser explicado pelo surgimento de forças de caráter repulsivo devido à aproximação de cargas de mesmo sinal ou devido a mudanças na estrutura molecular da macromolécula. As variações na estrutura molecular do polímero, e então na entropia conformacional do mesmo, podem ser provocadas por alterações na concentração da solução.

A adição de sal ao sistema saturado faz com que os íons fiquem livres na solução e voltem a ser solvatados pelas moléculas de água provocando a diminuição da entropia do sistema, com conseqüente aumento da G . Neste ponto, o estado energético da solução aquosa de PEG e sal não é mais favorável. O sistema, então, divide-se em duas fases, formando o SAB, sendo cada fase uma solução aquosa de polímero e sal. Na maioria dos sistemas formados, o componente em maior quantidade nas duas fases é a água, estando na sua maioria livre na solução, aumentando a entropia do sistema. As moléculas de água foram liberadas das camadas de solvatação ao redor do PEG e do sal para que novas interações, principalmente do tipo PEG-PEG na fase superior e íon-íon na fase inferior, pudessem ser formadas, o que aumenta a entropia do sistema.

A dissolução de eletrólitos em solução aquosa de PEG é um processo exotérmico, entretanto no momento em que ocorre a saturação do PEG pelo sal ocorre um aumento da entalpia, caracterizado por uma descontinuidade (ou seja, um salto) na curva que representa a entalpia de dissolução do sal em uma solução de PEG (DA SILVA & LOH, 2000). Por conseguinte, para minimizar a G e formar o SAB, considerando que a variação da entalpia neste processo é positiva e desfavorável, pode-se dizer que a variação da entropia deve ser positiva. Por conseguinte, a formação de SAB's é governada por fatores entrópicos.

A mesma análise pode ser feita para a adição de PEG ao sistema, considerando que a proporção PEG/sal necessária à saturação é a mesma nos dois casos. A soma de G da fase superior com a G da fase inferior, e ainda com a G da interface (onde existe um excesso de energia em relação às duas fases) é ainda menor do que a energia livre de Gibbs da solução.

2.2.3.2 Diagrama de fases

Para a utilização de SAB é necessário o conhecimento do comportamento das fases nos sistemas. Para isto são construídos diagramas de fases para os componentes, nos quais as composições dos constituintes para a separação das fases são determinadas.

Nestes diagramas têm-se inúmeras informações, todas relacionadas à minimização da energia livre do sistema. Por exemplo, pode-se obter em quais composições globais o sistema é monofásico ou bifásico, sendo estas duas regiões demarcadas por uma linha denominada curva binodal. Também são representadas as linhas de amarração ("tie lines"), que são retas que ligam pontos no diagrama que representam à composição das duas fases em equilíbrio. Qualquer conjunto de pontos que pertençam à região bifásica e que estejam sobre a mesma linha de amarração fornecerá fases superiores que possuem propriedades termodinâmicas intensivas iguais (densidade, volume molar, entalpia molar, etc.), entretanto, sendo distintas as suas variáveis termodinâmicas extensivas (massa, volume, etc). Aplica-se o mesmo raciocínio para as fases inferiores formadas a partir de composições globais localizadas sobre uma mesma linha de amarração (DA SILVA & LOH, 2006).

A Figura 3 apresenta um exemplo de diagrama de fases mostrando a composição das fases em equilíbrio. Convencionalmente, os componentes presentes em maior quantidade nas fases inferior e superior são representados no eixo das abscissas e das ordenadas, respectivamente. A quantidade de água é calculada por diferença. A curva que divide a região em duas fases é chamada de curva binodal ou curva de equilíbrio. A região acima da curva binodal é chamada de bifásica e a abaixo, monofásica.

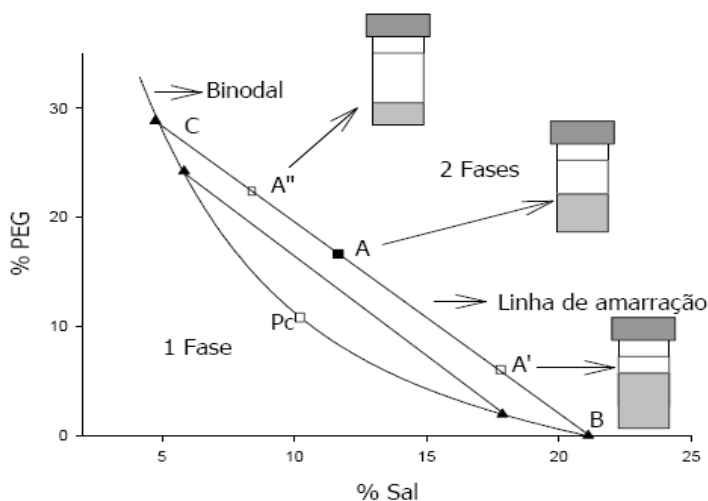


Figura 3: Diagrama de fases genérico para um sistema contendo PEG e sal, expresso em coordenadas retangulares.

Para se estudar a separação de fases em SAB, faz-se uso de uma medida numérica de referência para a composição das fases. O comprimento da linha de amarração, usualmente referido como TLL, é um valor empírico adequado para a utilização como tal medida. O comprimento da

linha de amarração, TLL, é um importante parâmetro termodinâmico, geralmente utilizado como variável determinante dos processos de partição dos solutos em SABs formados por diferentes componentes e é calculado pela Equação:

$$TLL = \sqrt{[\Delta PEG]^2 + [\Delta Sal]^2} \quad (6)$$

onde onde $[\Delta PEG]$ e $[\Delta Sal]$ correspondem a diferença de concentração de PEG e sal nas fases superior e inferior expressa em % em massa, respectivamente. Com o aumento do valor do parâmetro TLL, aumenta-se a diferença entre a fase superior e a inferior, em termos de propriedades termodinâmicas intensivas

Outra característica importante dos diagramas de fases é a inclinação da linha de amarração, usualmente definido como STL. A STL 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:

$$STL = \frac{\Delta PEG}{\Delta Sal} \quad (7)$$

onde $[\Delta PEG]$ e $[\Delta Sal]$ foram definidas acima.

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

2.2.3.3 Constituintes das fases dos SABs

2.2.3.1 Polietilenoglicol (PEG)

O polietilenoglicol, $HO-(CH_2-CH_2-O)_n-H$, é um polímero sintético, não iônico que juntamente com os outros polímeros sintéticos, constitui a base para as indústrias de plásticos, embalagens, fibras, adesivos, tintas e esmaltes (MURRAY & JENKINS, 1994).

Devido ao seu caráter não tóxico, pode também ser usado em cosméticos, alimentos e produtos farmacêuticos. O PEG teve sua utilização em alimentos aprovada pelo FDA (Food and Drug Administration), por ser considerado não antigênico e não imunogênico. A indústria de alimentos regulamentou sua utilização como veículo em adoçantes de mesa (Portaria n 38, de 13 de janeiro de 1998) e suplementos vitamínicos e/ou minerais (Resolução RDC n 2, de 2 janeiro de 2001) (COIMBRA, 1995).

Pode ser empregado na separação de macromoléculas biológicas por meio de extração líquido-líquido e de precipitação; é considerado um excelente agente precipitante na produção de cristais de proteínas, etapa decisiva na determinação da estrutura molecular das mesmas (ANNUNZIATA et al, 2002).

2.2.3.2 Sais

Os sais normalmente usados para formação das fases são o Sulfato de Sódio, Sulfato de Lítio, Fosfato de Potássio monobásico e Fosfato de Potássio dibásico.

O sulfato de Lítio (LiSO_4), possui solubilidade de $356,4 \text{ g L}^{-1}$, em água a $18 \text{ }^\circ\text{C}$. É um componente de interesse tecnológico com aplicações na detecção de radiação a laser, como um elemento ótico de transmissão de imagens, na fabricação de cristais de alta resistência e na indústria farmacêutica. Em elevadas temperaturas, apresenta altos valores de condutividade iônica, o que torna possível a sua aplicação na armazenagem de energia e em sistemas de conversão. Pode ser recuperado de soluções através da adição de agentes precipitantes (como anti-solventes), sendo esta, uma alternativa para a técnica de cristalização por congelamento e vaporização (TABOADA, 2002).

O sulfato de Sódio (Na_2SO_4) é um sal branco, cristalino, com solubilidade em água de $168,6 \text{ g L}^{-1}$ a $18 \text{ }^\circ\text{C}$. Apresenta pH entre 5,2 e 9,2 a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ quando em solução de 50 g L^{-1} de sulfato de sódio em água (MERCK, 2004). Possui larga aplicação industrial e em particular nas indústrias têxtil, de papel, detergente e vidro.

O Fosfato de Potássio dibásico (K_2HPO_4) é branco, higroscópico, solúvel em água e ligeiramente solúvel em álcool. Pode ser convertido em pirofosfato por ignição. A solução aquosa formada com este sal é ligeiramente alcalina (pH entre 8,7 e 9,3 quando em solução de 50 g/L de água). Possui solubilidade em água igual a 1600 g L^{-1} a 20°C (SIGMA-ALDRICH, 2001). O fosfato de potássio monobásico (KHPO_4) também possui a cor branca e é granulado. Apresenta solubilidade em água igual a 222 g L^{-1} a 20°C . É insolúvel em álcool. Apresenta pH entre 4,4 e 4,7 quando em solução de 50 g L^{-1} de água.

2.2.4 Partição de Proteínas em SABs

Em geral, a distribuição de proteínas entre as duas fases aquosas dos SABs é caracterizada por um parâmetro denominado coeficiente de partição, K_r (DA SILVA & LOH, 2006).

Inúmeras propriedades físico-químicas do sistema e da proteína determinam o valor de K_r . Exemplos de fatores associados à proteína que influenciam sua distribuição entre as fases são: o tamanho, a conformação (estruturas secundária, terciária e quaternária) e a composição (estrutura primária), presença de carga elétrica e hidrofobicidade (COLLEN et. al., 2001). Existem ainda propriedades importantes das fases que contribuem nesta distribuição, como por exemplo, a natureza química dos componentes formadores dos SABs (DA SILVA et. al., 2001), a massa molar e a concentração dos polímeros, a presença de ligantes ao longo da cadeia polimérica que possam interagir especificamente com sítios da proteína (BROOKS et. al., 1994), pH e temperatura (WAZIRI et. al., 2004).

Os mecanismos que governam a partição de materiais biológicos não são ainda entendidos por completo. Sabe-se que o coeficiente de partição é resultante de forças de Van der Waals, hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e interações iônicas das biomoléculas com as fases do sistema (GUNDUZ & KORKMAZ, 2000).

2.2.4.1 Variáveis que Influenciam a Partição de Proteínas em SABs

Inúmeras são as variáveis que influenciam a partição de biomoléculas entre duas fases dos SABs. Estas podem ser classificadas como variáveis inerentes ao próprio sistema (por exemplo: componentes do sistema, massa molar do polímero, concentração do polímero ou do sal, pH e temperatura) ou à proteína alvo (por exemplo: hidrofobicidade, distribuição de cargas, ponto isoelétrico e massa molar) (COSTA et. al., 1998; COSTA et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2001; OLIVEIRA et. al., 2003; TUBIO et al., 2004).

Entretanto, ao se fazer um estudo da partição de biomoléculas é necessário conhecer os dados de equilíbrio para todos os sistemas. Para cada sistemas, seja polímero/polímero ou polímero/sal existe um diagrama de fases que define as proporções entre os componentes formadores das fases (SOUZA, 2008). Alguns desses diagramas estão disponíveis na literatura (ALBERTSSON, 1986).

2.2.4.1.1 Efeito da Massa Molar (MM) do polímero sobre a Partição

A massa molar do polímero exerce influência sobre a partição, alterando o equilíbrio e o número de interações entre o polímero e a proteína.

Em geral, o aumento da MM do polímero, que enriquece uma das fases, causará a migração do biocomposto para a outra fase. Entretanto, este efeito diminui com o aumento da cadeia polimérica. O efeito da alteração da MM do polímero é por sua vez dependente da MM da proteína a ser particionada. Proteínas de grandes MMs, são mais influenciadas por mudanças da MM do polímero do que as proteínas com baixas MMs. Por exemplo, ALBERTSSON (1986), usando os sistemas PEG 6000 + Dex 40 e PEG 6000 + Dex 500 para partição do citocromo C, observou que o coeficiente de partição da biomolécula foi pouco afetado (de 0,18 para 0,17) com a elevação da MM da dextrana. Já para a β -galactosidase, de maior MM que o citocromo C, o coeficiente de partição aumentou de 0,24 para 1,59 nas mesmas condições. Polímeros com diferentes MMs podem ser usados para otimizar a separação de proteínas de tamanhos variados.

MACHADO (1999), utilizando um sistema PEG + Maltodextrina (MD) para partição de células microbianas, observou que, com o aumento da MM do PEG, as células migraram para a fase inferior, rica em MD, diminuindo o K_r . Um aumento da MM do PEG de 4.000 para 8.000 Da provocou um decréscimo de 70 vezes no valor do coeficiente de partição.

GIRALDO-ZUÑIGA et. al. (2001), empregando em SAB formado por PEG + fosfato de potássio (FFP) para a separação de proteínas do soro de queijo, observaram que os coeficientes de partição da α -la diminuíram com o aumento da MM do PEG. Para a β -Ig foi verificada uma tendência inversa, isto é o crescimento de K com a elevação da MM do PEG, exceto para PEG 8.000.

2.2.4.1.2 Efeito da Concentração dos polímeros sobre a Partição

Partículas como organelas e células fragmentadas são adsorvidas mais fortemente na interface de SAB com o aumento da concentração dos polímeros. A elevação na concentração dos polímeros normalmente provoca o deslocamento da curva binodal e do ponto crítico além de alterar a composição das fases. Como resultado, substâncias solúveis, a exemplo de proteínas, são distribuídas preferencialmente para uma das fases, modificando assim o coeficiente de partição (ALBERTSSON et. al., 1990).

Na avaliação da partição de células microbianas em SAB formados por PEG 4000 + MD, MACHADO (1999) observou que o aumento da concentração de PEG diminuiu K_r , ou seja, quanto maior a concentração de PEG maior número de células de microbianas migraram para a fase inferior, rica em maltodextrina.

2.2.4.1.3 Efeito do Potencial Hidrogeniônico sobre a Partição

O Potencial Hidrogeniônico (pH) altera as cargas da superfície das proteínas e, conseqüentemente, o seu coeficiente de partição (LEHNINGER, 1976). Um exemplo clássico é a

desnaturação de proteínas devido à redução do 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. SCHMIDT et al (1994), constataram o aumento do K_r da α -amilase, de 0,7 para 20, com a elevação do pH de 5,3 para 9,5. 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 (ALBERTSSON, 1986). Como regra geral às 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.

2.2.4.1.4 Efeito da Adição de Sais sobre a Partição

A presença de sais em SAB polímero + polímero, é importante para o sucesso da partição de praticamente todas as espécies de moléculas e partículas celulares (ASENJO, 1990). 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. Em 1986, estudou com detalhes a influência da adição de diferentes tipos de sais sobre o coeficiente de partição de proteínas em SAB formado por PEG + Dextrana.

A adição de sais, em SABs poliméricos, em concentrações de (0,1 a 0,2) mol/L, gera uma diferença de potencial entre as fases, resultante da preferência dos íons salinos por uma das fases. A presença de cátions e de ânions monovalentes diminuiu o K de proteínas carregadas negativamente nas ordens $\text{Li}^+ < \text{NH}_4^+ < \text{Na}^+ < \text{Cs}^+ < \text{K}^+$ e $\text{F}^- < \text{Cl}^- < \text{Br}^- < \text{I}^-$, respectivamente. Para proteínas carregadas positivamente a ordem acima é invertida. A presença de ânions divalentes fosfato, sulfato e citrato aumentaram o K_r da proteína relativo aos ânions monovalentes (ALBERTSSON et al, 1990). No caso de células microbianas, para sistemas PEG 400 + MD, foi verificado que o K diminuiu com a adição de sal. Quando foi feita a adição de 0,9% de NaCl, o K_r das células caiu drasticamente de 0,84 para 0,08 (MACHADO, 1999).

Segundo Hatti – Kaul (2001), a contribuição do ânion é mais importante do que do cátion na indução da formação de fases. Este comportamento pode ser analisado considerando dois cátions (ou dois ânions) de mesma valência. Considerando dois íons de raios diferentes e, portanto diferentes densidades de cargas, o íon de menor raio (e maior densidade de cargas) irá interagir como PEG em maior proporção favorecendo a interação sal - PEG, resultando na maior quantidade de sal necessária à saturação da cadeia do polímero e na diminuição da região bifásica (CARVALHO, 2004).

Han e Lee (1997) observaram, para SAB PEG + Dex, que a incorporação de sais de fosfato ocasionou uma redução do K_r da BSA (Albumina de Soro Bovino) cuja superfície é carregada negativamente. No entanto o K_r da lisozima, que é carregada positivamente, aumentou com a adição de fosfato.

2.2.4.1.5 Efeito da Carga dos polímeros sobre a Partição

Polietilenoglicóis carregados ionicamemente, têm sido usados para direcionar a partição de proteínas. Carregados positivamente, como na forma de trimetilamina-PEG (TMA-PEG), concentram compostos com carga negativa na fase superior, rica em PEG. Os compostos com carga positiva são então excluídos da fase rica em PEG. Polietilenoglicóis carregados negativamente apresentam uma tendência de atuação inversa (ALBERTSSON, 1986).

2.2.4.1.6 Efeito dos Grupos hidrofóbicos sobre a Partição

Quando são usadas baixas concentrações de PEG carregados com grupos hidrofóbicos (em torno de 1 mM), como por exemplo o palmitato, ocorre uma elevação da afinidade de proteínas com sítios hidrofóbicos pela fase superior (ALBERTSSON et al, 1990).

Diversos estudos relataram que o K_r de algumas proteínas com baixa hidrofobicidade não foi significativamente afetado pela presença de polímeros hidrofóbicos e sais na constituição das fases. No entanto o K_r de uma proteína com alta superfície hidrofóbica foi fortemente influenciado pelo aumento da hidrofobicidade do polímero constituinte do SAB.

2.2.4.1.7 Efeito da Temperatura sobre a Partição

A influência da temperatura sobre a partição de biomoléculas é percebida de maneira indireta. A temperatura pode levar a mudanças na viscosidade das fases ou na estrutura dos polímeros alterando a forma da curva binodal no diagrama de fases (CARVALHO, 2004).

A influência da temperatura é bastante complexa devido ao seu efeito na composição das fases em equilíbrio, assim como a alteração da estrutura da biomolécula e desnaturação (SARUBBO, 2000). Os sistemas com constituição próxima da composição do ponto crítico são mais afetados por mudanças de temperatura, devido à instabilidade inerente a essa região. Um deslocamento da curva binodal pode levar, facilmente, o sistema para a região monofásica (BAMBERGER et al., 1985).

FORCINITI & HALL (1991); ZASLAVSKY (1995) observaram 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.

O efeito da temperatura varia de acordo com o tipo de sistema, polímero / polímero ou polímero / sal. Para SAB PEG + MD, foi observado um aumento da inclinação das linhas de amarração com a elevação da temperatura do sistema (MACHADO, 1999). O mesmo comportamento foi observado para sistemas PEG + Sal (SILVA, 2000).

Inúmeros trabalhos relatam um aumento do coeficiente de partição com a temperatura (JOHANSSON et al., 1984); outros entretanto, não evidenciam a existência da relação entre o coeficiente de partição e a temperatura (TJERNELD et al., 1985). Tal condição demonstra a necessidade de estudos mais aprofundados para se esclarecer o real efeito deste parâmetro sobre a partição.

2.3 Espectrofotometria

O desenvolvimento de metodologias e estudos comparativos de metodologias espectrofotométricas para a determinação de proteínas totais sempre foram de grande interesse para profissionais, tanto ligados à indústria de alimentos, laboratórios de análises clínicas, como para pesquisadores de diversas áreas.

O termo espectrofotometria designa um método de análise baseado em medidas de absorção de radiação eletromagnética.

A técnica que aqui se descreve está restrita a uma pequena região de comprimento de onda da radiação eletromagnética, que corresponde à luz visível ou ultravioleta.

Quando a radiação interage com a matéria, certo número de processos pode ocorrer, incluindo reflexão, espalhamento, absorção, fluorescência/fosforescência (absorção e reemissão), e reações fotoquímicas (absorção e quebra de ligações químicas). Como a luz é uma forma de energia, a absorção de luz pela matéria faz com que a quantidade de energia das moléculas (ou átomos) aumente. O processo de absorção ocorre em nível molecular. A absorção da radiação pela molécula se dá, quando a energia que ela transporta é igual à diferença entre dois níveis de energia; nessa situação, a energia da radiação é transferida para a molécula.

Cada molécula caracteriza-se por possuir níveis de energia moleculares quantizados, os quais podem ser ocupados pelos elétrons das moléculas. Moléculas de substâncias diferentes têm diferentes níveis moleculares de energia, de maneira que cada substância absorve a radiação peculiarmente. Dito de outra forma, os comprimentos de onda que as substâncias absorvem são característicos da sua estrutura. Se forem levantados dados referentes à intensidade de luz absorvida por uma substância, em função dos comprimentos de onda da radiação, obter-se-á uma curva chamada espectro de absorção da substância. Cada substância tem um espectro característico e,

desse modo, para se identificar um material desconhecido, pode-se fazê-lo a partir de sua curva de absorção, comparada com curvas de substâncias conhecidas.

Uma vez conhecido o espectro de absorção de uma dada substância pode-se também determinar em que quantidade essa substancia se apresenta em uma solução. Isso é feito através da medida da intensidade de luz que atravessa a amostra. Uma solução quando iluminada por luz branca, apresenta uma cor que é resultante da absorção relativa dos vários comprimentos de onda que a compõem (ver figura 4).

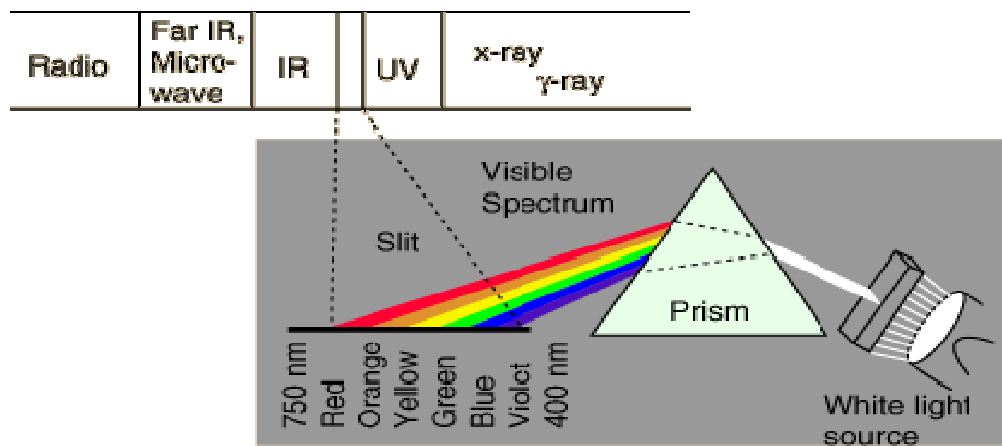
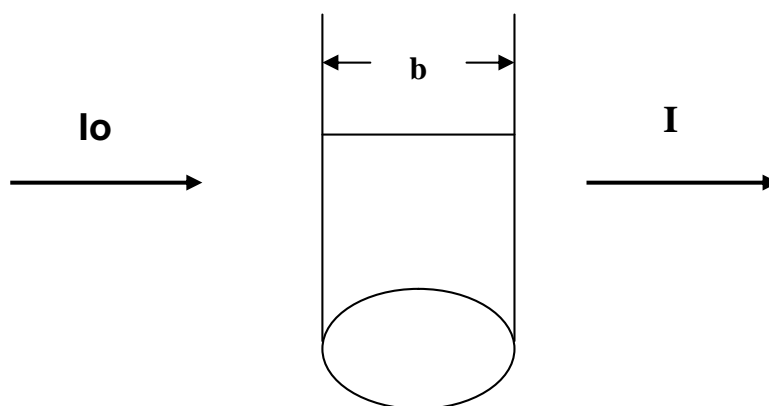


Figura 4: Espectro de radiação eletromagnética, com destaque para a região do visível.

Quando luz passa através de uma amostra ou quando ela é refletida de uma amostra, a quantidade de luz absorvida é a diferença entre a radiação incidente (I_0) e a radiação transmitida (I).



A quantidade de luz absorvida é expressa tanto como transmitância quanto absorbância.

Transmitância é dada normalmente em termos de uma fração da radiação transmitida (I) ou como uma porcentagem e, é definida como:

$$T = I/I_0 \text{ ou } \%T = (I/I_0) 100 \quad (8)$$

A absorvância é definida como:

$$A = -\log T \quad (9)$$

A primeira formulação matemática relacionando transmitância da luz com concentração de uma substância foi atribuída a Lambert em 1760, embora tenha sido comentado que Bouguer já tenha verificado este efeito em 1729:

$$T = I/I_0 = 10^{-kb} \quad (10)$$

A lei de Lambert é idêntica à lei de Bouguer, exceto que está relacionada com a concentração. A quantidade de luz absorvida é proporcional ao número de moléculas que absorvem através da passagem da luz.

Combinando as duas leis resulta na lei de Beer-Bouguer-Lambert:

$$T = I/I_0 = 10^{-kbc} \quad (11)$$

onde: c = concentração das espécies absorvedoras (expresso normalmente em g L^{-1} ou mg L^{-1}).

De acordo com a Lei de Lambert-Beer intensidades da radiação incidente e emergente podem ser relacionadas com as concentrações do material presente na solução bem como a distância percorrida pelo feixe luminoso através das amostras. Ou seja, a absorvância da luz a cada comprimento de onda λ é diretamente proporcional à concentração da solução contida na *cupeta*, contudo, esta linearidade deixa de ocorrer a concentrações muito elevadas da substância.

Muitos métodos espectrofotométricos têm sido propostos ao longo dos anos, para a determinação de proteínas totais, entretanto, não existe uma metodologia considerada de uso universal para todos os meios. Os métodos geralmente mais utilizados são o do biureto, de Lowry (LOWRY et. al., 1951), do "Coomassie brilliant blue" BG-250 ou reagente de Bradford (BRADFORD, 1976), do BCA ou reagente de Smith (SMITH et. al., 1985), e de absorção de proteínas no ultravioleta (STOSCHECK, 1990). O método de Bradford é muito difundido por ser rápido e bastante sensível.

2.3.1 O método de Bradford

O método de Bradford (BRADFORD, 1976), 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 alto peso molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm (COMPTON, 1985).

O método de Bradford (BRADFORD, 1976) é mais rápido e sensível que o de Lowry e Cols (LOWRY et. al., 1951), e tem sido utilizado para a determinação de proteínas totais em diversos meios: plasma ou soro sangüíneo (HUNN et. al., 1990; NISHI et. al., 1985), líquido (HISCHE et. al., 1982), saliva humana (JEZANO et. al., 1986), produtos alimentícios (RICHARD & PAQUIN, 1990), leite humano (KELLER & NEVILLE, 1986), tecidos de plantas (MARKS et. al., 1985; MATTO et. al., 1987), suspensões de células (GOGSTAD & KRUTNES, 1982), avidina e estreptavidina (SHARMA & TIHON, 1988) e detergentes (ROSENTHAL, 1983).

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

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

3.1 Materiais

Reagentes

- Polietilenoglicol 1500 g mol⁻¹ (SYNTH, Brasil);
- Polietilenoglicol 4000 g mol⁻¹ (ISO FAR, Brasil);
- Fosfato de potássio (monobásico e dibásico, VETEC, Brasil);
- Sulfato de Sódio (ECIBRA, Brasil);
- Sulfato de lítio (VETEC, Brasil);
- Ácido Propiônico (ISO FAR, Brasil);
- Iso – Propanol (VETEC, Brasil);

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, não necessitando de maiores purificações.

Equipamentos

- Balança analítica (M-310, DENVER INSTRUMENT, USA);
- Agitador magnético (FISATON, Brasil);
- Centrífuga (5804, EPPENDORF, Alemanha);
- Banho termostático (TE-184, TECNAL, Brasil);
- Espectrofotômetro (Cary 50, Varian, Austrália)

3.2. Métodos

3.2.1 Sistemas de trabalho

Os dados de equilíbrio para os sistemas aquosos bifásicos utilizados neste trabalho se basearam nos diagramas de fases de sistemas compostos por polietilenoglicol, sal e água obtidos por CARVALHO (2004). A partir dos sistemas contendo PEG de massas molares (1500, e 4000 g mol⁻¹) e do sal formador da fase (fosfato de potássio, sulfato de lítio e sulfato de sódio), foram obtidos os

coeficientes de partição da Glutenina, nas temperaturas de (5, 25, 35 e 45) °C em função da concentração do PEG (14, 16 e 18) % em massa e do tipo de sal. Apenas para o fostato de sódio e sulfato de lítio, as análises foram feitas à (5 e 25) °C, pois não haviam dados de equilíbrio para as demais temperaturas. As análises foram conduzidas em duplicata.

3.2.2 Quantificação do Conteúdo Protéico Total da Farinha de Trigo

Amostras de farinha de trigo foram utilizadas para determinação do teor protéico total da farinha, quantificado pelo Método de Kjeldahl (AOAC, 1995).

3.2.3 Preparo da Solução de Glutenina usando Ácido Propiônico

O preparo da solução de glutenina em ácido propiônico foi realizado a partir de uma adaptação da metodologia descrita por Sapirstein & Fu (1996), baseada no princípio da solubilidade das proteínas do trigo em solução de propanol-1 50%. As amostras foram preparadas misturando aproximadamente 26,0 g de farinha de trigo com 17,0 g de água deionizada, formando uma massa. Foram então pesadas 8,0 g dessa massa e adicionados 10 mL de propanol-1 50%. As amostras foram centrifugadas a 2500 rpm por 15 g e o sobrenadante descartado. A adição de propanol-1 50% e a centrifugação foram repetidos 2 (duas) vezes. Foram então adicionados 10 mL de solução de ácido propiônico 2%. A extração foi realizada por 60(sessenta) minutos, sob agitação mecânica contínua. A mistura protéica foi centrifugada e o sobrenadante foi utilizado nos testes com SABs.

3.2.4 Preparo dos Sistemas Aquosos Bifásicos

Foram empregados sistemas contendo Polietilenoglicol (PEG) com massas molares médias de (1500 e 4000) g mol⁻¹, diferentes sais (Fosfato de Potássio, Sulfato de Sódio e Sulfato de Lítio) e água.

Os sistemas foram preparados a partir de soluções aquosas estoques de PEG 50,0% (m/m) e Sais 30% (m/m). Os valores de pH das soluções salinas (Sulfato de Lítio e Sulfato de Sódio) foram iguais a 7 (sete), não necessitando ajustes. Para o preparo das soluções estoque de Fosfato de Potássio, o ajuste do pH em 7,0 foi obtido adicionando Fosfato de Potássio monobásico e dibásico na proporção de 1:1,82, respectivamente.

Os sistemas foram obtidos adicionando quantidades adequadas das soluções estoque de PEG, sais, solução de proteína e água em tubos graduados de centrifuga, até alcançar uma massa total de 12 g, sendo 2 mg a quantidade de proteína adicionada aos sistemas.

Os tubos foram agitados manualmente por 5 minutos e então centrifugados a 2000 g por 20 minutos, objetivando acelerar a formação de fases. Os sistemas foram mantidos em repouso por 14 horas em banho termostático na temperatura de trabalho (5, 25, 35 e 45) °C, para que o equilíbrio fosse atingido.

3.2.5 Quantificação da Proteína presente nas Fases dos SABs

A quantificação da proteína em cada fase do sistema foi feita segundo o método de BRADFORD a 595 nm (BRADFORD, 1976), por meio da leitura da absorbância em espectrofotômetro Cary 50. A curva analítica foi construída usando como padrão a proteína Albumina de Soro Bovino (BSA).

3.2.6 Cálculo do Coeficiente de Partição

Foram conduzidos estudos de partição em função da massa molar do polímero (1500 e 4000), do tipo de sal, da temperatura utilizada (5, 25, 35 e 45) °C e das concentrações do polímero.

Depois de atingido o equilíbrio entre as fases, alíquotas das fases superiores foram coletadas com o auxílio de uma pipeta de Pasteur até uma altura que garantisse que a interface não fosse perturbada. A fase inferior foi coletada com o auxílio de uma seringa de agulha longa de maneira que o mínimo possível de perturbação fosse provocado na interface. As fases foram colocadas em recipientes com tampa e armazenados sob refrigeração até que as análises fossem realizadas.

Alíquotas de cada fase tiveram seu conteúdo de proteína determinado pelo método de Bradford a 595 nm (BRADFORD, 1976). Uma curva analítica foi construída usando como padrão a proteína Albumina de Soro Bovino (BSA).

Para o cálculo do coeficiente de partição K_r , utilizou-se a equação:

$$K_r = \frac{[P]_{\text{sup}}}{[P]_{\text{inf}}} \quad (12)$$

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

3.2.7 Cálculo do Comprimento da Linha de Amarração

A equação utilizada para o cálculo da linha de amarração (TLL) foi a mesma utilizada por MAYEROFF et. al. (2004), na partição da *Cândida moggi* em SABs:

$$TLL = \sqrt{[\Delta PEG]^2 + [\Delta Sal]^2} \quad (13)$$

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.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Quantificação do conteúdo protéico total da farinha de trigo

A tabela 4 apresenta os resultados obtidos na quantificação das proteínas totais da farinha de trigo pelo Método de Kjeldahl.

Tabela 4: Teor protéico total da farinha de trigo

Parâmetros	Amostra 01	Amostra 02
Massa (g)	0,26	0,25
Volume HCl (mL)	16,8	19,3
Fator de Correção HCl	30,24	30,24
Concentração (%m/m)	12,37	14,57

Segundo Hosney (1998), o teor de proteína total em farinha de trigo tipo I, está entre 12- 15 %. Os valores obtidos em duas repetições apresentou uma média de 13,46 % em massa, estando, portanto dentro da faixa apresentada pela literatura, para o tipo de farinha utilizada .

4.2 Quantificação de proteína em solução de ácido propiônico

O conteúdo protéico em solução de ácido propiônico foi quantificado de acordo com o método de Bradford (BRADFORD, 1976) a 595 nm em espectrofotômetro UV, Cary 50. Para tanto, foi construída uma curva analítica, usando como padrão a proteína BSA (Albumina de Soro Bovino).

Tradicionalmente, BSA, era utilizada como padrão para quantificação protéica resultante de metabolismo celular (Lowry, et. al. 1995). Atualmente, tem sido largamente utilizada com o mesmo fim para diferentes soluções protéicas.

Para obtenção da curva analítica foram feitas 10 medidas de absorbância a 595 nm para diferentes diluições. A tabela 5 apresenta os valores de absorbância obtidos para solução de glutenina em ácido propiônico 2% e pH 7,0.

Tabela 5: Concentração de glutenina em solução de ácido propiônico

Parâmetros	Amostra 01	Amostra 02	Amostra 03
Absorbância Média	0,87	0,89	0,88
Concentração (mg/mL)	0,67	0,72	0,71

O valor médio da concentração de glutenina para as três repetições foi de 0,70 mg/mL.

4.3 Estudos dos Sistemas Aquosos Bifásicos

4.3.1 Determinação do Coeficiente de Partição da Proteína

O coeficiente de partição foi calculado a partir de sistemas formados por PEG de diferentes massas molares (1500 e 4000), três diferentes sais (fosfato de potássio, sulfato de sódio e sulfato de lítio) e água, em diferentes temperaturas (5, 25, 35 e 45) °C. Os resultados estão dispostos de forma gráfica nas figuras 5 A 7.

O comportamento de partição dos solutos nos SABs deve ser compreendido em termos das interações intermoleculares que ocorrem no processo de transferência entre as fases. As interações polímero-polímero, polímero-solvente, polímero-íon e íon-íon são dependentes da estrutura polimérica, das concentrações de sal e do polímero, da hidratação das cadeias poliméricas e dos íons. Além disso, as interações de todos os componentes dos SABs com o soluto particionante também determinam o comportamento de transferência. Essas interações são expressas no parâmetro termodinâmico denominado energia livre de Gibbs (ΔG°). A avaliação de ΔG° em termos de processos moleculares é uma tarefa bastante complexa, pois envolvem parâmetros de interações intermoleculares, ΔH° , e variáveis intermoleculares, ΔS° , ambos relacionados à ΔG° pela relação de Gibbs-Helmholtz, $\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$. 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 glutenina nos SABs foi aplicado um modelo desenvolvido por Haynes e colaboradores que se baseia na teoria de Flory-Huggins. Este modelo fornece um conjunto simples de equações analíticas que possibilita a identificação da força motriz responsável pela partição de solutos em SABs.

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

$$\ln k_r = \frac{M_p}{\rho} \left(\frac{n^s}{V^s} - \frac{n^i}{V^i} \right) \quad (14)$$

onde Kr representa o coeficiente de partição da proteína, M_p o grau de polimerização da proteína, ρ o número de sítios por unidade de volume de todo o 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 que a equação

fornece a respeito da contribuição entrópica para a transferência da glutenina entre as fases é que os valores de K_{glu} diferentes de 1 ocorrerão apenas se o número de moléculas por unidade de volume, nas duas fases, for diferente. Além disso, a referida equação mostra que o soluto particionará para a fase cuja densidade numérica de moléculas for maior. A densidade numérica das fases é determinada, principalmente, pelas moléculas de água, cuja quantidade de substância é bem maior do que a dos outros componentes formadores das fases. A maior quantidade numérica de partículas, por unidade de volume, na fase inferior é devida, portanto, à maior concentração de água nesta fase em relação à fase superior. Esta maior densidade numérica faz com que os solutos que se transferem para esta fase, disponham de uma maior quantidade de formas distintas para se arranjam, contribuindo assim para uma maior minimização da energia livre do sistema.

A contribuição da entalpia para a partição da glutenina, segundo o modelo de Haynes é dada pela equação:

$$\ln k_p = -\frac{M_p}{RT} \left[\sum_{i=1(i \neq p)} (\phi_i^s - \phi_i^l) \epsilon_{ip} - \sum_{i=1(i \neq p)}^2 \sum_{j=i+1(j \neq p)}^3 (\phi_i^s \phi_j^s - \phi_i^l \phi_j^l) \epsilon_{ij} \right] \quad (15)$$

A Equação 15 expressa todas as interações entálpicas que ocorrem dentro do sistema. Podemos 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 glutenina 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 glutenina interaja mais entálpicamente, isto é, tenha o valor de ϵ_{ip} mais negativo (ou menos positivo). O segundo termo na Equação 15 representa a diferença de conteúdo entálpico de cada fase resultante das interações entre todos os diferentes componentes que formam cada uma das distintas regiões dos SABs, ou seja, a variação da energia associada à transferência da proteína da fase inferior para a superior. Este termo energético só depende da interação que ocorre entre os componentes formadores das fases, não se leva em consideração a interação devida à proteína.

A dependência que K_{glu} possui em relação à diferença entre a energia total das fases superior e inferior surge porque a transferência da glutenina entre essas fases implica necessariamente na quebra e formação de novas interações. Assim a inserção da glutenina 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.

A análise do segundo termo da equação 15 prevê que a glutenina particionará para a fase que se encontra num estado termodinâmico de maior energia, isto é, para a fase que gastará menos energia para a formação da cavidade. Nos SABs estudados neste trabalho, a fase rica em PEG é a que possui maior conteúdo energético, visto que na fase inferior, rica em sal, as interações do tipo íon-dipolo tornam significativamente menor sua energia. Tem-se, contudo, que a partição de biossolutos é governada pela soma das contribuições de natureza entrópica e entálpicas. Quando uma dessas contribuições sobrepõe a outra, esta é quem governa o mecanismo de partição. As figuras 5 a 7 mostram a variação do coeficiente de partição da glutenina em função da massa molar do polímero (1500 e 4000) para os SABs nos diferentes sais estudados. Este efeito já foi estudado por inúmeros pesquisadores, que relataram a dependência da variação da energia livre de Gibbs da mistura, em relação à massa molar do polímero em função de contribuições entálpicas e entrópicas.

Os resultados mostram, de forma geral, que a glutenina possui uma forte tendência em se transferir para a fase rica em polímero. Tem-se indicação que esse fluxo de moléculas de glutenina para a fase superior é governado por aspectos de natureza entálpica, sejam eles devido a uma interação direta entre a proteína e os componentes formadores da fase, ou a auto-energia de cada fase. Uma das possíveis contribuições entálpicas para a transferência é a existência de uma interação específica entre a proteína e o PEG, ou seja, a proteína se concentra, preferencialmente, na fase enriquecida com o componente “i” com o qual interage mais fortemente. Nesse caso, pode ser proposto que a causa da concentração da glutenina na fase superior é uma interação entálpica específica PEG-Glutenina. Caso fosse o efeito entrópico a força motriz para a transferência da glutenina, esta seria concentrada na fase rica em sal, visto que esta possui maior densidade numérica.

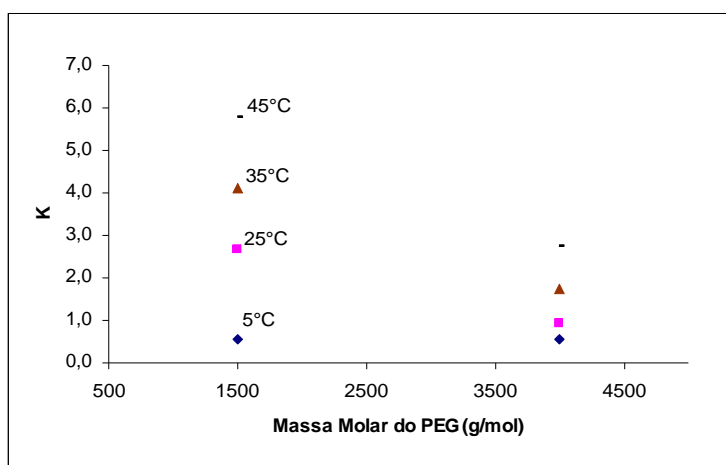


Figura 5: Influência da massa molar do PEG sobre K, em função da temperatura, para SABs formados por PEG- FFP.

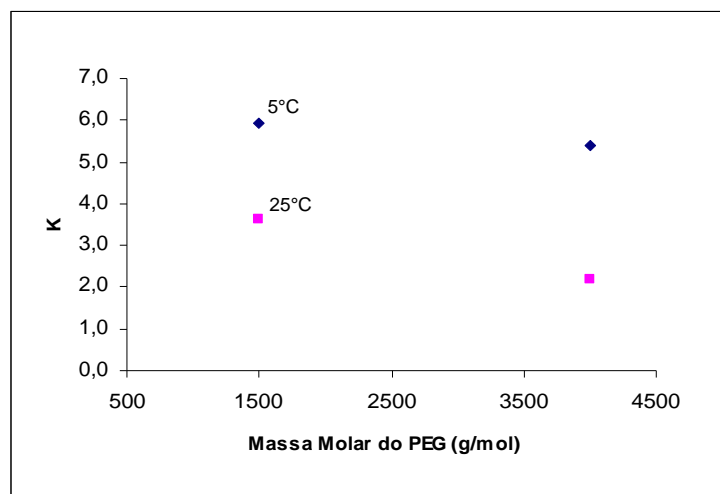


Figura 6: Influência da massa molar do PEG sobre K_r , em função da temperatura, para SABs formados por PEG – Sulfato de Lítio.

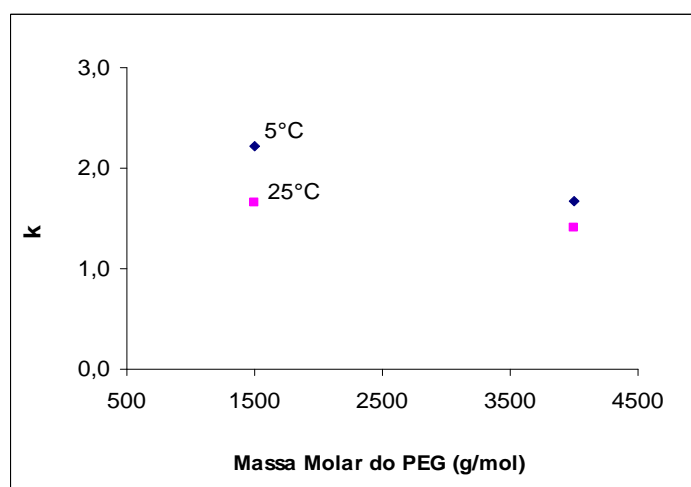


Figura 7: Influência da massa molar do PEG sobre K_r , em função da temperatura, para SABs formados por PEG – Sulfato de Sódio.

Contudo, os resultados mostram também, que o efeito entálpico sobre a partição, diminui com o aumento da cadeia polimérica. Naturalmente, este aumento no grau de polimerização do polímero formador do SAB acaba diminuindo a entropia configuracional da fase enriquecida pelo mesmo, reduzindo o valor da entropia de transferência da proteína para esta fase, dito de outro

modo, o aumento da cadeia polimérica aumenta a diferença de entropia entre as fases do sistema, e seu efeito sobre a partição se torna mais pronunciado.

De acordo com o modelo proposto por Flory e Huggins, o processo de dissolução de um polímero em um solvente tem demonstrado que, com o aumento da massa molar da macromolécula ocorre uma diminuição na entropia de mistura. Isto ocorre porque com o incremento do tamanho da cadeia polimérica aumenta-se também o vínculo entre as posições espaciais dos diferentes segmentos de uma mesma cadeia diminuindo significativamente o número de diferentes formas de arranjo nas celas unitárias da rede (configuração).

4.3.2 Efeito da Temperatura sobre o K

Neste trabalho foi avaliado o efeito de diferentes temperaturas (5, 25, 35 e 45) °C sobre o coeficiente de partição da proteína. Os resultados estão representados nas figuras 8, 9 e 10, em função da massa molar do PEG (1500 e 4000) para cada tipo de sal utilizado.

Como a partição de biossolutos é governada pela soma das contribuições de natureza entrópica e entálpicas, deve-se avaliar o efeito de cada variável interferente no processo de partição em função dessas contribuições. Para avaliar a contribuição entrópica, deve-se analisar a entropia de duas maneiras: em relação à configuração (número de formas diferentes de se arranjar as moléculas na solução) e em relação à conformação (estrutura molecular).

Quando energia na forma de calor é fornecida ao sistema e sua temperatura aumenta, a energia interna aumenta, elevando a energia cinética média das moléculas, de modo que essas se tornam mais livres para se movimentarem na solução, alterando a entropia configuracional do sistema. Ao mesmo tempo, a entropia conformacional do polímero é alterada, pois o aumento da temperatura provoca o enovelamento da sua cadeia. Isto ocorre devido à transição das ligações carbono-carbono da forma TRANS (caracterizada pela conformação linear da macromolécula em decorrência das suas interações com as moléculas de água) para a forma CIS (enovelada) diminuindo o número de sítios ativos disponíveis para interações (CARVALHO, 2004).

As figuras mostram a variação do coeficiente de partição da glutenina em função da temperatura para os sistemas formados por PEG- Li_2SO_4 , PEG- Na_2SO_4 e PEG- K_2PO_4 .

Pode-se observar que o comportamento descrito, de modo geral, é aquele de uma partição governada por contribuições entálpicas, de acordo com o modelo proposto por Haynes. Os valores de coeficiente de partição para os sistemas formados por PEG- Li_2SO_4 e PEG- Na_2SO_4 foram maiores que a unidade ($k > 1$), evidenciando a preferência da proteína pela fase polimérica. Contudo, pode-se observar que o coeficiente de partição para esses sistemas, diminui com o aumento da temperatura, isso porque, embora sejam os efeitos entálpicos quem governa o comportamento de

partição, as contribuições entrópicas também estão presentes. E, como proposto por Carvalho (2004), o aumento da temperatura promove uma diminuição dos sítios ativos do polímero disponíveis para interações, o que por sua vez, aumenta a diferença de entropia entre as duas fases do sistema e a contribuição entrópica se torna mais pronunciada, tendo como consequência a diminuição do K . A figura 8 mostra uma variação (diminuição) do K em 2 (duas) unidades quando do incremento da temperatura de 5 para 25 °C. A diminuição do K com o aumento da temperatura ocorre para os sistemas formados por PEG-Li₂SO₄ e PEG- Na₂SO₄ em todos os valores de TLL.

É também observada uma influência significativa da natureza do eletrólito formador do SAB sobre o valor do coeficiente de partição da glutenina. Os sistemas formados por PEG- K₂PO₄ apresentaram um comportamento oposto ao proposto por Carvalho (2004) evidenciando possivelmente a forte influência do eletrólito sobre o processo.

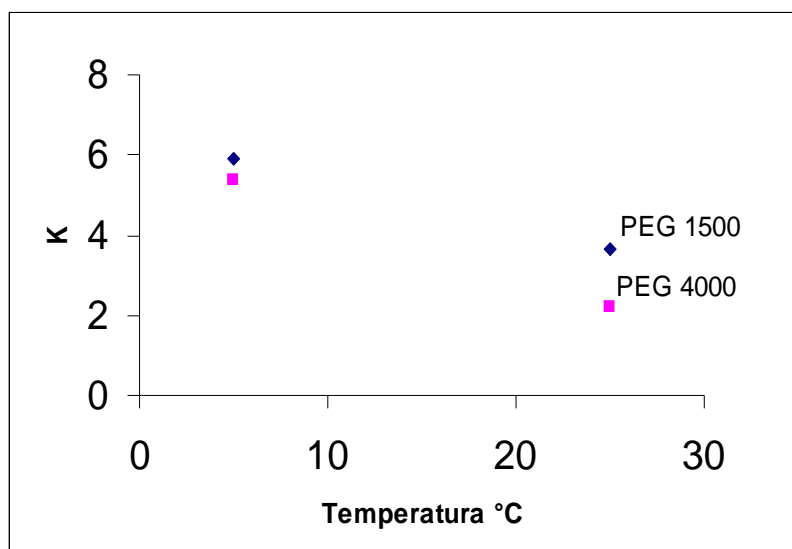


Figura 8: Influência da temperatura sobre k , em função da massa molar do polímero, para SABs formados por PEG – Sulfato de Lítio.

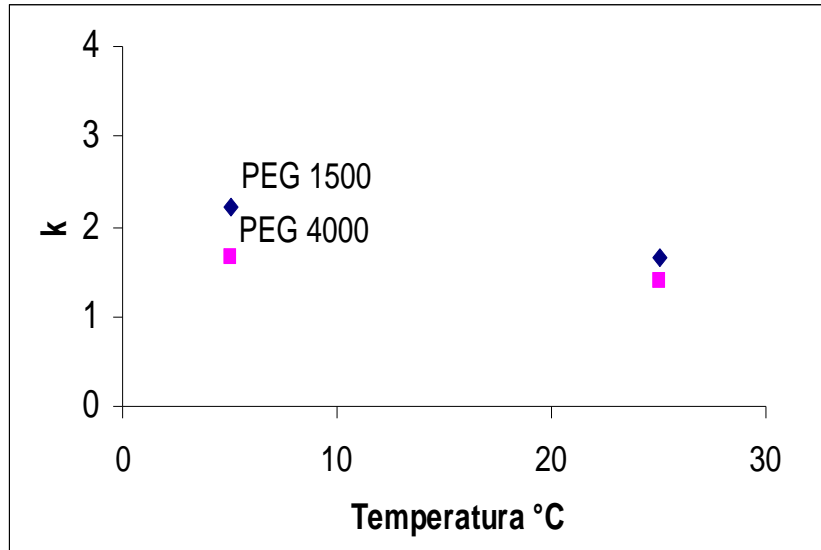


Figura 9: Influência da temperatura sobre k, em função da massa molar do polímero, para SABs formados por PEG – Sulfato de Sódio.

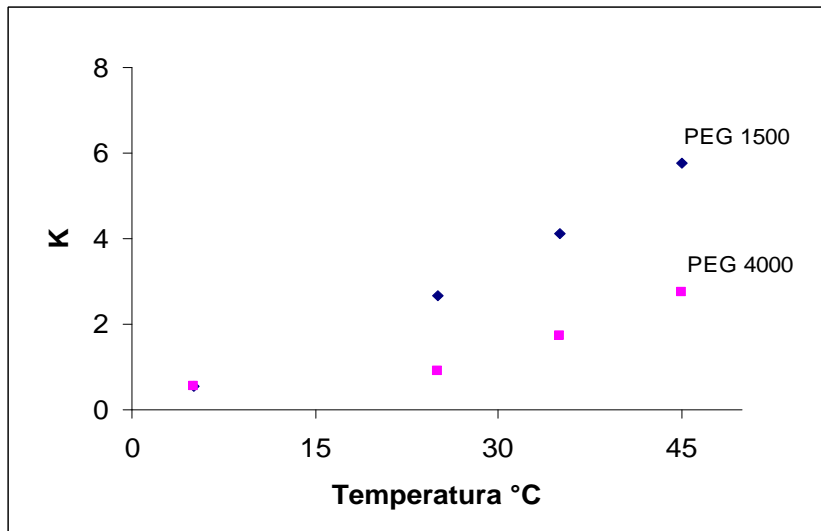


Figura 10: Influência da temperatura sobre k, em função da massa molar do polímero, para SABs formados por PEG – Fosfato de Potássio.

4.3.3 Efeito do Eletrólito sobre o K

Fundamentando-se nas discussões anteriores, e a partir das figuras 8, 9 e 10 é verifica-se que existe uma influência exercida pelo eletrólito formador do SAB no processo de partição da glutenina. É observado um efeito significativo do tipo de sal formador do SAB sobre o valor do k da proteína.

Os poucos estudos existentes na literatura sobre sistemas formados por sais de sulfato, relatam que, por esses sais possuírem o mesmo ânion, SO_4^{2-} , pode-se inferir que as diferenças no comportamento de partição de biossolutos nesses sistemas, se devem aos diferentes cátions presentes nas suas estruturas. Os resultados sugerem que a mudança do cátion do eletrólito formador do SAB altera a magnitude das interações intermoleculares, e como consequência, os valores do coeficiente de partição. Ono et. al., estudando as interações entre íons e PEG, obtiveram um modelo quantitativo dessa interação e apresentaram a seguinte ordem de interação dos cátions com o polímero: $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Rb}^+$

Da Silva e Loh (2005) tem discutido este diferente comportamento dos sais em termos do modelo fundamentado numa interação entre o polímero e os diferentes cátions. Baseado nesse modelo, quando soluções aquosas de PEG e sais são misturadas, o cátion e os grupos etilênicos do polímero interagem via os pares eletrônicos livres do átomo de oxigênio liberando algumas moléculas de água que antes os solvavam em um processo governado pelo aumento da entropia. Com o incremento da concentração do eletrólito, a interação cátion-polímero continua até que ocorra a saturação dos sítios da cadeia polimérica. Neste ponto, os íons só poderão interagir com moléculas de água, reduzindo assim o grau de liberdade das mesmas e consequentemente diminuindo a entropia do sistema. Assim, mesmo que o bissoluto apresente interações entálpicas específicas com o polímero promovendo sua partição para a fase superior, o coeficiente de partição irá diminuir com o aumento da concentração do sal, uma vez que estes competirão com a proteína pela ligação dos sítios de reticulares do polímero, bem como pelas moléculas de água daquela fase, tendendo a proteína então a buscar possibilidades de ligação na fase inferior onde a densidade numérica é maior.

Os resultados obtidos apresentam maiores valores de coeficiente de partição da glutenina quando o sal formador de fase é o sulfato de lítio. Assim, a proposta feita por Da Silva e Loh (2000), de formação de um pseudo-policátion em sistemas formados por PEG e sulfatos, pode justificar a maior preferência da glutenina pela fase polimérica quando o eletrólito formador de fase é o LiSO_4 . A formação de um pseudo-policátion no SAB contribui para uma maior minimização da energia através de interações eletrostáticas da molécula de proteína carregada negativamente com os

complexos EO. Esta minimização de energia é maior para pseudo-policátion formado com o cátion de Li^+ do que com aquele formado pelo cátion Na^+ . Como consequência, o processo de transferência da proteína no sistema $\text{PEG}/\text{LiSO}_4/\text{H}_2\text{O}$ libera uma maior quantidade de energia do que no sistema $\text{PEG}/\text{Na}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}$.

Esta ordem de influência dos cátions dos eletrólitos formadores do SAB também foi encontrada em outros estudos de partição, indicando esta influência como um comportamento geral na partição de ânions em SABs $\text{PEG}/\text{Sulfatos}/\text{H}_2\text{O}$. Esse efeito no comportamento de partição, entretanto, não pode ser analisada para proteínas como uma variável isolada, uma vez, que a partição dessas em SABs depende de muitos outros fatores. A figura 11, por exemplo, apresenta resultados que contrastam com o que até aqui foi apresentado para partição em SABs formados por sais de sulfato. O coeficiente de partição da proteína aumenta com o incremento da concentração desses sais no sistema, para a temperatura de $5\text{ }^\circ\text{C}$. Isto porque, a baixas temperaturas, o efeito da contribuição entrópica não é muito pronunciado. Contudo, ao se elevar a temperatura, o efeito dessa contribuição se torna mais perceptível e como consequência tem-se a diminuição do K_r .

As figuras 11 a 15 apresentam o valor do coeficiente de partição da glutenina em função do tipo e concentração do sal para cada temperatura estudada.

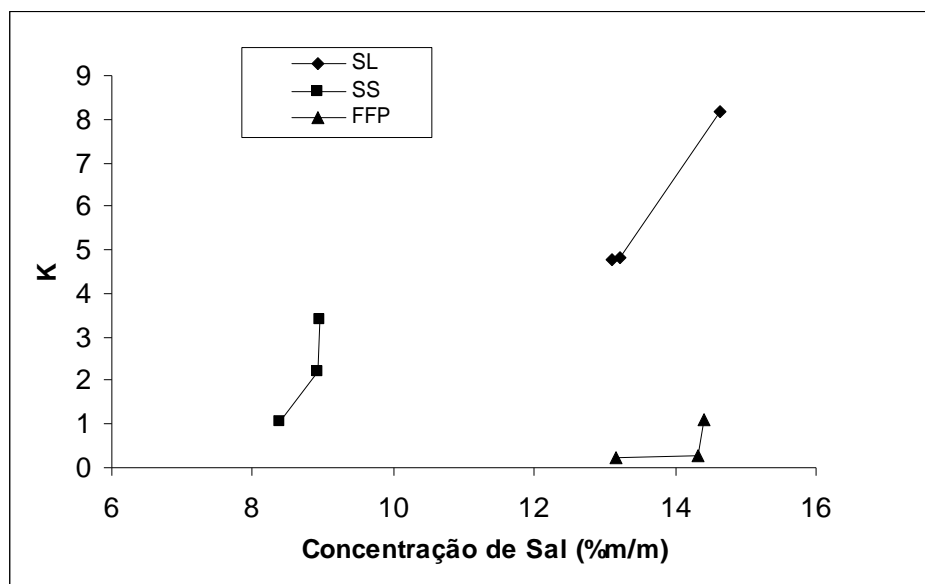


Figura 11: Influência do tipo e concentração do sal sobre k , para SABs formados por PEG 1500, Sais de fosfato de potássio (FFP), sulfato de lítio (SL) e sulfato de sódio (SS) a $5\text{ }^\circ\text{C}$.

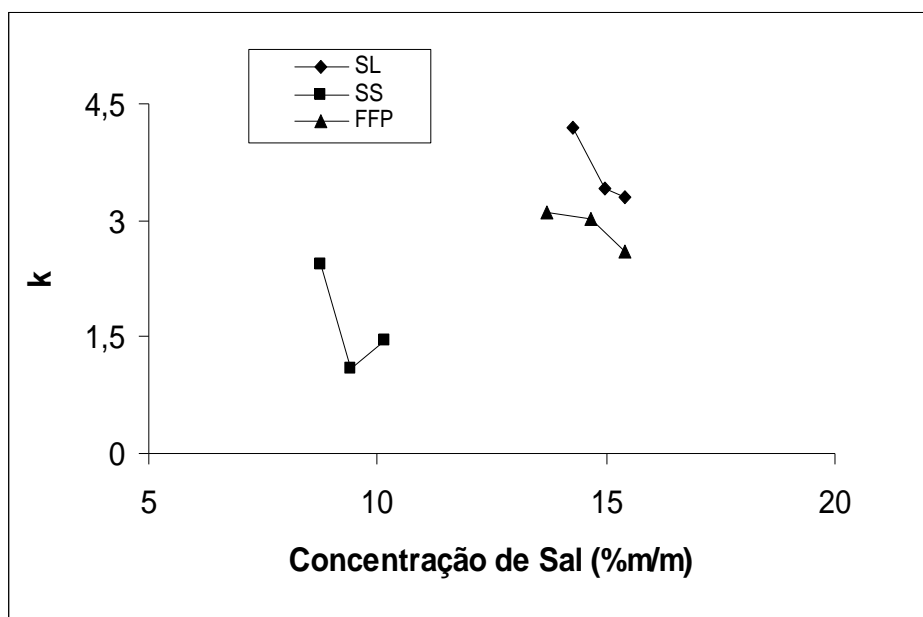


Figura 12: Influência do tipo e concentração de sal sobre k , para SABs formados por PEG 1500, Sais de fosfato de potássio (FFP), sulfato de lítio (SL) e sulfato de sódio (SS) a 25°C .

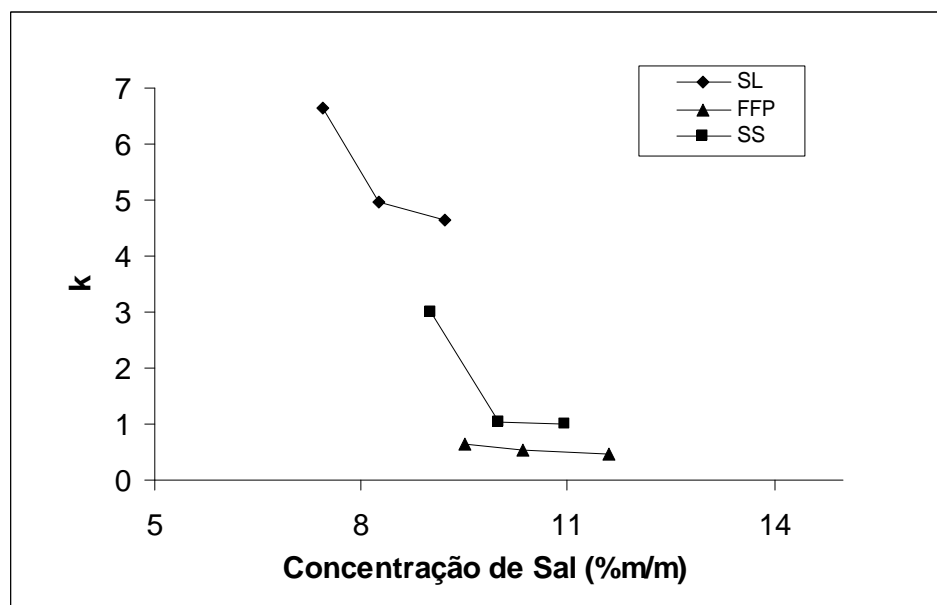


Figura 13: Influência do tipo e concentração de sal sobre k , para SABs formados por PEG 4000, Sais de fosfato de potássio (FFP), sulfato de lítio (SL) e sulfato de sódio (SS) a 5°C.

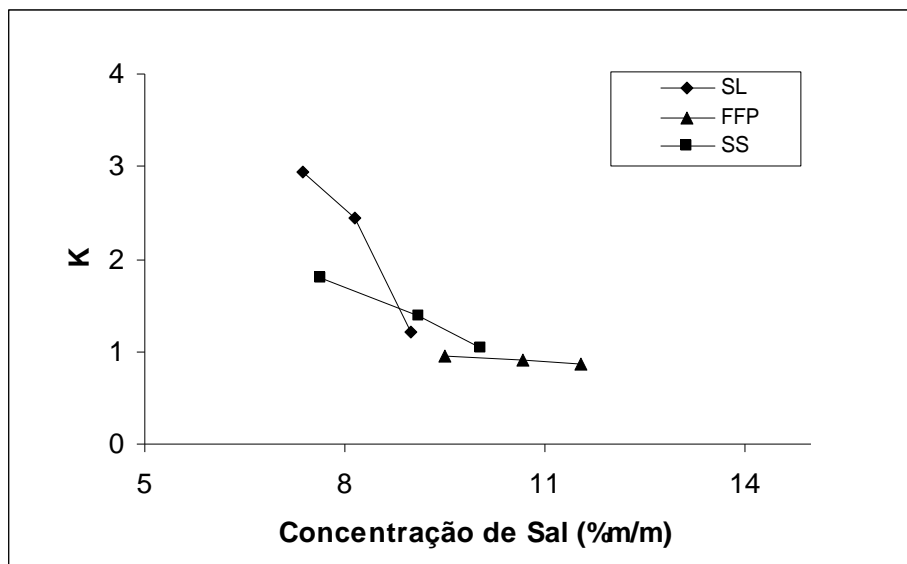


Figura 14: Influência do tipo e concentração de sal sobre k , para SABs formados por PEG 4000, Sais de fosfato de potássio (FFP), sulfato de lítio (SL) e sulfato de sódio (SS) a 25°C.

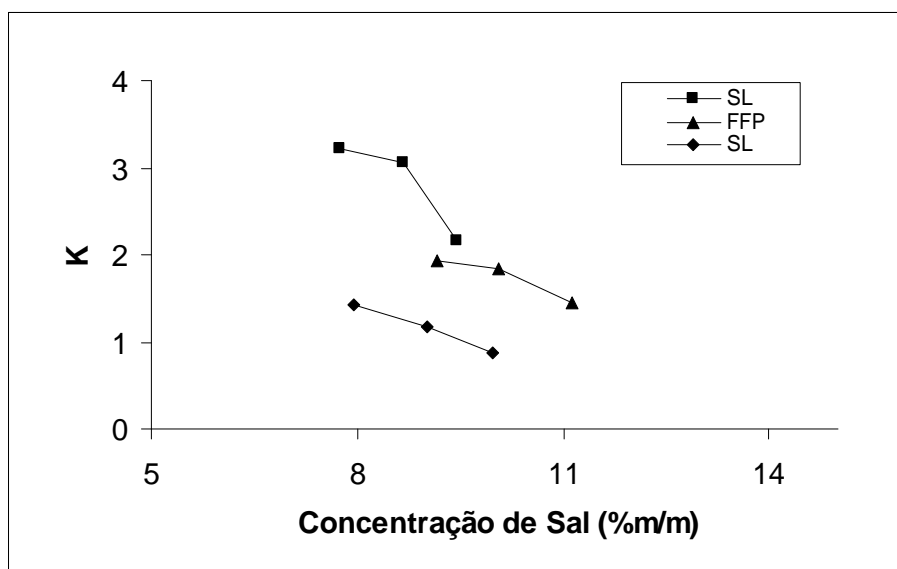


Figura 15: Influência do tipo e concentração de sal sobre k , para SABs formados por PEG 4000, Sais de fosfato de potássio (FFP), sulfato de lítio (SL) e sulfato de sódio (SS) a 35°C.

Os sistemas formados por sais de potássio apresentaram um comportamento semelhante. Embora na literatura se tenha relatos de coeficientes de partição de biomoléculas em SABs formados por FFP, superiores à SABs formados por Li_2SO_4 , os resultados obtidos nesse trabalho

tiveram um comportamento diferente. Como a composição do sal é importante na partição de todas as espécies de moléculas e partículas celulares (COSTA et al., 1998), supõe-se que os baixos valores de K, apresentados pela glutenina nos SABs formados por este sal é devido à contribuições entrópicas favoráveis. Contudo, é necessário que outros estudos sejam realizados a fim de elucidar a real contribuição do fosfato sobre o coeficiente de partição dessa proteína.

5. CONCLUSÕES

O estudo de partição da glutenina em sistemas aquosos bifásicos formados por polietilenoglicol e diferentes eletrólitos, se dá, para a maioria dos casos, com a sua concentração na fase superior, rica em polímero.

O melhor sistemas para a separação da proteína foi formado por PEG 1500 / Sulfato de lítio à 5°C. Apresentou $k \sim 9,0$ e $Y\% 89,0$.

Considerando que a única proteína em solução é a glutenina e que essa não é quebrada quando solubilizada e ainda que os SABs contituem um ambiente ameno de separação, conclui-se que a proteína encontrada em cada fase do sistema encontra-se intacta. Entretanto p/ validar essa proposta, outros estudos devem ser feitos, como por exemplo, análise calorimétrica de transferência da PTN entre as fases, a fim de verificar se existe ou não uma energia associada a quebra de interações.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AACC, **AACC Annual Meeting Program Book**. St Paul – MN, 1983.
- ALBERTSSON, P. A. **Partition of Cell Particles and Macromolecules**. Ed. John Wiley, 2nd Ed., New York, 1971.
- ALBERTSSON, P.A.; **Partition of cell and macrocolecules**. New York. Jonh Wiley, p. 346. 1986.
- ALBERTSSON, P.A.; **Partition of cell and macrocolecules**. Stockol. Almquist & Wiksells. Pag 231. 1990
- ALBERTSSON, P-Å. **Partition of Cell Particles and Macromolecules**. Stockolm: Almquist & Wiksells, 1960. 231 p.
- ANNUNZIATA, O.; LOMAKIN, A.; PANDE, J.; OGUN, O.; BENEDEK, G. B. **Effect of polyethylene glycol on the liquid–liquid phase transition in aqueous protein solutions**. Biophysics, v. 99, n. 22, p. 14165-14170, 2002.
- ANTES S.; WIESER H. **Effects of high and low molecular weight glutenin subunits on rheological dough properties and breadmaking quality of wheat**. Cereal Chemistry, 78(2): 157-159. 2001
- AOAC - Association of Analytical Chemists. **Official methods of analysis of AOAC international**. 16thEd. Washington: AOAC. 109p, 1995.
- ASENJO, J.A. **Separation Processes in Biotechnology**. Marcell Dekker Inc., New York, 801p.,1990.
- AZEVEDO JR., W. F. **Cristalização De Macromoléculas Biológicas** UNESP, São José do Rio Preto, SP 2004.
- BAMBERGER, S.; BROOKS, D. E.; SHARP, K. A.; VAN ALSTINE, J. M.; WEBBER, T. J. "Preparation of phase system and measurent of their physicochemical properties. In: BROOKS, D. E.; WALTER, H.; FISCHER, D. **Partitioning in aqueous two-phase system**. Academic Press, Orlando, 1985.
- BERGQVIST, Y.; KARLSSON, L.; FOHLLN, L.; *Clin. Chem.* **1989**,35, 2127.
- BIETZ, J. A. e WALL, J. S. **Isolation and characterization of gliadin-like subunits from glutenins**. Cereal Chemistry. 50:537-547. 1973.
- BIETZ, J. A. **High Performance liquid chromatography of ceral proteins**. In: Advances in Cereal Science and Technology, Vol. 8. Y. Pomeranz, Ed. Am. Assoc. Cereal Chem., St. Paul, MN, 1986.
- BONOMO, R.C.F.; MINIM, L.A.; COIMBRA, J.S.R.; FONTAN, R.C.I.; DA SILVA, L.H.M.; MINIM, V.P.R.. **Hydrophobic interaction adsorption of whey proteins: Effect of temperature and salt concentration and thermodynamic analysis**. Journal of Chromatography B 844 (2006) 6-14.

BOTTOMLEY, R. C.; KEARNS, H.F.; SCHOFIELD, J. D. **Characterization of wheat flour and gluten proteins using buffers containing sodium dodecyl sulfate.** Journal of the Science of Food and Agriculture, v 33, 481-491, 1982.

BRADFORD, M. M.; *Anal. Biochem.*, n°72, 248p., 1976.

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

BRUIN, S. **Phase equilibria for food product and process design.** Fluid Phase Equilibria 158, 160, 657-671, 1999.

BUSHUK, W. **Flour proteins: structure and functionality in dough and bread.**, v. 30, n. 7, p. 447-451, 1985

CARVALHO, C.P. **Estudo de Equilíbrio de Fases para sistemas aquosos bifásicos compostos por polietileno glicol, sais e água.** Dissertação de Mestrado UFV, Viçosa-MG, 2004.

COIMBRA, J. S. R., GIRALDO-ZUÑIGA, A. D., MINIM, L.A., MEIRELLES, A.J.A. **Uso de Sistemas Aquosos Bifásicos na Extração Líquido-Líquido** Editora UFV, Viçosa, 2003.

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

COLLE, A. C. **A cadeia produtiva do trigo no Brasil: contribuição para a geração de emprego e renda.** Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1998, 153p. (Dissertação de Mestrado).

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 Biotechnology, v.629, p. 70-72, 1998

DA SILVA, L. H. M.; MEIRELLES, A. J. A. **PEG + Potassium Phosphate + Urea Aqueous Two-Phase Systems: Phase Equilibrium and Protein Partitioning.** J. Chem. Eng. Data, v. 46, p. 251-255, 2000.

DA SILVA, L. H.M. e LOH, W.. *Química Nova*, v 29, 1345-1351, 2006.

DA SILVA, L.H.M.; DA SILVA, M. C. H.; DE AQUINO, R.A.N.; FRANSCISCO, K. R.; CARDOSO, M.V. C.; MINIM, L. A.; COIMBRA, J.S.R.; *Journal Physical Chemistry*, 110, 23540-23546, 2005.

- DACHKEVITCH, T. AUTRAN J. C.; **Prediction of baking quality of bread wheats in breeding programs by size-exclusion high performance liquid chromatography.** Cereal chemistry, 66 (6): 448-456. 1989.
- DANNO, G.; KANAZAWA, K.; NATAKE, M. **Extraction of wheat flour proteins with sodium dodecyl sulfate and their molecular weight distribution.** Agricultural and Biological Chemistry, v 38, 1947-1953, 1982.
- DONG, H.; SEARS, R. G.; COX, T. S.; Hoseney, R. C.; Lookhart, G. L.; Shogren, M. D. **Relationships between protein composition and Mixograph and loaf characteristics in wheat.** Cereal Chemistry, 69 (2): 132 – 136. 1992.
- FORCINITI, D., HALL, C. K. **Influence of polymer molecular weight in temperature on phase composition in ATPS.** Fluid Phase Equilibrium, v.61, p.243-262, 1991.
- GIANIBELLI, M. C. LARROQUE, O. R. MACRITCHIE, F. E WRIGLEY, C. W. **Biochemical, Genetic, and Molecular Characterization of Wheat Glutenin and Its Component Subunits.** Cereal Chemistry. V. 78, N. 6: 635-646. 2001
- GIANIBELLI, M. C.; LARROQUE, O. R.; CHAN, P.; MARGIOTTA, B.; DE AMBROGIO, E.;MACRITCHIE, F.; LAFIANDRA, D. **"Effect of allelic variants at the *Gli-1/Glu-3* and *Gli-2* loci on dough mixing properties"**. *Proceedings of the 9th International Wheat Genetics Symposium.* A. E. Slinkard, Ed. August, 2-7. Saskatoon, Saskatchewan, Canada. pp. 154-156. 1998.
- GIRALDO-ZUÑIGA, .D., COIMBRA, J.S.R., MINIM, L.A..**Coeficiente de partição da α -Lactoalbumina e β -Lactoglobulina em sistemas aquosos bifásicos influência da massa molar do polímero.** Ciência y Tecnologia Alimentaria; n°3. 149-155. 2001.
- GOGSTAD, G. O.; KRUTNES, M. B.; **Anal. Biochem.**n°126, 355p, 1982.
- GUARIENTI, E. M. **Qualidade industrial de trigo.** Passo Fundo: Embrapa-CNPT, 1996. 36 p.
- 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.
- GUPTA R. B; BATEY I. L; MACRITCHIE F. Relationships between protein composition and functional properties of wheat flours. **Cereal Chemistry.** 69:125-131. 1992
- GUPTA R. B; BATEY I. L; MACRITCHIE F. **Biochemical basis of flour properties in bread wheats. I. Effects of variation in the quantity and size distribution of polymeric protein.** Journal of Cereal Science. 18:23-41. 1993.
- HAN, J. H.; LEE, C. H.. **Effects of salts and poly(ethylene glycol)-palmitate on the partitioning of proteins and *Bacillus subtilis* neutral protease in aqueous two-phase systems.** Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 9 (1997) 109-116.
- HISCHE, E. A. H.; VAN der HELM, H. J.; VAN MEEGEN, M.Th.; BLANKEN, H. I. G.; **Clin. Chem.**, n°28, 1236p,1982

- HOSENEY, R. C.; ROGERS, D. E.. **The formation and properties of wheat flour doughs.** Food Science and Nutrition, v 29, n° 2. 73-93, 1990.
- HOSENEY, R.C. **Principles of Cereal Science and Technology**, 2 ed. AACC, Minnesota, USA, 1998
- HUANG, C. M.; **Clin. Chem.** 1988, 34, 980.
- HUEBNER, F. R., e WALL, J. S. **Fractionation and quantitative differences of glutenin from wheat varieties varying in baking quality.** Cereal Chemistry. 53:258-269. 1976.
- HUNN, J. B.; GREER, I. E.; **J. Fish Biol.** 1990, 36, 617.
- HUSTED H.; CORNER K.H.; KULA, M.R. **Partition in aqueous two-phase systems;;** 3; 139-144; 1985.
- JENZANO, J. W.; HOGAN, S. L.; NOYES, C. M.; FEATHERSTONE,G. L.; LUNDBLAD, R. L.; **Anal. Biochem.** 1986, 159, 370.
- KASAPIS, S; MORRIS, E. R.; NORTON, I. T.; CLARK, A. H. **Phse equilibria and gelation in gelatin/maltodextrin systems – part I: gelatin of individual components.** Carbohydrate Polymers, 21, 243-248, 1993.
- KASARDA, D. D. **Glutenin structure in relation to wheat quality.** Pages 277-302 in: Wheat is Unique. Y. Pomeranz, ed. Am. Assoc. Cereal Chem.: St. Paul, MN. 1989
- KELLER, R. P.; NEVILLE, M. C.; **Clin. Chem.** 1986, 32, 120.
- KULA, M-R., **Trends and Future Prospects of Aqueous Two-Phase Extraction**, Biosep., 1, 181-189, 1990
- LAWRENCE, G.J., MOSS, H.J., SHEPHERD, K.W., WRIGLEY, C.W., **Dough quality of biotypes of eleven Australian wheat cultivars that differ in high-molecular-weight glutenin subunit composition.** Journal of Cereal Science. 6 (1), 99–101. 1987.
- LEHNINGER, A. L. **Bioquímica.** São Paulo: Edgard Blucher. 1976. p.126-145
- LEVINE, I. N. Physical Chemistry. 4th Ed. New York: McGraw-Hill, 1995. 901 p.
- LEW, E. J.; KUZMICKY, D. D.; KASARDA, D. D.. **Characterization of low molecular weight glutenin subunits by reversed-phase high- performance liquid chromatography, sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis, and N-terminal amino acid sequencing.** Cereal Chemistry, v 69, 508-515, 1992.
- LOTT, J. A.; STEPHAN, V. A.; PRITCHARD Jr., K. A.; **Clin.Chem.** 1983, 29, 1946.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J.; **J. Biol. Chem.** 1951, 193, 265 .
- MACART, M.; GERBAUT, L.; **Clin. Chem.** 1988, 34, 998.

- MACHADO, F. L. C. **Equilíbrio de fases para sistemas aquosos bifásicos (SAB) compostos por polietileno glicol-maltodextrina-água.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 1999.
- MacRITCHIE, F. **Wheat Proteins: Characterization and Role in Flour Functionality** Cereal Foods World 44 188-193, 1999.
- MACRITCHIE, F.; LAFIANDRA, D. **Structure-functions relationship of wheat proteins.** in: Food Proteins and Their Applications; DAMORADAN and A. PARAF, eds. Marcel dekker, inc. pp 293-324. 1997.
- MANDARINO, J.M.G. **Aspectos importantes para a qualidade do trigo.** Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 31p. 1993.
- MANSUR, L. M.; QUALSET, C.O.; KASARDA, D. D.; MORRIS, R. **Effects of 'Cheyenne' chromosomes on milling and baking quality in 'Chinese Spring' wheat in relation to glutenin and gliadin storage proteins.** Crop Science, 30 (3):593-602. 1990.
- MARGIOTTA, B., PFLUGER, L., ROTH, M.R., MACRITCHIE, F., LAFIANDRA, D., **Isogenic bread wheat lines differing in number and type of high Mr glutenin subunits.** In: Shewry, P.R., Tatham, A.S. (Eds.), Wheat Gluten. Royal Society of Chemistry, London, pp. 29-33. 2000.
- MARGIOTTA, B., URBANO, M., COLAPRICO, G., JOHANSSON, E., BUONOCORE, F., D'OVIDIO, R., AND LAFIANDRA, D. **Detection of y-type subunit at the Glu-A1 locus in some Swedish bread wheat lines.** Journal of Cereal Science. 23:203-211. 1996.
- MARKS, D. L.; BUCHSBAUM, R.; SWAIN, T.; **Anal. Biochem.** 1985, 147, 136.
- MATTOO, R. L.; ISHAQ, M.; SALEEMUDDIN, M.; **Anal. Biochem.** 1987, 163, 376
- MCCABE, W. L.; SMITH, J.C.; HARRIOT, P. **Unit operations of chemical engineering**, 5 ed., McGraw-Hill, NY, USA, 1993.
- MECHAM, D. K., KASARDA, D. D., e QUALSET, C. O. **Genetic aspects of wheat gliadin proteins.** Biochem. Genet. 16:831-853. 1978
- MURRAY, J. N.; JENKINS, A. D.. **Properties of liquids and solutions**, 2 ed. New York: J. Wiley, 303, 1994.
- NG, P.K.W., e W. BUSHUK. **Glutenin of Marquis wheat as a reference for estimating molecular weights of glutenin subunits on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.** Cereal Chem. 64:324-327. 1988
- NISHI, H. H.; KESTNER, J.; ELIN, R. J.; **Clin. Chem.** 1985, 31, 95.
- 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 characterisation of polyethylene glycol-**

cashew-nut tree gum aqueous two-phase systems. Journal of Chromatography B. v. 766, p. 27-36, 2001.

ONO, K.; KONAMI, K.. **Journal Physical Chemistry.** N° 83, 1979.

ORTH, R. A.; BUSHUK, W. **Comparative study of the proteins of wheat of diverse baking quality.** Cereal Chemistry, v 49, 268-275,1972.

OSBORNE, T.B. **The proteins of the wheat kernel,** Carnegie Institution of Washington, Publication, Judd & Detweiler, INC. n°. 84.1907.

PANDE, S. V.; MURTHY, M. S. R.; **Anal. Biochem.** 1994,220, 424.

PAYNE, P. I., NIGHTINGALE, M. A., KRATTIGER, A. F., AND HOLT, L. M. **The relationship between HMW-GS glutenin subunit composition and the bread-making quality of British-grown wheat varieties.** J. Sci. Food Agric. 40:51-65. 1984.

PIROZI, M. R. MACRITCHIE, F. FRONZA, V. **Protein composition in relation to flour functionality of Brazilian wheat varieties.** In: 87th AACC Annual Meeting, 2002, Montreal. 87th AACC Annual Meeting Program Book. St Paul - MN : AACC, 2002. p. 128.

POMERANZ, Y. **Modern cereal science and technology.** New York: VHC, 1987. 486 p.

PYLER, E. J. **Baking - Science & Tecnology.** 3.ed. vol II. Kansas: Sosland Publishing Company. 1988.

R.A Curtis, and L. Lue. **A molecular approach to bioseparations: Protein-protein and protein-salt interactions.** Chemical Engineering Science 61 (2006) 907-923.

RICHARD, J. P.; PAQUIN, P.; **Milchwissenschaft** 1990, 45, 92.

ROCHA, D. **Importação de trigo deverá bater recorde na atual safra,** Curitiba-Paraná. 2007. Disponível em:< [http:// www.ambienteemfoco.com.br](http://www.ambienteemfoco.com.br)>. Acesso em 07 de Fevereiro de 2008.

ROSENTHAL, K. S.; KOUSSALE, F.; **Anal. Chem.** 1983, 55, 1115.

ROSSI, R. M. NEVES, M. F. **Estratégia para o trigo no Brasil.** São Paulo: Atlas, 2004.

SANTOS, B. R. E. **Caminhos da agricultura brasileira.** São Paulo: Evoluir, 2001. 329p.

SANTOS, L. S. **Perfil protéico e qualidade de panificação em linhagens de trigo desenvolvidas para a região do cerrado brasileiro.** Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Viçosa, 80p, 2008.

SAPIRSTEIN, H.D. e FU, B.X. Intercultivar variation in the quantity of monomeric proteins soluble and insoluble glutenin, and residu protein in wheat flour and relationship to breadmaking quality. **Cereal Chemistry.** 75:500-507.1998.

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.; ASENJO, J. A. **Partitioning and purification of α -amylase in aqueous two-phase.** *Enzyme Microbiology Technology*. v. 16, p. 131-142, 1994.
- SHARMA, H. K.; TIHON, C.; **Anal. Biochem.** 1988,170, 135.
- SHEWRY, P. R., HALFORD, N. G., AND TATHAM, A. S. **The high molecular weight subunits of wheat, barley and rye: Genetics, molecular biology, chemistry and role in wheat gluten structure and functionality.** in: *Oxford Surveys of Plant and Molecular Cell Biology*, Vol. 6. B. J. Miflin, ed. Oxford University Press: London. 1986.
- SHEWRY, P.R., LOOKHART, G.L. **Wheat Gluten Protein Analysis**, AACC, Minnesota, USA, 2003.
- SHIBA, K. S.; KANAMORI, K.; HARADA, T.; NAKAO, M.; NAKAJIMA, K.; KODARIA, T.; NAKAGAWA, H.; **Clin. Chem.** 1985,31, 1215.
- SINGH, N. K., AND SHEPHERD, K. W. **Linkage mapping of the genes controlling endosperm proteins in wheat. 1. Genes on the short arms of group 1 chromosomes.** *Theor. Appl. Genet.* 66:628-641. 1988.
- SINHA, R.; SINGH, S. P.; AHMED, S.; GARG, S.K.. **Partition of bacillus alkaline protease in aqueous two-phase systems.** *Bio-source Technology*, n °55. 163-166, 1996.
- SMITH, J. M.; VAN NESS, H. C.; ABBOTT, M. M. **Introdução à termodinâmica da engenharia química.** 5. ed. Rio de Janeiro: LTC-Livros Técnicos e Científicos, 2000. 697 p.
- SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M, D.; FUJIMOTO, E. K.; GOEKE, N, M.; OLSON, B. J.; KLENK, D. C.; **Anal. Biochem.** 1985, 150, 76.
- SOUZA, R. C. S..**Integração de Processos para purificação das proteínas da clara do ovo, Lisozima, conalbumina e ovalbumina.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa. 2008.
- STEVENSON, S.G., PRESTON, R. Flow Field Flow Fractionation of Wheat Proteins. **Journal of Cereal Science.** 23: 121–131. 1996
- TATHAM, A. S., MIFLIN, B. J., AND SHEWRY, P. R. The beta-turn conformation in wheat gluten proteins: Relationship to gluten elasticity. **Cereal Chemistry.** 62:405-442. 1985.
- TREYBAL, R.E. **Extraccion en fase liquida.** Toral, M.T. (trad.). Mexico, UTEHA, p. 729, 1968.
- TRUUST,H., JOHANSSON, G. **Fractionation of wheat proteins by counter-current distribution using aqueous two-phase systems containing propionic acid** *Journal of Chromatography B*, 680 71-80, 1996.

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.

VAILAYA, A.; HORVÁTH, C.. **Retention Thermodynamics in Hydrophobic Interaction Chromatography.** Ind. Eng. Chem. Res. 35 (1996) 2964-2981.

VERHEUL, F. E. A. M.; CORNELISSEN, P. J. H. C.; Clin. Chem.1986, 32, 2003.

VOJDANI, F.; in G.M. Hall (Ed.), **Methods of testing protein functionality**, Blackie Academic and Professional, London, 1996.

WEEGELS, P. L., HAMER, R.J., SCHOFIELD, J. D. **RP-HPLC and Capillary Electrophoresis of Subunits from Glutenin Isolated by SDS and Osborne Fractionation** Journal of Cereal Science **22** 211-224, 1995.

WIMSATT, D. K.; LOTT, J. A.; Clin. Chem. 1987, 33, 2100.

ZAIA, D. A. M. ZAIA, C. T. B. V., LICHTIG, J. **Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes** Química Nova 21 787-793, 1998.

ZASLAVSKY, B. Y. **Aqueous two-phase partitioning**, 1st Ed., Marcel Dekker, 1995

ZASLAVSKY, B.Y. **Aqueous two-phase partitioning. Physical Chemistry and Bioanalytical Applications**, Marcel Dekker Inc., New York, 1994.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.