



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

EQUILÍBRIO DE ADSORÇÃO DE
GLICOMACROPEPTÍDEO (GMP) EM RESINA
ANIÔNICA E ANÁLISE TERMODINÂMICA

RAFAEL DE ARAÚJO LIRA

ITAPETINGA
BAHIA - BRASIL
2008

RAFAEL DE ARAÚJO LIRA

EQUILÍBRIO DE ADSORÇÃO DE GLICOMACROPEPTÍDEO (GMP) EM RESINA ANIÔNICA E ANÁLISE TERMODINÂMICA

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

Orientador:

Prof. DSc. Luis Antonio Minim

Co-orientadora:

Profª. DSc. Renata Cristina Ferreira Bonomo

ITAPETINGA
BAHIA – BRASIL
2008

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

Área de Concentração em Engenharia de Processos de Alimentos
Campus de Itapetinga-BA

TERMO DE APROVAÇÃO

Título: Equilíbrio de Adsorção de Glicomacropéptido (GMP) em Resina Aniônica e Análise Termodinâmica.

Autor: Rafael de Araújo Lira

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de **Mestre em Engenharia de Alimentos**, área de concentração em **Engenharia de Processos de Alimentos**, pela Banca Examinadora:

Prof. DSc. Luis Antonio Minim – UFV
Presidente

Prof. DSc. Modesto Antônio Chaves – UESB

Prof. DSc. Genebaldo Sales Nunes – UESB

Data da defesa: 15 de Julho de 2008

UESB - Campus Juvino Oliveira, Praça Primavera, no. 40 – Telefone: (77) 3261-8629
Fax: (77) 3261-8701 – Itapetinga – BA – CEP: 45.700-000 – E-mail: ppgeal@uesb.br

*Á minha mãe, minha heroína;
Aos meus irmãos, Leidy, Leandro e Thiago, pois sua existência
é fonte de motivação;
Às minhas sobrinhas, Giovanna e Júlia, que trazem a alegria
da renovação à minha vida;
Ao meu Deus, criador dos céus, da terra, do mar e de tudo o
que neles existe;*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e a graça da saúde;

Aos meus pais Maria das Dores e Raimundo, meus irmãos, minhas sobrinhas e minha tia Adélia, por tudo;

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), pelo Programa de Pós-Graduação;

À FAPESB, pela bolsa concedida;

Ao professor Luis Antônio Minim, pela orientação, confiança, incentivo e apoio durante todo o mestrado;

À professora e co-orientadora Renata C. F. Bonomo, pela orientação, amizade e incentivo oferecidos;

Ao Professor Luís Henrique M. da Silva, pela ajuda, conselhos e amizade;

Ao professor Modesto Antônio Chaves, pelos conselhos e sugestões;

Ao professor Genebaldo Sales Nunes, por sua prestativa contribuição a este trabalho;

Ao doutor e amigo Abraham D. G. Zuniga, pelos conselhos, prestatividade, incentivo e por me fazer entender o que representa a pesquisa científica;

À Bárbara, secretária da Pós-Graduação, pela competência e auxílio, de importância fundamental nessa jornada.

À Daniela dos Santos e Ellen Godinho, pela amizade e pela grande ajuda durante esse dois anos de mestrado;

Aos amigos e colegas do Laboratório de Processos de Separação (LPS): Rita, Rosana, Bruno, Omar, Fabiola, César Augusto, Ingrid, Ivan, Leandro (Léo), Gisele, Bruna Mara, Carol, Roney, Pricilla, Janaina;

Aos amigos da turma de 2001/2 de Engenharia de Alimentos (UFT), em especial à Amanda Rabello, Alexandre, Vidal, Thiago, Priscilla e Alessandra;

Aos amigos de república, Marco Sartori, Saulo, Elvanio e Ney Bruno pela amizade e os bons momentos vividos em Viçosa - MG e Keko, Maycon, Vítor e Júnior, pela amizade e convivência na república Labuás em Itapetinga – BA;

Aos amigos Johnson, Brenda, Luana, Jaqueline e Cláudia, pela alegria do convívio e cumplicidade na busca pela vitória; e

A todos os amigos que, de alguma forma, contribuíram para este trabalho e não foram aqui citados, meus sinceros agradecimentos.

Essa vitória custou-lhe momentos difíceis, noites de dúvidas, intermináveis dias de espera.

Desde os tempos antigos, celebrar um triunfo faz parte do próprio ritual da vida: a comemoração é um rito de passagem.

“Celebrar hoje a sua vitória de ontem, para ter mais forças na batalha de amanhã.”

Manual do Guerreiro da Luz

Paulo Coelho

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
SIMBOLOGIA	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo geral	3
2.2. Objetivos específicos	3
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1. Soro de queijo	4
3.2. Glicomacropéptido (GMP)	4
3.3. Purificação de GMP em trocador iônico.....	6
3.4. Troca iônica	8
3.5. Equilíbrio de adsorção em trocador iônico	9
3.6. Tanques agitados.....	10
3.7. Isotermas de adsorção	10
3.8. Variáveis que influenciam no processo de troca iônica.....	12
3.8.1. Temperatura.....	12
3.8.2. Tipo e Concentração de Sal	13
3.8.3. pH.....	13
3.8.4. Natureza da Proteína.....	14
3.8.5. Natureza do Adsorvente.....	14
3.9. Calorimetria e troca iônica.....	14
4. MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1.1 Preparo das soluções.....	17
4.1.2 Experimentos de adsorção	18
4.2. Titulação microcalorimétrica (Experimento 2).....	19
4.2.1 Ensaios de adsorção com GMP	19
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
5.1. Equilíbrio de adsorção de GMP na resina aniônica Streamline Q XL em sistema do tipo tanque agitado.....	21
5.2. Efeito da concentração de sal (NaCl) no equilíbrio de adsorção de GMP	25
5.3. Efeito do pH no equilíbrio de adsorção do GMP em resina aniônica.....	31
5.4. Efeito da temperatura no equilíbrio de adsorção de GMP.....	35
5.6. Análise termodinâmica	38
5.6.1. Efeito da concentração de NaCl sobre a entalpia de adsorção do GMP na resina aniônica Streamline Q XL.....	39
5.6.2. Efeito da temperatura sobre a entalpia de adsorção do GMP na resina aniônica Streamline Q XL	43
6. CONCLUSÕES	47
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

LISTA DAS TABELAS

Tabela 1 - Composição teórica de aminoácidos presentes no glicomacropéptido.....	5
Tabela 2 – Dados de Equilíbrio empH 7,40.....	23
Tabela 3 – Dados de Equilíbrio empH 8,20.....	24
Tabela 4 - Valores de energia livre de Gibbs e capacidade máxima aparente de adsorção para diferentes temperaturas e concentrações de NaCl	39
Tabela 5 - Média das propriedades termodinâmicas em função da concentração de NaCl e temperatura.....	42

LISTA DAS FIGURAS

Figura 1 – Perfil isotérmico de adsorção em pH 7,4 e 8,2 da proteína GMP na resina Streamline Q XL. (a) Efeito da concentração de NaCl e (b) Efeito da temperatura.....	21
Figura 2 – Isotermas de adsorção em pH 7,4 e 8,2 da proteína GMP na resina Streamline Q XL. (a) Efeito da concentração de NaCl e (b) Efeito da temperatura.....	22
Figura 3 – Gráfico Semi-recíproco da adsorção de GMP na resina aniônica Streamline Q XL. (a) Efeito da concentração de NaCl e (b) Efeito da temperatura.....	22
Figura 4. Isotermas de adsorção de GMP em resina aniônica em diferentes concentrações de NaCl em pH 7,4 e temperatura de 15°C.	25
Figura 5. Isotermas de adsorção de GMP em resina aniônica em diferentes concentrações de NaCl em pH 7,4 e temperatura de 30°C.	26
Figura 6. Isotermas de adsorção de GMP em resina aniônica em diferentes concentrações de NaCl em valor pH 7,4 e temperatura de 45°C.	26
Figura 7. Isotermas de adsorção de GMP em resina aniônica em diferentes concentrações de NaCl em pH 8,2 e temperatura de 15°C.	27
Figura 8. Isotermas de adsorção de GMP em resina aniônica em diferentes concentrações de NaCl em pH 8,2 e temperatura de 30°C.	28
Figura 9. Isotermas de adsorção de GMP em resina aniônica em diferentes concentrações de NaCl em pH 8,2 e temperatura de 45°C.	28
Figura 10. Capacidade máxima de adsorção de GMP em resina aniônica em diferentes concentrações de sal (NaCl) em pH 7,4.....	30
Figura 11. Capacidade máxima de adsorção de GMP em resina aniônica em diferentes concentrações de sal (NaCl) em pH 8,2.....	31
Figura 12. Efeito do pH sobre a capacidade máxima de adsorção (q_m) de GMP em resina aniônica na temperatura de 15° e diferentes concentrações de NaCl: (●) 0mM NaCl; (○) 10mM NaCl; (▼) 30mM NaCl; (Δ) 60mM NaCl; (■) 80mM NaCl; (□) 110mM NaCl.	32
Figura 13. Efeito do pH sobre a capacidade máxima de adsorção (q_m) de GMP em resina aniônica na temperatura de 30° e diferentes concentrações de NaCl: (●) 0mM NaCl; (○) 10mM NaCl; (▼) 30mM NaCl; (Δ) 60mM NaCl; (■) 80mM NaCl; (□) 110mM NaCl.	33
Figura 14. Efeito do pH sobre a capacidade máxima de adsorção (q_m) de GMP em resina aniônica na temperatura de 45° e diferentes concentrações de NaCl: (●) 0mM	

NaCl; (○) 10mM NaCl; (▼) 30mM NaCl; (Δ) 60mM NaCl; (■) 80mM NaCl; (□) 110mM NaCl.	33
Figura 15 - Isotermas de adsorção de GMP em resina aniônica Streamline Q XL com diferentes temperaturas e concentração de NaCl (A: 0mM; B: 10Mm; C: 30mM; D: 60mM; E: 80mM e F: 110Mm) em pH 7,4.....	36
Figura 16 - Isotermas de adsorção de GMP em resina aniônica Streamline Q XL com diferentes temperaturas e concentração de NaCl (A: 0mM; B: 10Mm; C: 30mM; D:60mM; E: 80mM e F: 110Mm) em pH 8,2.....	37
Figura 17. Entalpia de adsorção de GMP em resina aniônica Streamline Q XL em pH 8,2 e temperatura de 45°C.....	40
Figura 18. Entalpia de adsorção de GMP em resina aniônica Streamline Q XL em pH 8,2 e temperatura de 25°C.....	41
Figura 19. Efeito da temperatura sobre a entalpia de adsorção de GMP em resina aniônica Streamline Q XL a 0mM NaCl em pH 8,2.....	43
Figura 20. Efeito da temperatura sobre a entalpia de adsorção de GMP em resina aniônica Streamline Q XL a 30mM NaCl em pH 8,2.....	44
Figura 21. Efeito da temperatura sobre a entalpia de adsorção de GMP em resina aniônica Streamline Q XL a 80mM NaCl em pH 8,2.....	44

SIMBOLOGIA

a_A	atividade do componente <i>A</i> na fase líquida
$a_{A,s}$	atividade do componente <i>A</i> na fase sólida
a_I	atividade do componente <i>I</i> na fase líquida
$a_{I,s}$	atividade do componente <i>I</i> na fase sólida
A_s	ânions que originalmente estavam na superfície do adsorvente
<i>I</i>	ânions que originalmente estavam em solução
<i>C</i>	concentração de proteína na fase líquida ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
<i>b</i>	constante de equilíbrio da isoterma de Lagmuir ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) ($1/k_d$)
K_d	constante de equilíbrio
q_m	Quantidade máxima de proteína adsorvida ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
$\Delta_{ads}G^\circ$	energia livre de Gibbs de adsorção ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)
$\Delta_{ads}H^\circ$	entalpia de adsorção ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)
$\Delta_{ads}S^\circ$	entropia de adsorção ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)
<i>P</i>	potência térmica ($\text{J} \cdot \text{s}^{-1}$)
<i>Q</i>	efeito térmico de interação ($\text{J} \cdot \text{min}^{-1}$)
<i>R</i>	constante universal dos gases ($8,314472 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$)
Q_r	efeitos térmicos de reação da adsorção ($\text{J} \cdot \text{min}^{-1}$)
Q_d	efeitos térmicos de diluição ($\text{J} \cdot \text{min}^{-1}$)
Q_{int}	efeito térmico resultante ($\text{J} \cdot \text{min}^{-1}$)
ϕ	razão de fases

RESUMO

LIRA, Rafael de Araújo, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Julho de 2008. **Equilíbrio de adsorção de glicomacropéptido (GMP) em resina aniônica e análise termodinâmica.**
Orientador: Luis Antônio Minim. Co-orientadora: Renata Cristina Ferreira Bonomo.

O interesse na purificação de GMP do soro de queijo tem sua origem tanto no seu elevado valor nutricional e funcional quanto no potencial de aplicações médico-terapêuticas às quais se adapta. Ultimamente, esforços têm sido empregados em processos para produção de GMP em grande escala em que suas propriedades nutricionais e biológicas não sejam perdidas. Dentre estes métodos, que podem obter o GMP do soro de leite, estão os que utilizam resinas trocadoras de ânion. Para conhecer os fundamentos e aplicações desta técnica, foi realizada uma revisão sobre o assunto, enfocando principalmente a purificação de proteínas. Foram abordados tópicos como o mecanismo de troca iônica, os diversos fatores que influenciam este processo e apresentados exemplos de aplicação da cromatografia de troca iônica na purificação do GMP. Para que esses processos sejam economicamente viáveis e operacionalmente seguros, eles devem ser otimizados, sendo importante o conhecimento do equilíbrio adsorptivo e termodinâmico do processo. Com esse objetivo, foram determinadas as isotermas de adsorção para a proteína GMP em resina macroporosa trocadora de ânions Streamline Q XL. Os experimentos foram conduzidos em sistemas do tipo tanque agitado sob diferentes condições de temperatura (15; 30; 45)°C, concentração de NaCl (0,000; 0,010; 0,030; 0,060; 0,080 e 0,110)M e valores de pH (7,40; 8,20), em força iônica de 0,045M de solução tampão Tris-HCl. O modelo de Langmuir ajustou-se satisfatoriamente aos dados, o que possibilitou uma análise quantitativa estimando as constantes q_m (capacidade máxima de adsorção) e K_d (constante de dissociação que representa a razão entre a dessorção e a adsorção). Foram ajustadas equações de regressão polinomiais tendo como variáveis independentes temperatura, concentração de sal e pH. Foi observado que, em maiores concentrações de NaCl, ocorre uma redução na capacidade adsorptiva de GMP. Quando se eleva o valor de pH de 7,4 para 8,2, o efeito sob a capacidade de adsorção da proteína no trocador aniônico é de aumentar a adsorção. Quanto ao efeito da temperatura, fica evidente um aumento da capacidade adsorptiva da proteína GMP na resina aniônica Streamline Q XL com a elevação da temperatura, principalmente quando se comparam a menor e a maior temperatura avaliada. A análise termodinâmica baseada nas titulações calorimétricas demonstrou que o processo de troca iônica em todas as condições avaliadas ocorre de maneira espontânea ($\Delta_{ads} G^\circ < 0$). Quando o processo é conduzido apenas em solução tampão Tris (0mM NaCl), na temperatura de 45°C, é exotérmico e entálpicamente dirigido, enquanto nas demais situações com crescentes concentrações de NaCl à mesma temperatura, o processo é endotérmico, entropicamente dirigido. Na temperatura de 25°C foi possível constatar pelos

valores de entalpia de adsorção ($\Delta_{\text{ads}}H$) que o processo é endotérmico, entropicamente dirigido, para todas as situações avaliadas nesta temperatura. Por fim, foi sugerido na discussão termodinâmica um modelo que considera o efeito do eletrólito e da temperatura sobre a dupla camada elétrica no processo de adsorção do GMP na resina aniônica Streamline Q XL.

ABSTRACT

LIRA, Rafael de Araújo, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, July 2008. **Adsorption equilibrium of glycomacropeptide (GMP) in anion-exchange resin and thermodynamic analysis.** Adviser: Luis Antônio Minim. Co-adviser: Renata Cristina Ferreira Bonomo.

The interest in the purification of GMP from whey is originated in its high nutritional and functional value and in the potential of medical/therapeutic applications. Efforts have been made in large scale production processes of GMP which do not damage its nutritional and biological properties. Anionic exchange resin is one of these methods. A review was accomplished on this subject aiming the knowledge of the basis and applications of this technique, focusing mainly on the purification of proteins. Topics were approached as the mechanism of ionic exchange, the several factors that influence this process and examples of application of ion exchange chromatography in the GMP purification were presented. These processes should be optimized to be economically viable and operationally safe, so it is important the knowledge of the thermodynamic and adsorption equilibrium of the process. Adsorption isotherms of GMP protein were established in Streamline Q XL macroporous anion exchange resin. The experiments were conducted in stirred tanks systems at different conditions of temperature (15, 30, 45) °C, NaCl concentration (0.000, 0.010, 0.030, 0.060, 0.080 and 0.110) M and pH values of (7, 40, 8, 20), in a 0.045 M Tris-HCl buffer. The Langmuir model fitted the data satisfactorily, allowing a quantitative analysis, estimation of the q_m (maximum adsorption capacity) and K_d constants (dissociation constant that represents the ratio between desorption and adsorption). Polynomial regression functions were adjusted with the independent variables, temperature, salt concentration and pH value. A reduction in GMP adsorption capacity was observed in larger NaCl concentrations. The effect of the protein adsorption capacity in the anionic exchanger increases the adsorption when the pH value rises from 7.4 to 8.2. Relatively to the temperature effect it is evident an increase in the GMP adsorption capacity in Streamline Q XL anion exchange resin with the temperature rise, mainly when comparing lower and higher temperatures evaluated. Thermodynamic analysis based on calorimetric titration demonstrated that ion exchange process was spontaneous in all of the appraised conditions ($\Delta G^\circ_{ads} < 0$). When the process is conducted in Tris buffer solution (0 mM NaCl), in the temperature of 45 °C, it is exothermic and enthalpically driven while in the other situations at the same temperature, and increasing NaCl concentrations, the process endothermic, entropically driven. In the temperature of 25 °C it was possible to verify with the values of enthalpy of adsorption ($\Delta_{ads}H$) that the process is endothermic, entropically driven, for all

situations evaluated. Finally, a model was proposed in the thermodynamic discussion considering the electrolyte and the temperature effect on the double electric layer in the process of GMP adsorption in the resin Streamline Q XL anion exchange.

1. INTRODUÇÃO

Durante muito tempo, o soro foi considerado um resíduo industrial ou produto com valor comercial residual, descartado em cursos de água ou incorporado em rações para animais. Felizmente, esta prática vem sendo abandonada e, dadas as suas excelentes propriedades biológicas, tecnológicas e nutricionais, cada vez mais o soro do leite é tratado como um produto com elevado valor agregado. Nas três últimas décadas, foram desenvolvidos processos de separação que permitiram obter várias proteínas com alto valor nutricional e tecnológico a partir do soro de leite.

As proteínas do soro podem ser usadas numa grande variedade de aplicações na indústria de alimentos por oferecerem uma série de benefícios funcionais e aplicação tecnológica, entre os quais: solubilidade, viscosidade, emulsificação e geleificação. As principais proteínas do soro são: α -lactalbumina, β -lactoglobulina, imunoglobulina e o glicomacropéptido (GMP). Em menor quantidade, mas com aplicações comerciais importantes, estão a lactoferrina e a lactoperoxidase (DOULTANI *et al.*, 2004).

O GMP, encontrado no soro doce, é um componente biologicamente ativo liberado a partir da κ -caseína pela ação da quimosina no elo peptídico Phe105-Met106, durante a fabricação do queijo. Devido às suas funções biológicas, aplicações tecnológicas e valores nutricionais, grande atenção tem sido dada às técnicas de isolamento e purificação desse peptídeo, considerado um ingrediente potencial para o desenvolvimento de alimentos funcionais. Como o GMP não contém aminoácidos aromáticos, também pode ser utilizado em alimentos para o tratamento da fenilcetonúria, pois o GMP é uma das únicas proteínas naturais livres deste aminoácido (NAKANO *et al.*, 2002). Diferentes métodos para separação de GMP são descritos na literatura, sendo que a maior parte foi desenvolvida em escala de laboratório ou se encontra protegida por patentes. Atualmente, dois métodos de separação do GMP do soro de queijo têm sido empregados, ambos utilizando a ultrafiltração.

A cromatografia de troca iônica é uma das principais técnicas utilizadas na recuperação e purificação de biomoléculas (JAMES e DO, 1991), estando presente nos estágios iniciais da maioria dos processos conhecidos. Na produção industrial, as etapas de concentração, separação e purificação respondem por mais de 50 % dos custos operacionais, envolvidos com equipamentos e materiais de consumo, sendo desejável e necessária a otimização desses processos, para a garantia de um melhor desempenho, maior eficiência e redução de custos operacionais. Para tanto, é necessário conhecer o equilíbrio de adsorção para os compostos de interesse. Usualmente, o equilíbrio é apresentado na forma de isotermas de adsorção que relacionam a concentração de um composto, em solução e na superfície de um sólido adsorvente, ao longo de uma faixa de concentrações de interesse (JACOBSON *et al.*, 1987). A

isoterma é uma relação termodinâmica fundamental que permite a predição precisa dos perfis de bandas individuais (GUIOCHON *et al.*, 1994).

Vários parâmetros de processo podem alterar o comportamento de adsorção das proteínas e, conseqüentemente, seu equilíbrio. Dentre eles, há o tipo de tampão utilizado, a natureza dos co- e contra-íons em solução (FANG *et al.*, 1996), a temperatura (MIHELÍČ *et al.*, 2003), a força iônica (HUANG *et al.*, 1990) e outros.

Neste trabalho, foram determinadas experimentalmente isotermas de adsorção para a proteína GMP em resina de troca aniônica Streamline Q XL em um sistema de tanque agitado sob diferentes condições de temperatura, concentração de NaCl e pH. O modelo de Langmuir foi ajustado aos dados experimentais para predição do equilíbrio. E as propriedades termodinâmicas ($\Delta_{\text{ads}}H$, $\Delta_{\text{ads}}S$, $\Delta_{\text{ads}}G$) foram determinadas pela titulação microcalorimétrica.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Estudar o equilíbrio e as propriedades termodinâmicas de adsorção do glicomacropéptídeo na resina trocadora de ânions Streamline Q XL.

2.2. Objetivos específicos

- Obter isothermas no equilíbrio adsorptivo de GMP nas temperaturas de 15, 30 e 45°C com diferentes concentrações de NaCl (0, 10, 30, 60, 80 e 110)mM em pH 7,4 e 8,2;
- Ajustar o modelo de Langmuir aos dados experimentais para predição do equilíbrio;
- Correlacionar os parâmetros da isoterma de Langmuir com temperatura, pH e concentração de sal; e
- Determinar as propriedades termodinâmicas ($\Delta_{\text{ads}}H$, $\Delta_{\text{ads}}S$, $\Delta_{\text{ads}}G$) com a utilização de dados experimentais de titulação microcalorimétrica.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Soro de queijo

No passado, o soro de queijo era basicamente empregado para alimentação animal. A presença de proteínas no soro torna-o também um material adequado para uso na alimentação humana. As proteínas do soro correspondem a 20% das proteínas do leite, e a α -lactoalbumina, a β -lactoglobulina e o glicomacropeptídeo (GMP) representam cerca de 90% do total das proteínas do soro (MORR & HÁ, 1993; DA SILVA, 2007). No soro são encontradas também a albumina de soro bovino, imunoglobulinas, proteases-peptonas, lactoferrina, lactoperoxidase e outras enzimas (MORR & HÁ, 1993). As proteínas do soro são compostas por aminoácidos essenciais em proporções equilibradas e têm alta digestibilidade. São valiosas nutricionalmente devido à alta concentração de aminoácidos sulfurados (TOSI *et al.*, 1997).

A utilização dessas proteínas do soro como produtos de maior valor comercial está alicerçada em dois fatores principais: o alto prejuízo ambiental causado pelo descarte descontrolado do soro em rios e o alto valor nutricional agregado a estas proteínas (TOSI *et al.*, 1997).

3.2. Glicomacropeptídeo (GMP)

O glicomacropeptídeo é um peptídeo derivado da caseína que corresponde a cerca de 10 a 20% do total de proteínas do soro do queijo doce. Quando o leite é submetido ao tratamento com a enzima quimosina durante a fabricação de queijo, a proteína k-caseína é hidrolisada em dois peptídeos. A clivagem ocorre entre os aminoácidos 105 (Phe) e 106 (Met), liberando um peptídeo C-terminal solúvel de 6,8 kDa que é o GMP e um peptídeo insolúvel, denominado para-k-caseína N-terminal de 12,271 kDa (DZIUBA & MINKIEWICZ, 1996; EL-SALAM *et al.*, 1996).

O peptídeo para-k-caseína contém os resíduos de aminoácidos 1 a 105 e se torna parte do queijo, enquanto o GMP, contendo os resíduos de aminoácidos 106 a 169, permanece solúvel no soro. Existem duas variantes genéticas de GMP, variante A e variante B, as quais diferem em dois aminoácidos. O GMP é caracterizado pela ausência de aminoácidos aromáticos, assim não apresenta absorção a 280 nm e pode ser detectado na faixa de 210 nm a 250nm (EL-SALAM *et al.*, 1996). É rico em aminoácidos de cadeia ramificada (valina e isoleucina) e pobre em metionina (EIGEL *et al.*, 1984; DZIUBA & MINKIEWICZ, 1996).

GMP é um dos inúmeros nomes para o peptídeo resultante da quebra da κ -caseína. O peptídeo é também conhecido como caseinomacropeptídeo (CMP), caseinoglicomacropeptídeo

(CGMP) ou peptídeo derivado da caseína (CDP). Neste trabalho, será conservada a nomenclatura glicomacropéptido (GMP) com a qual os autores denominam este peptídeo. Geralmente, costuma-se denominar GMP a forma glicosilada, devido a seu elevado conteúdo de carboidrato e CMP a forma não glicosilada do peptídeo. A composição do GMP é variada e depende particularmente da fonte do soro e da tecnologia empregada para seu isolamento (MARTÍN-DIANA *et al.*, 2006). Na Tabela 1, pode-se observar a composição teórica dos aminoácidos encontrados no GMP.

Tabela 1 - Composição teórica de aminoácidos presentes no glicomacropéptido

AMINOÁCIDOS	ABREVIATURAS	VALOR TEÓRICO* (%)
Ácido aspártico	Asp	8,5
Treonina	Thr	18,2
Serina	Ser	7,8
Ácido glutâmico	Glu	19,2
Glicina	Gly	0,9
Alanina	Ala	5,3
Valina	Val	8,9
Metionina	Met	2,0
Isoleucina	Ile	10,1
Leucina	Leu	1,7
Tirosina	Tyr	0
Fenilalanina	Phe	0
Histidina	His	0
Lisina	Lys	5,7
Arginina	Arg	0
Prolina	Pro	11,6

Fonte: CHU; MACLEOD e OZIMEK (1996).

NOTAS: *Valor teórico calculado conforme a estrutura primária do GMP.

Entre as aplicações biológicas potenciais do GMP estão a inibição de cáries dentárias, efeitos na secreção gástrica, promovendo a atividade de crescimento da bifidobactéria e modificação do crescimento da bactéria do ácido láctico (EL-SALAM *et al.*, 1996). Estudos de sua habilidade para nutrir a microflora intestinal saudável apontam-no como tendo um ótimo potencial para uso como prebiótico em alimentos (IDOTA *et al.*, 1994). Propriedades anticariogênicas inibem a adesão de bactérias cariogênicas como *Streptococcus mutans*, *S. sanguis* e *S. sobrinus*, tornando a microbiota dental mais favorável (NEESER *et al.*, 1994;

SCHUPBACH *et al.*, 1996). Estudos adicionais têm mostrado que o GMP reduz o apetite, fazendo dele um componente apropriado em produtos utilizados no controle de peso (YVON *et al.*, 1994). TAKAHASHI *et al.* (1992) relatam a obtenção de um alimento hipoalergênico à base de GMP, com elevado valor nutritivo, facilmente absorvido e digerido e com ação anti-inflamatória.

O GMP tem sido também um dos parâmetros mais utilizados na detecção de soro de queijo adicionado fraudulentamente ao leite (DRACZ, 1996).

O GMP apresenta diferentes propriedades funcionais. Foi relatado que a substituição da clara de ovos por GMP em merengues, biscoitos e geléias alterou nestes produtos as propriedades funcionais: capacidade de formação de espuma, estabilidade da espuma, textura e capacidade de formação de géis. Adicionalmente, foi obtida uma fórmula de geléia, fortificada com GMP, que é deficiente em fenilalanina e, portanto, adequada para pacientes com fenilcetonúria (EL-SALAM *et al.*, 1996; MARSHALL, 1991). Posteriores estudos sobre a influência dos diversos fatores tecnológicos sobre as propriedades funcionais do GMP indicarão novos usos para este composto como um ingrediente alimentício. Sua estabilidade frente ao calor, sua solubilidade em condições ácidas e sua natureza anfifílica sugerem também múltiplos usos em sistemas alimentícios (TOLKACH & KULOZIK, 2005). Trata-se, portanto, de uma fonte protéica funcional de promissora capacidade industrial.

Diferentes métodos para separação de GMP são descritos na literatura, sendo que a maior parte foi desenvolvida em escala de laboratório ou se encontra protegida por patentes. Dentre estes métodos, pode-se citar a separação por membranas (TOLKACH & KULOZIK, 2005; MARTIN-DIANA & FONTECHA, 2002; KAWASAKI *et al.*, 1996; TANIMOTO *et al.*, 1992), a troca iônica (DOULTANI *et al.*, 2004; XU *et al.*, 2000), a cromatografia de interação hidrofóbica (BRAMANTI *et al.*, 2003) e a precipitação (SAITO *et al.*, 1991).

Para a quantificação do GMP, os métodos propostos usam normalmente a cromatografia de fase reversa, a cromatografia de troca iônica e a cromatografia de exclusão molecular (BRAMANTI *et al.*, 2003; EL-SALAM *et al.*, 1996; DZIUBA & MINKIEWICZ, 1996; BRANDÃO *et al.*, 1988). Outro método utilizado é a eletroforese capilar (MIRALLES *et al.*, 2001).

3.3. Purificação de GMP em trocador iônico

Ultimamente, esforços têm sido empregados em processos para produção de GMP em grande escala com preservação de suas propriedades nutricionais e biológicas. Dentre estes métodos, que podem obter o GMP do soro de leite ou concentrado protéico do soro, estão aqueles que utilizam resinas trocadoras de ânion (CASAL *et al.*, 2005).

De acordo com KAWASAKI & DOSAKO (1991), o método patenteado em EP0488589A1 propõe um processo para produção de GMP em que o material é colocado em contato com um trocador iônico, seguido pela coleta da fração que não é adsorvida no trocador. Após o ajuste do pH desta fração para um valor inferior a 4 e tratamento por ultrafiltração com membrana de 10-50kDa, obtém-se o permeado. Este permeado é então ultrafiltrado em membrana abaixo da massa molecular do GMP. O produto apresenta pureza entre 55 e 88%.

TANIMOTO *et al.*(1992) utilizaram soro preparado a partir de caseína láctica e propuseram a produção em larga escala de GMP. O soro foi filtrado, dessalinizado e liofilizado, levando a uma preparação de GMP com conteúdo de fenilalanina de 2,4% (p/p). O GMP foi purificado por cromatografia de troca-iônica, usando Q-Sepharose® , tendo apresentado um nível de fenilalanina de 0,9% (p/p).

O processo de purificação do GMP proposto por AYERS *et al.* (1998), que consta na patente WO 98/14071, parte de materiais derivados do leite para produção em grande escala e com concentração de fenilalanina ao nível de 0,5% (p/p). O GMP purificado desta maneira pode ser utilizado como suplemento em dietas para pacientes com fenilcetonúria. Este processo compreende contato do GMP contido no material de partida com um trocador de ânion (QA GiboCel TM, Life Technologies Ltd), sob condições em que o GMP seja adsorvido, eluição do GMP removendo as impurezas por inúmeros processos e a recuperação do GMP purificado. Em pH 5,1, ocorreu eluição de 91% do GMP.

A cromatografia de troca-iônica foi utilizada por NAKANO & OZIMEK (1999) para purificação de GMP de fração não-dialisável de soro usando uma coluna de DEAE-Sephacel equilibrada em dois pHs (6,4 e 3,0). Este método, utilizando a coluna equilibrada em pH 3,0, mostrou a obtenção de uma fração de GMP de alta pureza e com um rendimento de 1g por litro de soro. Os autores concluem que cromatografia em DEAE-Sephacel em pH 3,0 é um método fácil e pode ser aplicado para separação de GMP das outras proteínas do soro em larga escala.

A separação de imunoglobulina G e do GMP do soro de leite foi investigada por XU *et al.* (2000) por meio da cromatografia de troca-aniônica, utilizando a resina IRA93 e a membrana Amicon YM100. Pelo fato de o GMP estar negativamente carregado em pH 4,7, a resina IRA93 adsorveu o GMP do soro de leite.

ETZEL (1999) apresenta um processo de produção de GMP com propriedades nutracêuticas a partir do soro, tendo sido utilizados dois trocadores de íons de polaridade oposta em série. Este processo é relatado na patente U.S. 5.968.586, e o produto obtido apresenta, conforme o autor, cerca de 4% do total dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, triptofano e resíduos de tirosina.

DOULTANI *et al.* (2003) demonstraram também a viabilidade do uso de dois trocadores de íons de polaridade oposta em série para recuperação simultânea de isolado protéico de soro e GMP usando um único fluido de soro. Para recuperação do isolado protéico

de soro, foi utilizada uma coluna empacotada com um trocador de cátions (SP Sepharose Big Beads da Amersham Biosciences) e para a recuperação do GMP uma coluna empacotada com um trocador de ânion (Q Sepharose Big Beads da Amersham Biosciences). As colunas cromatográficas foram eluídas com tampões baratos e de grau alimentício e recuperaram 92% da maioria das proteínas do soro e 96% do GMP.

Um processo para produção de GMP substancialmente puro tendo propriedades nutracêuticas é apresentado por ETZEL (2001) na patente U.S.6.168.823 B1 e compreende o contato do soro com um trocador de ânion seguido pela técnica de cromatografia de afinidade. A novidade desta invenção é baseada na descoberta de que as proteínas do soro são imobilizadas por íons metálicos, mas o GMP não. Esta patente descreve em detalhes a produção de GMP que pode ser utilizado para fins médicos e alimentares. O pH do soro é preferencialmente ajustado entre 4-6 e filtrado através de filtro de 0,7 μ m. Informa o autor que a vantagem do processo é a sua condução a temperaturas elevadas de 35 a 60°C, incrementando a eficiência da separação. Após contato com um trocador aniônico, duas frações são produzidas: uma fração de proteínas do soro enriquecida em GMP e uma solução de soro livre de GMP. A fração enriquecida é então colocada em contato com um adsorvente quelante de metal, e os peptídeos e proteínas contaminantes são removidas por adsorção, purificando a fração em GMP.

Tentando utilizar um resíduo abundante da indústria pesqueira, quitosana produzida principalmente de cascas de camarão e caranguejo, NAKANO *et al.* (2004) conduziram um estudo para desenvolver um método de isolar o GMP usando resinas de quitosana como trocadoras de ânion. Cascas de camarão foram usadas para preparar duas resinas de quitosana, uma com amina primária (resina A) e outra com amina secundária (resina B) como o principal grupo funcional. Estas resinas foram testadas como adsorventes para isolar o GMP do soro e os resultados foram comparados com trocador de ânion comercial. O mais importante relato deste experimento foi que a capacidade de a resina A se ligar ao GMP foi muito maior do que a da resina B. Os autores propõem testes para o uso industrial desta resina para a produção de GMP em grande escala. Análises de aminoácidos sugerem que o GMP assim isolado pode substituir o soro de leite como ingrediente de vários produtos alimentícios, incluindo fórmulas infantis, produtos panificáveis e bebidas.

3. 4. Troca iônica

A operação de troca iônica pode ser definida como um fenômeno físico-químico em que uma solução troca íons com a superfície de um sólido poroso (GUIOCHON *et al.*, 1994). As técnicas usadas na troca iônica são tão semelhantes às usadas na adsorção que, para a maioria dos casos de interesse na engenharia, esta troca catiônica pode ser considerada um caso especial da adsorção (GEANKOPLIS, 1993).

Adsorção é o fenômeno no qual moléculas em uma fase fluida se concentram em uma superfície sólida sem mudança química. De um modo geral, a adsorção acontece como resultado de forças não balanceadas na superfície, as quais atraem e retêm certas moléculas, o adsorbato do fluido ao redor da superfície do sólido, o adsorvente. A energia de adsorção determina a força com a qual a molécula é adsorvida com relação a outras moléculas no sistema (SUZUKI, 1990).

3.5. Equilíbrio de adsorção em trocador iônico

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

O tempo necessário para que o sistema atinja o equilíbrio é o primeiro passo para a investigação do seu comportamento, podendo ser verificado por meio do estudo da cinética da adsorção. O comportamento no equilíbrio pode ser investigado por meio das isotermas de adsorção. A isoterma de adsorção é o ponto de partida para qualquer análise do processo de adsorção. Ela é uma parte essencial da modelagem da cinética de adsorção e, portanto, essencial para o design do processo em batelada ou coluna, eficiência e economia. A isoterma determina o grau de purificação que pode ser alcançado, a quantidade aproximada de adsorvente necessária para alcançar um determinado grau de pureza e a sensibilidade do processo de purificação na concentração do soluto (DECHOW, 1989).

A estrutura de um trocador de íons consiste de uma matriz sólida com grupos iônicos carregados (positivos ou negativos) ligados a essa matriz. Íons de cargas opostas, denominados contra-íons, neutralizam essas cargas, mantendo o sistema em equilíbrio. Ao colocar o trocador de íons em contato com uma solução eletrolítica, ocorre uma perturbação do sistema até que um novo equilíbrio seja estabelecido (SAMUELSON, 1963).

A troca iônica ocorre de maneira similar a uma reação estequiométrica. À medida que a concentração de contra-íons sobre a superfície do adsorvente diminui, sua concentração em solução aumenta. Do mesmo modo, a concentração dos íons que estavam em solução é reduzida, à medida que sua concentração aumenta na superfície do adsorvente (GALLANT, 2004). Para um trocador de ânions monovalentes, tal reação é representada por:



Em que I e A são, respectivamente, os ânions da solução e da superfície do trocador de íons, que estão sendo trocados. O índice 's' se refere à fase sólida. No equilíbrio, tem-se que (GUIOCHON *et al.*, 1994):

$$K = \frac{a_{I,S} \cdot a_A}{a_{A,S} \cdot a_I} \quad (2)$$

Em que a_I é a atividade do componente I na fase sólida (s) ou na fase líquida; a_A é a atividade do componente A nas mesmas fases; e K é a constante de equilíbrio ou coeficiente de partição.

3.6. Tanques agitados

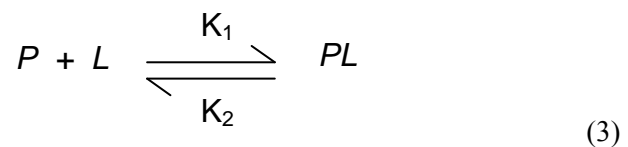
O tratamento em tanques agitados é adotado quando a capacidade e o equilíbrio do adsorvente são suficientemente grandes para garantir a proximidade da completa adsorção em um único estágio, desejado na maioria dos ensaios laboratoriais. Tanques agitados são muito usados para determinação de isothermas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

3.7. Isothermas de adsorção

No projeto de um processo de purificação ou de sua ampliação de escala, é usual o estudo do equilíbrio do soluto entre a solução e o adsorvente usando as isothermas de adsorção (BELLOT & CONDORET, 1993; GUIOCHON *et al.*, 1994; GRITTI E GUIOCHON, 1993). Em 1916, Langmuir desenvolveu um modelo simples para tentar prever o grau de adsorção de um gás sobre uma superfície como uma função da pressão do fluido (LANGMUIR, 1916). Diversos exemplos práticos da utilização do modelo da isoterma de Langmuir para modelagem da adsorção de proteínas podem ser encontrados na literatura científica, incluindo a adsorção de Lisozima em Blue-Sepharose (HORSTMANN *et al.*, 1986), a adsorção de HSA (Albumina do Sangue Humano), lisozima e álcool desidrogenase em Cibacross Blue F3G-A imobilizadas com Sepharose CL-GB, Sepharose 4B, Gelatina GC 700, Fractogel HWSSF, HWG5F, HW75F, Spherosil XBO30 (ANSPACH *et al.*, 1990) e adsorção de BSA (Albumina do Soro Bovino) em adsorventes de quitosana (YOSHIDA & KATAOKA, 1989) entre outros.

Segundo GERARD *et al.* (1997), quando a molécula de proteína é relativamente pequena, ela se torna facilmente acessível aos ligantes imobilizados na matriz porosa, e o balanço global e dinâmico da adsorção acontece rapidamente. Com isso, o equilíbrio local se

torna válido. A isoterma de Langmuir representa um modelo simplificado no caso de adsorção de proteínas, uma vez que este modelo assume: (a) sistema ideal; (b) as moléculas são adsorvidas e aderem à superfície do adsorvente em sítios definidos e localizados; (c) cada sítio pode acomodar uma e somente uma molécula adsorvida; (d) a energia da molécula adsorvida é a mesma em todos os sítios da superfície e não depende da presença ou ausência de outras moléculas adsorvidas nos sítios vizinhos; e (e) todos os sítios de adsorção têm a mesma afinidade com as moléculas de proteína. Sob tais pressupostos, o caráter adsorptivo de uma proteína pode ser representado pela seguinte equação de equilíbrio:



Em que k_1 e k_2 são as constantes de equilíbrio da reação, que levam em conta as resistências à transferência de massa da difusão da proteína na fase líquida para a superfície do adsorvente. Nessa difusão, ocorrem interações da molécula de proteína com o adsorvente que podem ser expressas pela equação da taxa de transferência:

$$\frac{dq}{dt} = k_1 C (q_m - q) - k_2 q \quad (4)$$

Em que C é a concentração de proteína na fase líquida, q é a quantidade de proteína adsorvida na matriz e q_m é a capacidade máxima de adsorção da matriz adsorvente. No equilíbrio (indicado pelo asterisco), a taxa de adsorção é proporcional à taxa de dessorção, $\frac{dq}{dt}$ torna-se nula, e a Equação 4 pode ser escrita:

$$q = \frac{q_m C}{K_d + C} \quad (5)$$

Em que K_d é constante de dissociação que representa a razão entre a dessorção e a adsorção.

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

3.8. Variáveis que influenciam no processo de troca iônica

3.8.1. Temperatura

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

temperatura de trabalho, aumentando a capacidade adsorptiva da resina com o mínimo de desnaturação protéica possível.

3.8.2. Tipo e Concentração de Sal

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

3.8.3. pH

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

3.8.4. Natureza da Proteína

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

3.8.5. Natureza do Adsorvente

Como regra geral, para a retenção de proteínas em condições de pH acima do pI (com carga líquida negativa) utilizam-se trocadores aniônicos (com grupos fixos positivos), enquanto para condições abaixo do seu pI, utilizam-se trocadores catiônicos (KOPACIEWICZ *et al.*, 1983; GRANDISON, 1996). No entanto, outras características dos adsorventes podem exercer influência no processo de troca iônica. ANSPACH *et al.* (1990) observaram para a adsorção de lisozima melhores resultados para os adsorventes com base de sílica que os de base polimérica. Enquanto os primeiros mantinham sua estrutura intacta ao longo do tempo, os adsorventes poliméricos apresentaram deformações em sua estrutura, causando um excesso de compactação e impedimento estérico para a entrada da proteína nos poros da resina. FANG *et al.* (1996) verificaram diferenças no mecanismo de adsorção de proteínas em adsorventes do tipo 'tentáculo' (com poros de grande diâmetro nominal) e em adsorventes tradicionais microporosos, principalmente na morfologia dos ligantes e acessibilidade aos sítios de adsorção. Os autores submetem os adsorventes às mesmas condições de trabalho com diferentes proteínas, observando alterações no comportamento de cada uma.

3.9. Calorimetria e troca iônica

A calorimetria passou a ser um dos métodos mais importantes desde o surgimento da termodinâmica para a investigação das propriedades e estruturas dos materiais. Os calorímetros, bastante sensíveis no acompanhamento de efeitos térmicos associados às microquantidades de

materiais, são freqüentemente chamados de microcalorímetros (CESTARI & AIROLDI, 1997). Um microcalorímetro moderno possui uma sensibilidade variando entre 0,02 e 100 μW , com capacidade do vaso reator variando de 1,0 a 25,0 cm^{-3} (AIROLDI, 1995). Estudos calorimétricos devem ser baseados na medida da variação de temperatura, em pressão constante, que é proporcional à quantidade de energia na forma de calor liberada ou absorvida para um dado, seja ele químico, físico, ou biológico, por sua vez proporcional à quantidade de matéria envolvida (WADSÖ, 1997), atendendo, portanto, à primeira lei da termodinâmica. Então, quando a potência térmica (P) de uma dada interação é medida sob pressão constante, o efeito térmico de interação (Q) pode ser determinado (FONSECA & AIROLDI, 2000), sendo expresso por:

$$P = d(\Delta Q) / dt \quad (6)$$

É imprescindível conhecer o sistema a ser estudado, pelo menos a quantidade de componentes envolvidos na possível interação química, física ou biológica, como na adsorção por troca iônica, possibilitando estimar a entalpia (ΔH^0), energia livre de Gibbs (ΔG^0) e a entropia (ΔS^0) a partir de considerações termodinâmicas, conforme as equações.

$$\Delta H^0 = Q \quad (7)$$

Para estimativa da variação da energia livre de Gibbs do processo adsorptivo, a relação com a constante de equilíbrio (K) pode ser utilizada (LEVINE, 1995):

$$\Delta G^0 = -RT \ln K \quad (8)$$

No processo de adsorção de macromolécula (proteína) em um sólido poroso, GERSTNER *et al.* (1994) utilizaram uma equação semelhante, em que a constante de equilíbrio K é dada por k'/φ . E a Equação 6 pode ser reescrita como:

$$\Delta_{ads} G^0 = -RT \ln \left(\frac{k'}{\varphi} \right) \quad (9)$$

Em que k' é o fator capacidade e φ é a razão das fases.

A relação termodinâmica é dada pela equação de Gibbs-Helmholtz (LEVINE, 1995):

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad (10)$$

A técnica calorimétrica consiste em acompanhar ponto a ponto o efeito térmico total da interação. É conduzida por injeções sucessivas da solução titulante no sistema contido no vaso calorimétrico. Este procedimento é levado até o término da reação ou a qualquer outro ponto desejado. É bom frisar que a solução titulante, antes de entrar em contato com o titulado, é previamente termostatzada à mesma temperatura. O efeito térmico total de interação é então determinado pelo somatório dos efeitos térmicos obtidos durante a titulação calorimétrica. Os procedimentos necessários para a determinação do efeito térmico resultante de sistemas químicos realizados em microcalorímetros são de simples execução e consolidados na literatura (CRESCENZI *et al.*, 1981; PAVAN *et al.*, 2004). A partir do efeito térmico resultante do sistema, é possível determinar a entalpia do processo por considerações do efeito Joule. A partir do conhecimento das possíveis interações do sistema estudado, estabelecendo-se uma relação entre o efeito térmico e a energia de acordo com conceito de Hess. Sua lei, que é um caso particular do primeiro princípio da termodinâmica, pode ser entendida pelo uso do ciclo termoquímico, que pode ser exemplificado para a medida calorimétrica envolvendo materiais.

Com as determinações dos efeitos térmicos seria possível em uma única etapa determinar a constante de equilíbrio e a variação de entalpia do sistema, entretanto, a impossibilidade de determinar a concentração de proteína no sobrenadante após cada volume adicionado remete aos ensaios de adsorção em batelada. Por meio do valor da constante de equilíbrio, determina-se a variação de energia livre de Gibbs, que juntamente com a variação de entalpia possibilita a determinação da variação de entropia. Neste tipo de sistema heterogêneo, os dados são ajustados ao modelo de Langmuir, na formação de adsorção em monocamada sobre a superfície do material polimérico (resina).

A microcalorimetria é uma técnica altamente eficiente para a determinação das propriedades termodinâmicas a partir das constantes primárias, obtidas pelo método em batelada nos ensaios de adsorção. Ela, algumas vezes, não fica restrita a análises de sistemas calorimétricos convencionais. No trabalho aqui apresentado, o polímero é uma resina trocadora de íons, que foi devidamente estabilizada com solução tampão de Tris-HCl, sendo titulada com adsorvato de solução protéica de glicomacropéptideo, em diferentes concentrações de NaCl. As grandezas termodinâmicas obtidas ilustram os efeitos térmicos obtidos na interface sólido/líquido do sistema.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Isotermas de adsorção (Experimento 1)

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

Foi utilizado nos experimentos um adsorvente aniônico, cujo grupo de troca iônica é o amino quaternário, considerado um aniônico forte. A resina Streamline Q XL da Amersham Pharmacia Biotech® possui em sua matriz um núcleo de quartzo cristalino, de forma esférica, tamanho médio da partícula de 200µm e densidade média igual a 1,2 g/mL, sendo estável em todos os tampões aquosos comumente usados (PHARMACIA, 2002). Esta resina fornece excelente recuperação e alta resolução de materiais de origem biológica e é adequada ao isolamento e à purificação de proteínas, entre outros biocompostos, devido à sua estrutura rígida e incompressível (FONTAN, 2005).

A proteína usada como adsorbato foi o GMP (Glicomacropéptido), adquirido da Davisco Foods International Inc. (Minnesota, USA), em tampão Tris-HCl (Vetec, Brasil) 0,045M, variando pH, concentração de NaCl e temperaturas, de acordo com os ensaios de cada experimento.

4.1.1 Preparo das soluções

Segundo FONTAN (2001), o valor ótimo de força iônica para solução tampão de Tris-HCl em pH 7,4 e 8,2 é de 0,045M. Para preparar a solução de Tris-HCl com força-iônica 0,045M, foram pesadas 2,7257g de Tris (Tris-hidroximetil-aminometano; PM 121,14 g/mol) em balança analítica (Denver Instrument, USA). Essa quantia foi solubilizada em aproximadamente 400mL de água deionizada, com auxílio de agitadores magnéticos. Em seguida, o pH foi ajustado com HCl 6,0N para o valor desejado, o qual foi aferido em pHmetro (MB-10/Marte), com posterior complementação do volume com água deionizada até 500mL. As soluções tampão de Tris-HCl, foram preparadas com diferentes concentrações de NaCl (Vetec, Brasil).

Para o preparo das soluções de proteína, foram pesados cerca de 0,3g de GMP (Davisco Foods International Inc., Minnesota, USA) em uma balança analítica, solubilizando esta quantidade em aproximadamente 4mL da solução tampão com auxílio de um agitador magnético. Após isso, o volume foi completado até a marca de aferição em balão volumétrico de 10mL. A concentração real de GMP desta solução foi determinada por espectrofotometria (Spectrophotometer Cary 50, Varian, Australia) a 240nm, utilizando como branco a solução

tampão isenta de proteína. Uma curva de calibração com concentrações conhecidas de GMP (0,02 a 2,0 mg/mL) foi previamente preparada.

4.1.2 Experimentos de adsorção

Os dados experimentais para obtenção das isotermas de adsorção de GMP foram obtidos por meio de ensaios em batelada, mantendo-se constante, para cada condição experimental, o valor de pH, da temperatura e da concentração de sal.

Antes da realização dos experimentos, foi feito um pré-condicionamento da resina, fornecida pelo fabricante em solução aquosa de 20% etanol. Para isso, foram transferidos cerca de 20mL do adsorvente para tubos centrífugos de 50mL, acrescentando a mesma quantidade de água ultrapura (Milli-q, Millipore, França). Os tubos foram agitados por 10 minutos e centrifugados (Eppendorf Mod. 5804, Alemanha), e a resina foi recuperada descartando-se o sobrenadante. O mesmo procedimento foi repetido 3 vezes e, em seguida, mais 2 vezes utilizando, no entanto, o tampão Tris-HCl. Foi então obtida uma pasta de resina pré-condicionada, que foi transferida para uma placa de Petri e deixada em estufa a 323,1K por ± 10 horas até atingir peso constante.

Posteriormente à secagem, foram pesados 50 mg ± 10 mg da resina, com auxílio de uma balança analítica (Denver Instruments, USA), diretamente em tubos eppendorf de 2,0 mL e acrescentados 800 μ L do tampão Tris. Os tubos foram deixados sob leve agitação por um período de 12 horas para condicionamento da resina. Após este tempo, nos vários tubos contendo a resina pré-condicionada, foram adicionados diferentes volumes (0 a 1000) μ L da solução de GMP, de forma a obter diferentes concentrações de proteína nos tubos. Em seguida, foi adicionado tampão para completar o volume de solução para 1800 μ L. Os tubos foram agitados por 12 horas, sob temperatura controlada (DBO Mod. 101M/3 Eletrolab®, Brasil), de forma a estabelecer o equilíbrio.

Os experimentos foram realizados usando diferentes valores de pH (7,40, 8,20), temperatura (15, 30, e 45)°C e de concentração de NaCl (0,000, 0,010, 0,030, 0,060, 0,080 e 0,110)M.

No final do período de agitação, os tubos foram centrifugados (microcentrífuga Labnet Force 7, Denver Instrument Company, USA) a $7500 \times g$ por 15 minutos. O sobrenadante de cada tubo foi recolhido para determinação da concentração de GMP nas condições de equilíbrio (C) em espectrofotômetro (Spectrophotometer Cary 50, Varian, Australia), em comprimento de onda de 240nm, considerando o branco do ensaio com absorbância igual a zero. As curvas de calibração foram obtidas por meio de análise em espectrofotômetro a 240nm de soluções de GMP de concentrações conhecidas (0,02 a 2mg/mL). A concentração de proteína adsorvida na resina aniônica (q) tem relação direta com a concentração do soluto na fase líquida, observada

por meio das curvas de calibração e determinada por um balanço de massa no sistema, do qual resulta:

$$q = \frac{V}{m}(C_0 - C_b) \quad (11)$$

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

4.2. Titulação microcalorimétrica (Experimento 2)

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Química Verde Coloidal e Macromoléculas (QUIVECOM) do Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa – MG - Brasil.

Os efeitos térmicos das interações do adsorbato (GMP) com a resina foram determinados em um microcalorímetro de titulação isotérmica (CSC, modelo ITC 4200). Os ciclos de experimentos calorimétricos foram realizados nas temperaturas de 25 e 45°C com 0, 30, 80 e 110 mM de NaCl em pH 8,2. Foram determinados os efeitos térmicos de reação da adsorção, Q_r e de diluição da proteína, em solução tampão Tris, Q_d . Estes efeitos foram determinados ponto a ponto para cada incremento da titulação calorimétrica. Assim, o efeito térmico resultante (Q_{int}) para cada sistema estudado foi obtido aplicando a Equação 12.

$$Q_{int} = Q_r - Q_d \quad (12)$$

4.2.1 Ensaio de adsorção com GMP

Uma amostra de aproximadamente 0,015 g da resina Streamline Q XL da Amersham Pharmacia Biotech® previamente seca foi suspensa em 1800µL de água ultrapura (Milli-q, Millipore, França) e permaneceu sob agitação por ±12 horas para condicionamento dessa resina no tampão Tris-HCl, em pH 8,2. Este mesmo procedimento foi repetido para constituir uma série de bateladas, cada experimento com diferentes concentrações de NaCl (0, 30, 80 e 110mM) e temperaturas (25 e 45°C). Depois do tempo de estabilização da resina, a solução foi transferida para o vaso reacional do microcalorímetro, onde se manteve sob agitação por um

período até obter a estabilização da linha de base calorimétrica. Os experimentos foram conduzidos a 25 e 45°C ± 0,02. Adições sucessivas de 10µL do titulante, (solução de GMP numa concentração de ±70mg/mL) foram feitas por meio de uma seringa conectada a uma cânula de microespessura, acoplada à torre de agitação. O efeito térmico resultante de cada adição da solução foi medido por efeito joule e expresso num gráfico de potência versus tempo. Então, após a medida do efeito do titulante, foi repetido o processo para a determinação do efeito de diluição, em que no vaso reacional continha apenas a solução tampão de Tris-HCl com as respectivas concentrações salinas.

4.9. Análise estatística

Os experimentos foram realizados segundo um delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial (2 x 6 x 3) com dois valores de pH, seis concentrações de sal e três temperaturas, constituído de 36 tratamentos e duas repetições. Os dados experimentais foram analisados usando o procedimento PROC GLM do software estatístico SAS (SAS versão 8,0, Cary, NC, SAS Institute, Inc., 1998). A confiabilidade da equação do modelo polinomial obtido foi avaliada utilizando o coeficiente de determinação R^2 , o resultado das análises de variância (ANOVA) e o nível de significância estatístico pelo teste de Fisher (F, $P < 0,05$). Os níveis de significância dos coeficientes da regressão foram obtidos pelo teste t de Student ($P < 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Equilíbrio de adsorção de GMP na resina aniônica Streamline Q XL em sistema do tipo tanque agitado

Os experimentos de adsorção de GMP foram realizados sob diferentes condições de pH, temperatura e concentrações de NaCl. A Figura 1a ilustra o efeito da concentração de NaCl sobre o equilíbrio de adsorção no valor de pH 7,4 e temperatura de 15°C, enquanto a Figura 1b ilustra o efeito da temperatura no valor de pH 8,2 e com 0mM de NaCl.

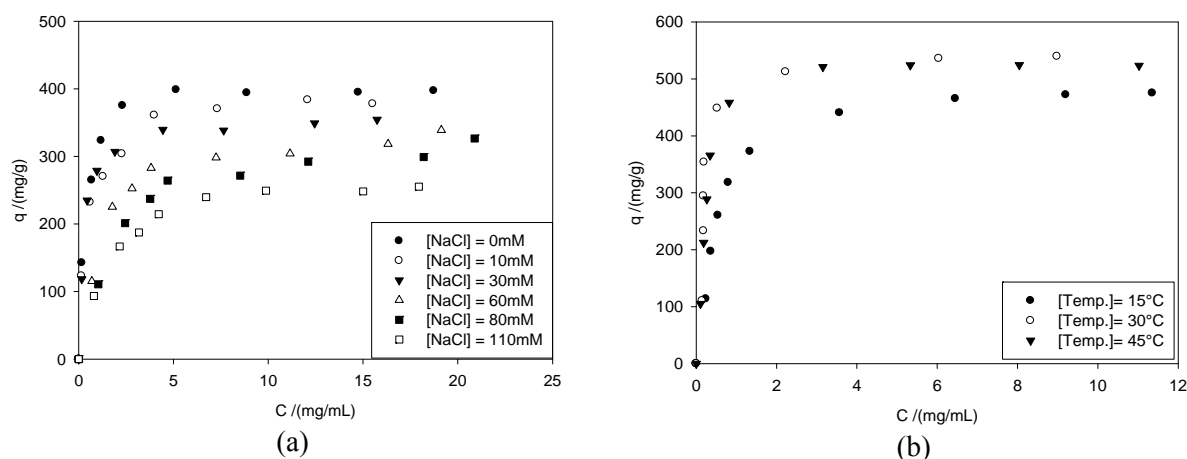


Figura 1 – Perfil isotérmico de adsorção em pH 7,4 e 8,2 da proteína GMP na resina Streamline Q XL. (a) Efeito da concentração de NaCl e (b) Efeito da temperatura.

No presente trabalho, todos os dados experimentais foram tratados segundo o modelo de Langmuir, e os resultados obtidos demonstraram um ajuste satisfatório do modelo aos dados experimentais. A Figura 2 mostra a isoterma de adsorção do modelo de Langmuir para o valor de pH 7,4 e temperatura de 15°C com diferentes concentrações de NaCl e para o valor de pH 8,2 com 0mM de NaCl em diferentes temperaturas, respectivamente.

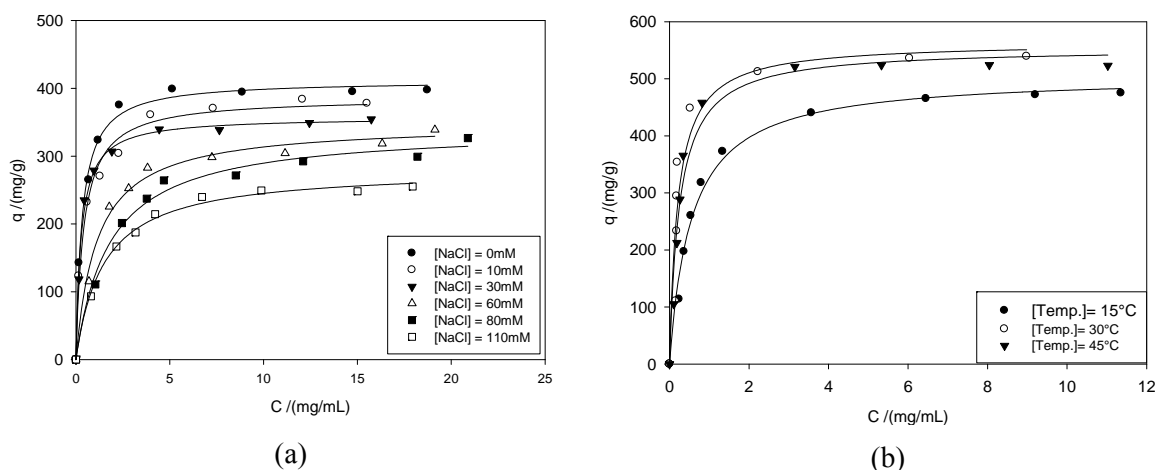


Figura 2 – Isotermas de adsorção em pH 7,4 e 8,2 da proteína GMP na resina Streamline Q XL. (a) Efeito da concentração de NaCl e (b) Efeito da temperatura.

Para certificação do ajuste do modelo de Langmuir a todos os dados experimentais, fez-se o uso de gráficos semi-recíprocos (C/q versus C). Segundo WIRTH *et al.* (1993), os valores dos dados de adsorção em maiores concentrações de proteína possuem maior validade quando plotados numa regressão semi-recíproca. A linearidade dos gráficos representa o ajuste do modelo aos dados experimentais (GERARD *et al.*, 1997). Exemplos desses gráficos são mostrados na Figura 3: em 3a para diferentes concentrações de NaCl em pH 7,4 e temperatura de 15°C e em 3b para diferentes temperaturas com 0mM de NaCl e pH 8,2, respectivamente.

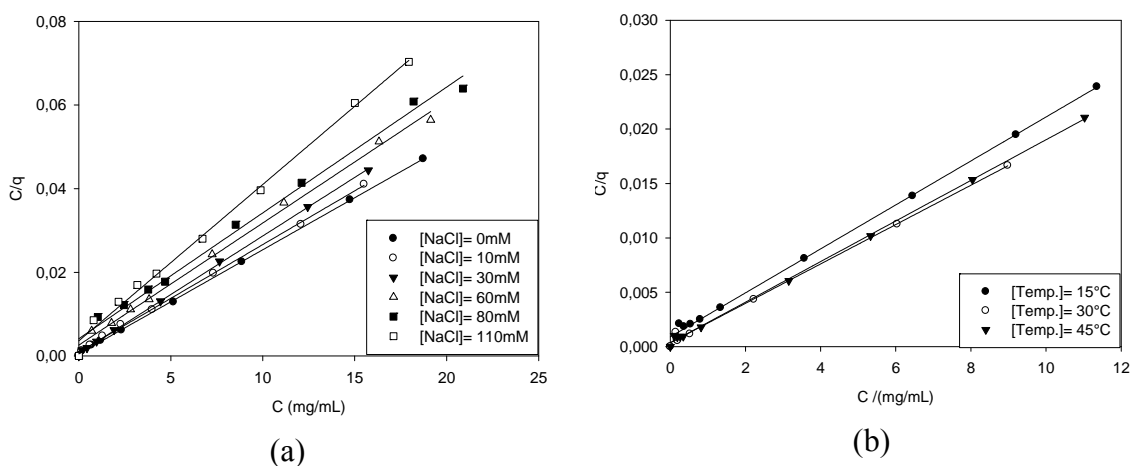


Figura 3 – Gráfico semi-recíproco da adsorção de GMP na resina aniônica Streamline Q XL. (a) Efeito da concentração de NaCl e (b) Efeito da temperatura.

A linearidade observada na construção dos gráficos da relação q/C versus C indica que o comportamento da adsorção de GMP na resina aniônica Streamline Q XL pode ser representado pelo modelo da isoterma de Langmuir.

As Tabelas 2 e 3 apresentam os valores q_m e K_d do ajuste do modelo de Langmuir aos dados experimentais da adsorção do GMP na resina aniônica Streamline Q XL em função da concentração de NaCl e temperatura no valor de pH 7,4 e 8,2, respectivamente.

Tabela 2 – Dados de Equilíbrio em pH 7,40

$T/^{\circ}C$	$NaCl/mM$	$q_m/(mg/g)$	$K_d/(mg/mL)$	R^2
15	0	411,56±5,03	0,32±0,084	0,99
15	10	386,23±2,90	0,42±0,034	0,99
15	30	357,54±7,70	0,28±0,036	0,99
15	60	348,46±1,03	1,11±0,06	0,99
15	80	341,38±3,65	1,78±0,028	0,99
15	110	281,25±3,66	1,48±0,065	0,99
30	0	461,08±5,76	0,26±0,053	0,98
30	10	426,12±3,41	0,23±0,018	0,99
30	30	409,29±8,83	0,57±0,0026	0,98
30	60	370,22±1,55	0,60±0,09	0,99
30	80	260,89±6,7	0,74±0,042	0,99
30	110	237,01±4,24	1,07±0,01	0,97
45	0	552,95±3,14	0,91±0,057	0,99
45	10	479,07±8,02	0,93±0,041	0,99
45	30	449,84±2,34	1,08±0,029	0,99
45	60	414,65±2,7	1,26±0,024	0,99
45	80	365,51±9,07	1,34±0,025	0,99
45	110	299,6±4,38	1,68±0,031	0,99

Tabela 3 – Dados de Equilíbrio em pH 8,20

<i>T</i> / °C	<i>NaCl</i> / mM	<i>q_m</i> / (mg/g)	<i>K_d</i> / (mg/mL)	<i>R</i> ²
15	0	506,41±8,34	0,55±0,32	0,99
15	10	480,62±4,12	0,79±0,77	0,99
15	30	422,33±7,96	0,80±0,36	0,99
15	60	400,24±1,99	1,16±0,23	0,99
15	80	369,74±9,00	1,41±0,003	0,99
15	110	329,29±4,85	2,37±0,38	0,99
30	0	563,86±6,06	0,21±0,032	0,97
30	10	492,50±5,91	0,17±0,13	0,99
30	30	437,79±7,25	0,28±0,11	0,99
30	60	409,18±8,15	0,34±0,031	0,99
30	80	351,46±3,15	0,83±0,031	0,98
30	110	319,08±4,11	2,1±0,047	0,99
45	0	553,96±6,15	0,25±0,33	0,98
45	10	478,56±3,03	0,56±0,13	0,98
45	30	415,94±2,12	0,76±0,094	0,99
45	60	336,07±7,09	0,79±0,1	0,99
45	80	273,24±3,31	0,78±0,023	0,99
45	110	223,70±8,02	1,07±0,01	0,99

O modelo da isoterma de Langmuir (Equação 5) foi ajustado aos dados experimentais utilizando Sigma Plot 10, SystatSoftware Inc, e os parâmetros do modelo são apresentados nas Tabelas 3 e 4. Os coeficientes de determinação foram maiores que 0,97 em todos os casos, demonstrando uma boa adaptação do modelo de Langmuir aos dados experimentais.

Os dados de equilíbrio de adsorção variaram significativamente ($P < 0,05$) em função da temperatura, níveis de pH e concentração salina estudados e foi observada interação tripla significativa ($P < 0,05$), que evidencia a interdependência entre os fatores estudados. O modelo estimado para o parâmetro K_d (constante de dissociação que representa a razão entre a dessorção e a adsorção) está representado na Equação 13, e o modelo estimado para o parâmetro q_m (capacidade máxima de adsorção pelo modelo de Langmuir) pode ser observado na Equação 14.

$$K_d = -115665 + 201,22x_1 + 38,39x_2 - 4,59x_1 \cdot x_2 - 0,04x_2 \cdot x_3 \quad (13)$$

$$q_m = -6,7 + 0,91x_1 + 0,25x_2 + 0,01x_3 + 0,032x_1 \cdot x_2 \quad (14)$$

Em que x_1 é o valor de pH, x_2 é a temperatura em °C e x_3 é a concentração de NaCl em mM.

O modelo proposto na Equação 13 foi significativo ($P < 0,05$) para explicar a variação da constante de equilíbrio de adsorção de GMP em função do valor de pH, concentração de sal e temperatura, apresentando um valor de R^2 acima de 0,92. Do mesmo modo, o modelo proposto na Equação 14 foi significativo ($P < 0,05$) para explicar a capacidade máxima (aparente) de adsorção de GMP no equilíbrio em função do valor de pH, concentração de sal e temperatura, apresentando um valor de R^2 acima de 0,8.

5.2. Efeito da concentração de sal (NaCl) no equilíbrio de adsorção de GMP

O efeito da concentração de NaCl sobre a isoterma de adsorção do GMP na resina aniônica Streamline Q XL pode ser verificado nas Figuras 4, 5 e 6 para o valor de pH 7,4 e temperatura de 15, 30 e 45°C, respectivamente. É possível observar que a adsorção de GMP ocorre de maneira inversamente proporcional à concentração de NaCl, ou seja, o aumento da concentração salina diminuiu a capacidade de adsorção da resina em todas as temperaturas avaliadas para o valor de pH 7,4.

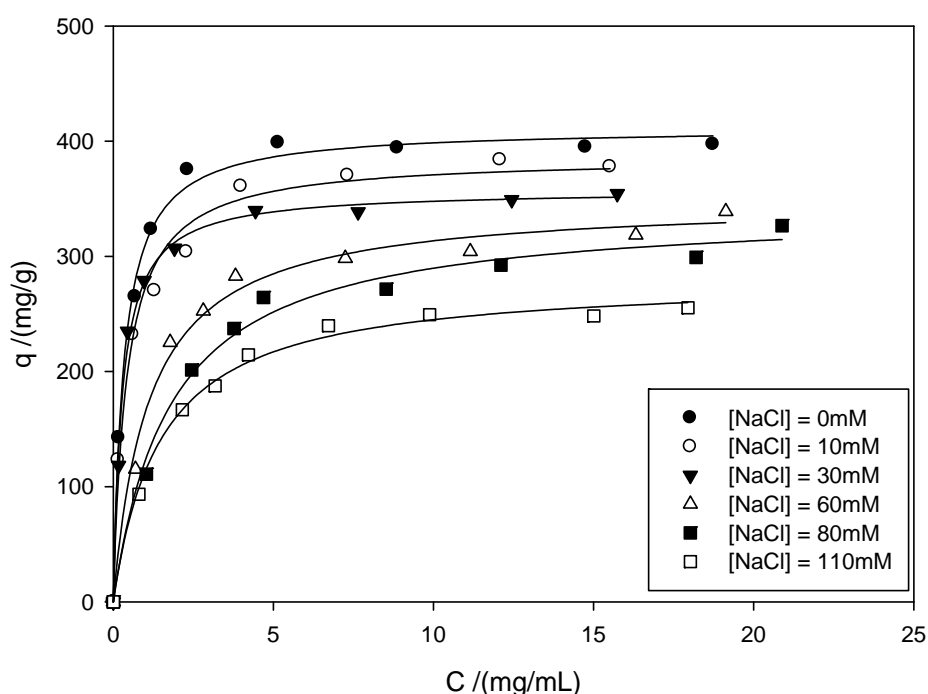


Figura 4. Isotermas de adsorção de GMP em resina aniônica em diferentes concentrações de NaCl, em pH 7,4 e temperatura de 15°C.

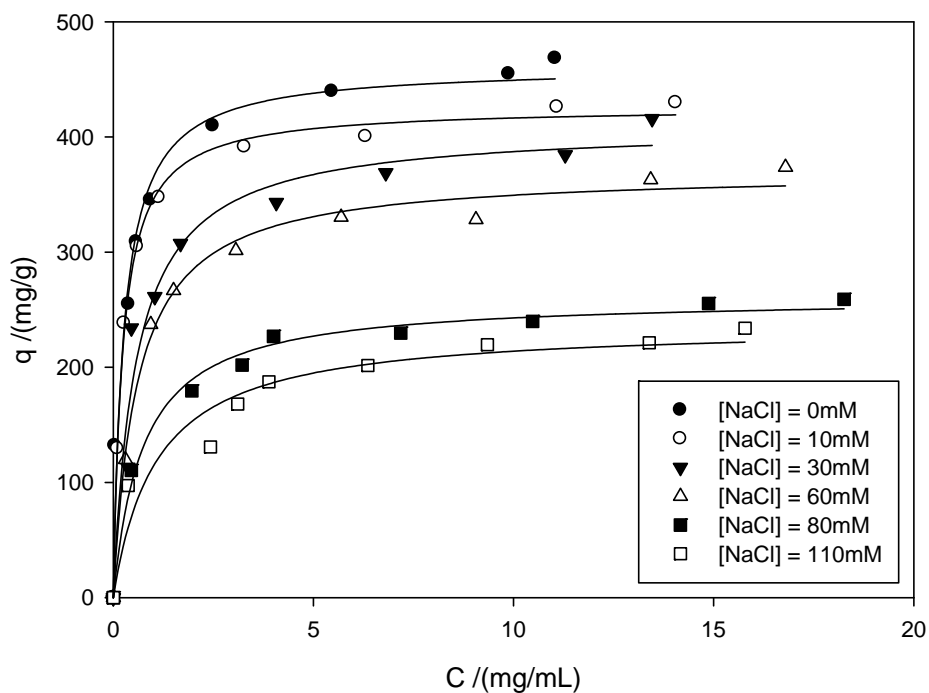


Figura 5. Isothermas de adsorção de GMP em resina aniônica em diferentes concentrações de NaCl, em pH 7,4 e temperatura de 30°C.

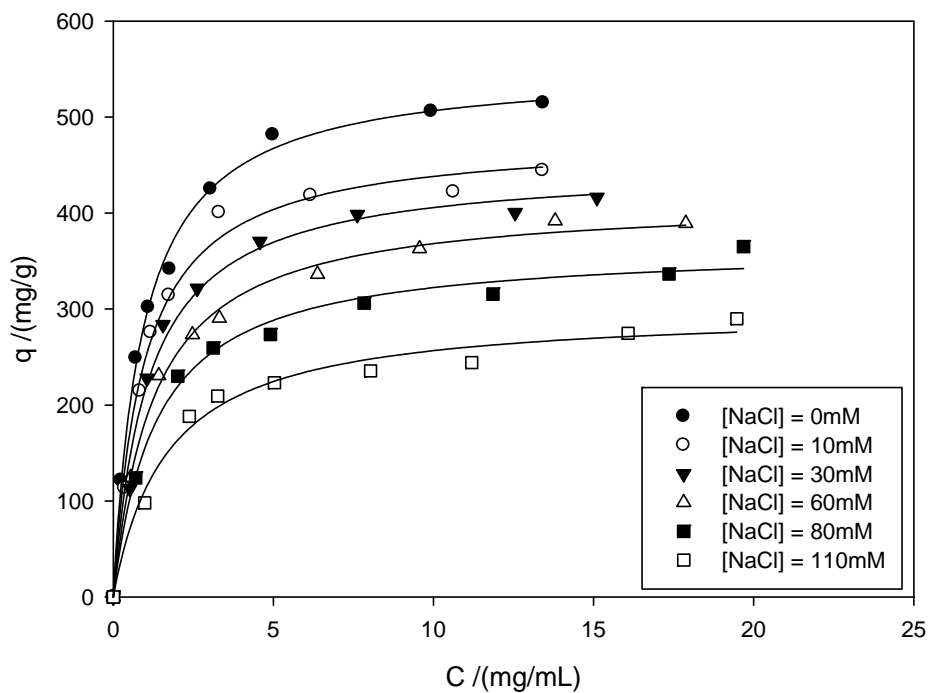


Figura 6. Isothermas de adsorção de GMP em resina aniônica em diferentes concentrações de NaCl, em pH 7,4 e temperatura de 45°C.

As Figuras 7, 8 e 9 mostram o efeito da concentração de NaCl sobre a isoterma de adsorção do GMP na resina aniônica Streamline Q XL para o valor de pH 8,2 e temperatura de 15, 30 e 45°C, respectivamente. É possível verificar que o mesmo comportamento observado anteriormente para pH 7,4 também é válido para pH 8,2, em toda a faixa de temperatura avaliada, quanto ao efeito da concentração de NaCl, ou seja, a adsorção do GMP é visivelmente comprometida pelo aumento da concentração salina.

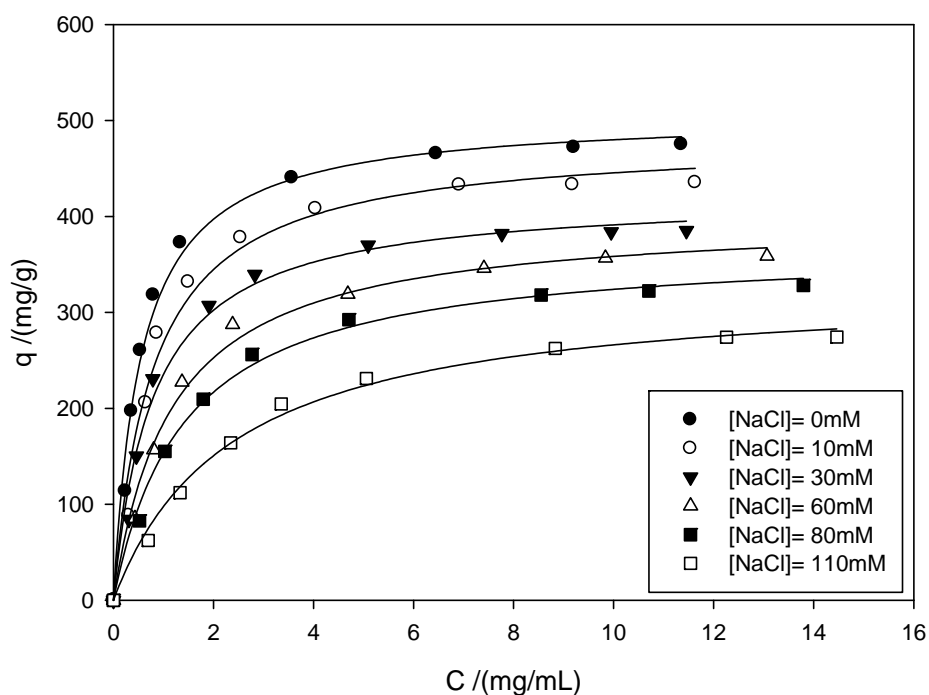


Figura 7. Isotermas de adsorção de GMP em resina aniônica em diferentes concentrações de NaCl, em pH 8,2 e temperatura de 15°C.

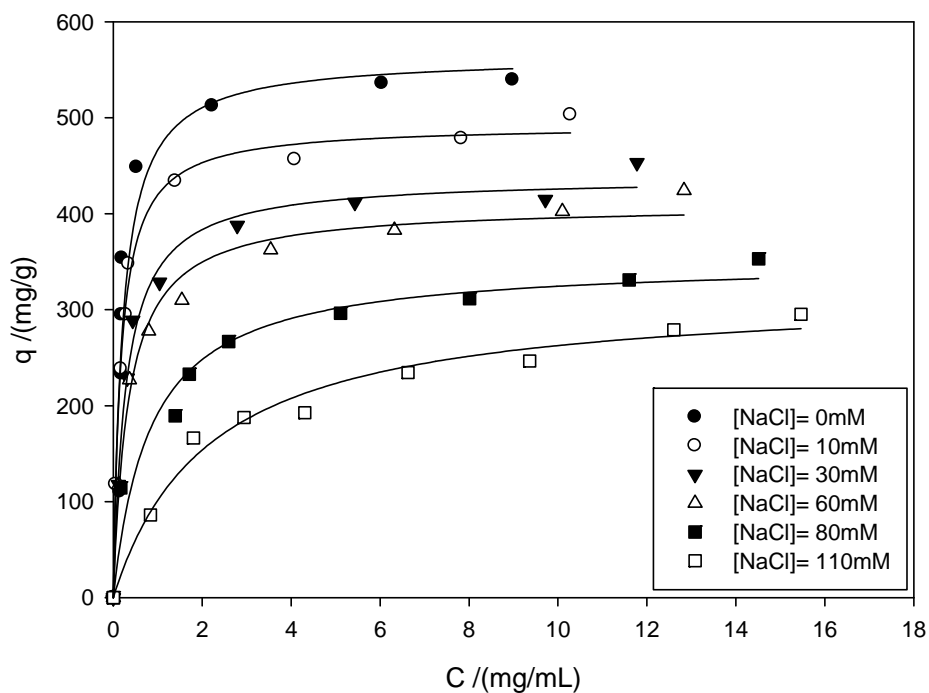


Figura 8. Isotermas de adsorção de GMP em resina aniônica em diferentes concentrações de NaCl, em pH 8,2 e temperatura de 30°C.

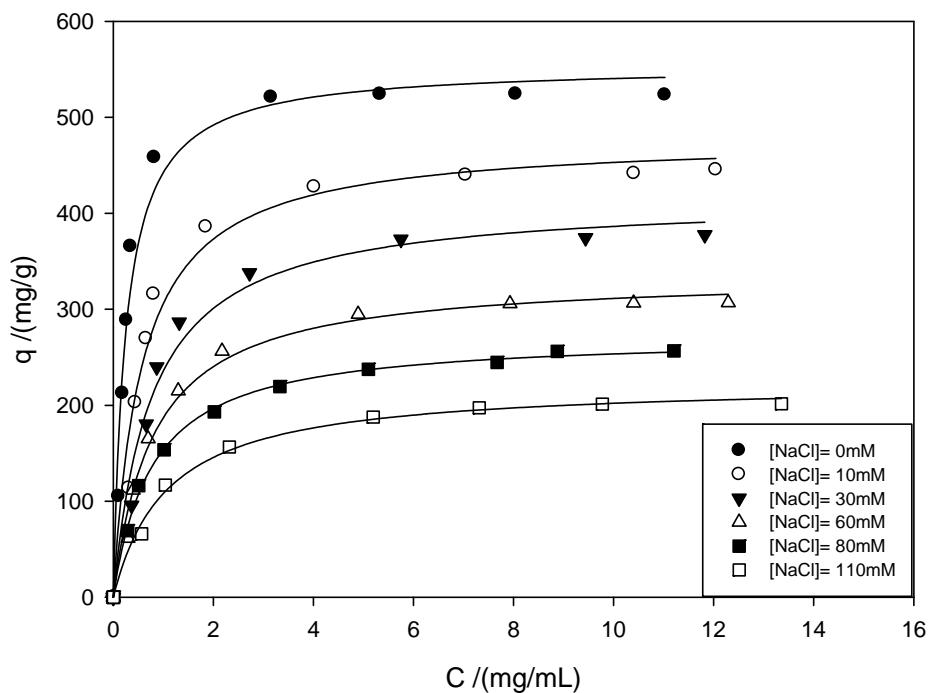


Figura 9. Isotermas de adsorção de GMP em resina aniônica em diferentes concentrações de NaCl, em pH 8,2 e temperatura de 45°C.

O efeito da concentração salina sobre o equilíbrio de adsorção mostra que quando existe uma elevação na densidade de cargas de interação eletrostática das moléculas envolvidas no processo há um fenômeno de repulsão proteína-adsorvente na dupla camada elétrica e a elevação da concentração salina não favorece a adsorção. Outro fator que contribui para este efeito foi a competição das moléculas de proteína em solução e os eletrólitos Cl^- da adição de NaCl com os contra-íons de troca. BOSTRÖM *et al.* (2003, 2004, 2005) demonstraram que o fenômeno pode ser entendido quando as forças de dispersão iônica entre íons e proteína são tratadas ao mesmo nível das interações da dupla camada elétrica, principalmente porque, enquanto as forças eletrostáticas normalmente dominam em baixas concentrações salinas, as forças de dispersão se tornam importantes em altas concentrações. BOSTRÖM *et al.* (2005) indicam que a inclusão das forças de dispersão atuantes entre as interações íon-íon e íon-macropartículas e dos efeitos íons-específicos de solvatação explicam grande parte dos efeitos de especificidade iônica.

GAO *et al.* (2007), em um estudo do efeito do pH e concentração salina sob o mecanismo de adsorção de proteínas em um trocador iônico, também observaram efeito semelhante devido à variação da concentração de NaCl . CHEN *et al.* (2006), avaliando um modelo que previa a influência da concentração de sal em uma ampla faixa de pH, justificaram este comportamento pela presença de um efeito estérico das interações intermoleculares das proteínas com os contra-íons. Quanto à concentração de sal em solução, HUANG *et al.* (1990) e FANG *et al.* (1996) relatam que no processo de troca iônica, quanto maior a concentração de sal menor a capacidade adsorptiva da resina, indicando que a principal força envolvida no processo de troca iônica é a atração eletrostática (LIN *et al.*, 2001).

Na Figura 10, fica evidente o decréscimo da capacidade máxima de adsorção (q_m) conforme se aumenta a concentração salina para o valor de pH 7,4 em toda a faixa de temperatura avaliada. Foi possível observar (Figura 10) que a partir de 60mM de NaCl , q_m demonstra um comportamento diferente em relação às demais situações quando se comparam as temperaturas de 15 e 30°C. Para as demais situações, q_m adquiriu comportamento diretamente proporcional à temperatura, e, a partir de 60mM de NaCl , a adsorção na temperatura de 30°C é menor que a adsorção a 15°C. Este fenômeno pode estar relacionado ao resultado do balanço de energia das interações envolvidas no processo de adsorção. De acordo GAO *et al.* (2007), a influência da concentração salina (NaCl) no processo de adsorção de proteína ocorre por meio do balanceamento da interação eletrostática e da interação hidrofóbica proteína/contra-íons de sal nos sítios de ligação da proteína e o adsorvente. Contudo, torna-se interessante um estudo mais aplicado para determinar a real influência da concentração de NaCl a partir da concentração de 60mM para as duas temperaturas (15 e 45°C).

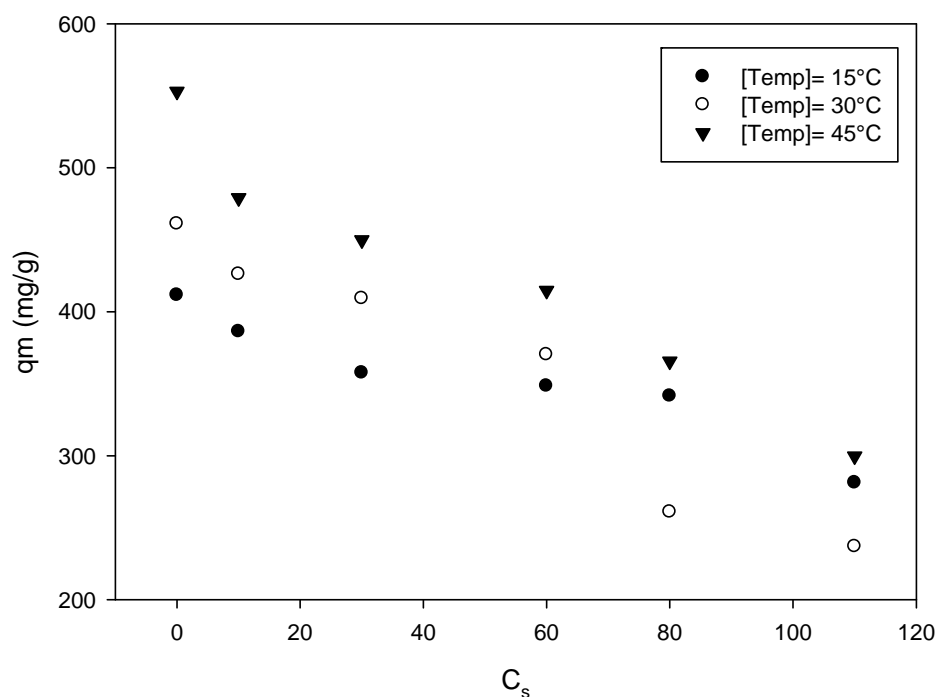


Figura 10. Capacidade máxima de adsorção de GMP em resina aniônica em diferentes concentrações de sal (NaCl) em pH 7,4.

Na Figura 11, é possível verificar o efeito da concentração salina sobre a capacidade máxima de adsorção em pH 8,2 para toda a faixa de temperatura avaliada. A capacidade máxima de adsorção, apesar de ter demonstrado a mesma tendência de decréscimo em função do aumento da concentração salina, não apresenta o mesmo comportamento em relação à temperatura, e é possível observar que a partir da concentração de 60mM de NaCl acontece uma diminuição da capacidade máxima mais acentuadamente, principalmente para a temperatura de 45°C.

A principal força envolvida nesse processo de adsorção é a de atração eletrostática. Porém, com aumento da concentração salina, as forças de interação hidrofóbica são reforçadas, o que explicaria a pouca diminuição de q_m em algumas situações em que aparece uma tendência à blindagem da interação eletrostática (atração/repulsão).

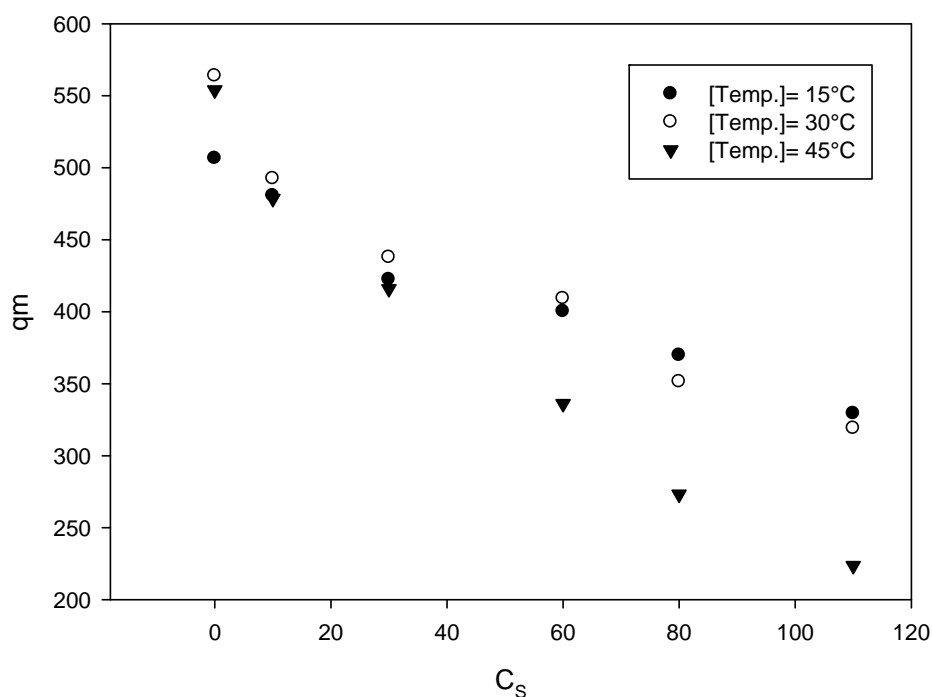


Figura 11. Capacidade máxima de adsorção de GMP em resina aniônica em diferentes concentrações de sal (NaCl) em pH 8,2.

O processo adsorptivo da proteína GMP na resina aniônica Streamline Q XL é resultado do balanço global das interações predominantes no processo e conseqüentemente na energia das interações das moléculas envolvidas, o que sugere um estudo mais específico quanto à influência da concentração de NaCl sobre a energia resultante das interações moleculares no sistema.

5.3. Efeito do pH no equilíbrio de adsorção do GMP em resina aniônica

As Figuras 12, 13 e 14 ilustram o efeito do pH sobre q_m para todas as concentrações de NaCl estudadas nas temperaturas de 15, 30 e 45°C, respectivamente. É possível verificar pelos gráficos que a adsorção do GMP foi consideravelmente significativa nos dois pHs estudados (acima do $pI= 4,3$). Na temperatura de 15°C (Figura 12), ficam evidentes dois comportamentos diferentes em função do pH.

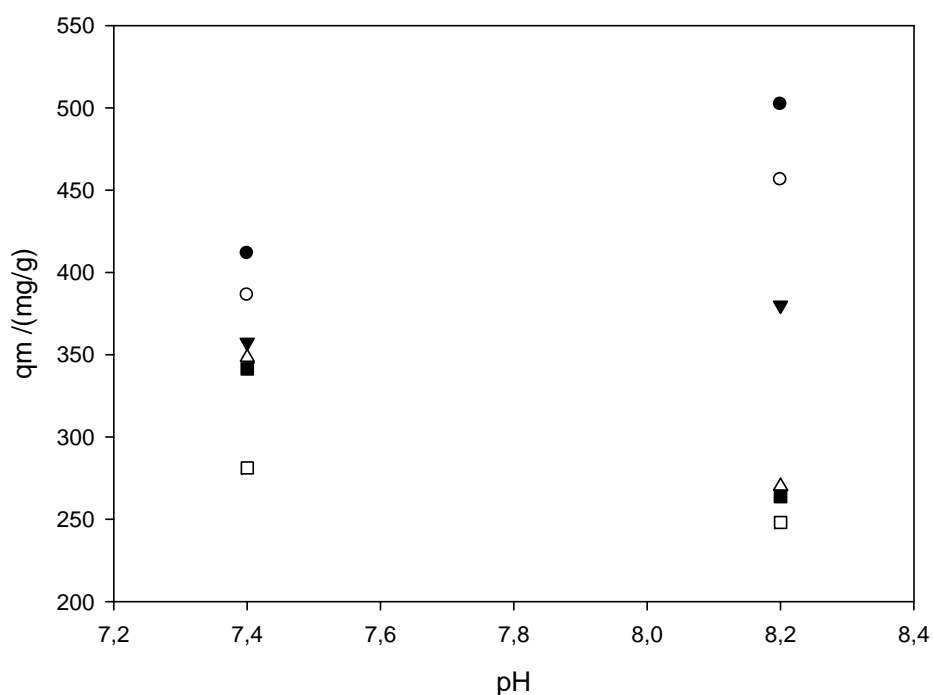


Figura 12. Efeito do pH sobre a capacidade máxima de adsorção (q_m) de GMP em resina aniônica, na temperatura de 15° e diferentes concentrações de NaCl: (●) 0mM NaCl; (○) 10mM NaCl; (▼) 30mM NaCl; (△) 60mM NaCl; (■) 80mM NaCl; (□) 110mM NaCl.

Para as menores concentrações de NaCl (0, 10, 30mM), é possível observar que ocorre um aumento no valor de q_m quando o valor de pH é aumentado de 7,4 para 8,2. Efeito contrário é observado para as demais concentrações de NaCl. A elevação no valor de pH de 7,4 para 8,2 mostra que o processo de adsorção da proteína torna-se maior, sugerindo que nesse pH a proteína adquire maior densidade de carga negativa, porém o processo se torna endotérmico à medida que aumenta a concentração salina, necessitando de uma elevação na temperatura para um aumento no valor de q_m .

Na temperatura de 30°C (Figura 13), a capacidade máxima de adsorção (q_m) demonstrou comportamento diretamente proporcional ao aumento no valor de pH, para todas as condições de concentração de NaCl avaliadas. Por outro lado, a 45°C (Figura 14), observa-se novamente um comportamento semelhante ao ocorrido para a temperatura de 15°C. Contudo, para essa temperatura, q_m permaneceu praticamente inalterado com a elevação no valor de pH para as menores concentrações salinas. A partir da concentração de 30mM de NaCl, o aumento no valor de pH a essa temperatura diminuiu a capacidade máxima de adsorção. Esse comportamento sugere que o efeito eletrostático foi mais pronunciado e favorecido com o aumento da temperatura.

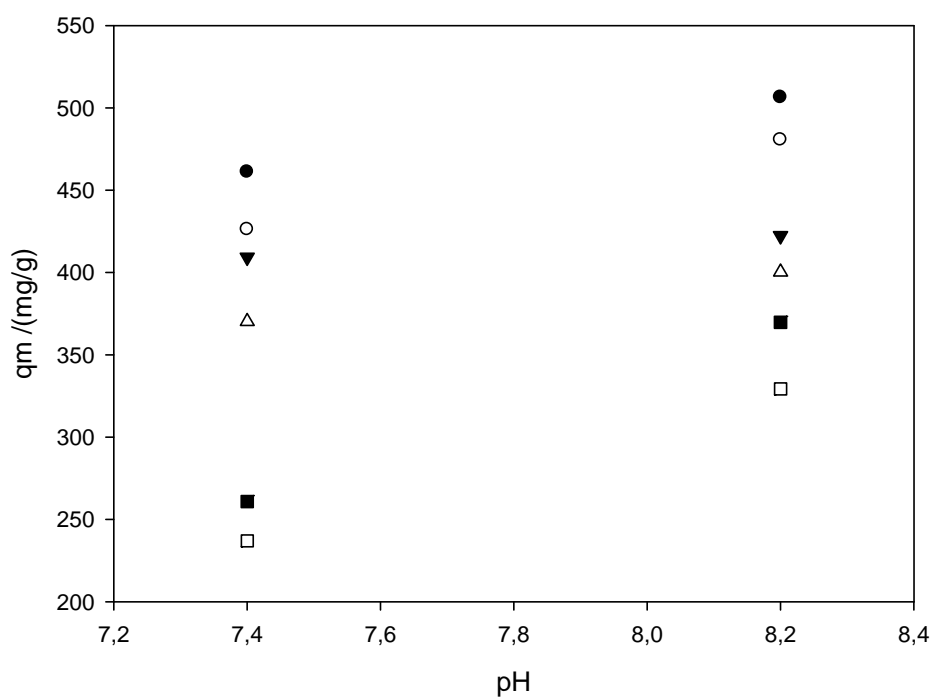


Figura 13. Efeito do pH sobre a capacidade máxima de adsorção (q_m) de GMP em resina aniônica, na temperatura de 30° e diferentes concentrações de NaCl: (●) 0mM NaCl; (○) 10mM NaCl; (▼) 30mM NaCl; (△) 60mM NaCl; (■) 80mM NaCl; (□) 110mM NaCl.

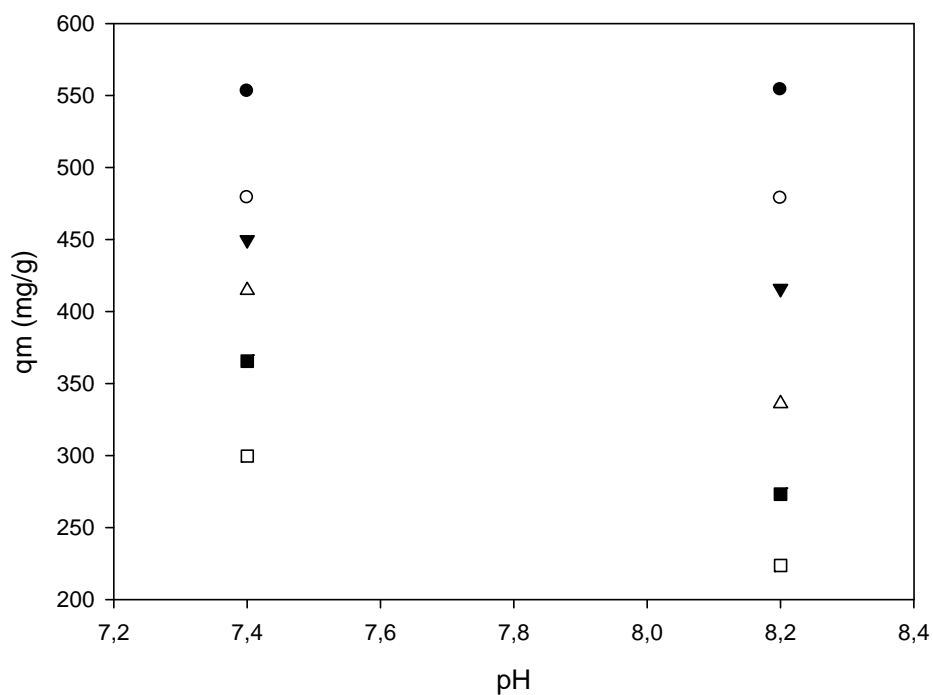


Figura 14. Efeito do pH sobre a capacidade máxima de adsorção (q_m) de GMP em resina aniônica, na temperatura de 45° e diferentes concentrações de NaCl: (●) 0mM NaCl; (○) 10mM NaCl; (▼) 30mM NaCl; (△) 60mM NaCl; (■) 80mM NaCl; (□) 110mM NaCl.

O aumento de qm em função do pH, como observado em todas as concentrações de NaCl para a temperatura de 30°C e para as menores concentrações salinas nas demais temperaturas, tem relação com o fato de que tal mudança no valor de pH de 7,4 para 8,2 altera a carga líquida na superfície da proteína, aumentando a densidade de cargas negativas e assim, favorece a adsorção do GMP na resina aniônica Streamline Q XL. A alcalinidade do meio é fator importante e influencia as interações entre adsorvente e adsorbato no que diz respeito a interações eletrostáticas (KIMURA *et al.*, 1999). PESSOA JR & KILIKIAN (2005) relatam que o valor de pH do tampão pode ser ajustado para favorecer a adsorção ou a dessorção no processo de troca iônica, pois tem a capacidade de alterar a carga líquida da superfície da proteína e do trocador iônico. Entretanto, a resina Streamline Q XL possui uma alta estabilidade em uma ampla faixa de valor de pHs aniônicos (PHARMACIA, 1997) e propriedades pouco dependentes nos valores de pHs estudados. Sendo assim, o maior efeito da alteração do valor de pH no processo de adsorção de GMP na resina aniônica Streamline Q XL pode ser atribuído à carga líquida da proteína nas condições analisadas. HUANG *et al.* (1990) também verificaram comportamento semelhante para a proteína conalbumina e concluíram que a elevação no valor de pH na ordem de 0,5 pode aumentar consideravelmente a capacidade máxima de adsorção da proteína em trocadores aniônicos.

Quando o valor de pH da solução é de 7,4, com crescentes concentrações de NaCl, a resina Streamline Q XL apresentará uma maior combinação de ligação do tipo interação hidrofóbica e ligações de hidrogênio com a proteína GMP, e as interações eletrostáticas serão cada vez menores em função da crescente concentração de NaCl na solução. No menor valor de pH estudado (7,4), a atração eletrostática entre o adsorvente e a proteína GMP é decrescente, devido à redução do número de grupos carboxílicos dissociados na superfície do adsorvente, o que não favorece a adsorção eletrostática do GMP na resina aniônica Streamline Q XL. Por outro lado, as mudanças conformacionais que ocorrem devido aos outros tipos de interações presentes nos sistemas de adsorção, sugerem influência no processo, de modo que a capacidade máxima de adsorção (qm) para algumas condições tenha sido encontrada no menor valor de pH. Outro fato que poderia explicar esse fenômeno é relativo ao tamanho da molécula de proteína, que tende a aumentar com a elevação no valor de pH. DZHAFAROV (2000) relata que a área da superfície da proteína acessível ao trocador iônico pode aumentar consideravelmente durante a adsorção, com mínimas mudanças no valor de pH. Uma melhor análise quanto a essa característica para a proteína GMP seria interessante.

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

5.4. Efeito da temperatura no equilíbrio de adsorção de GMP

As isotermas de adsorção de GMP na resina aniônica Streamline Q XL, obtidas em diferentes temperaturas experimentais, são mostradas nas Figuras 15 e 16, nos valores de pH 7,4 e 8,2, respectivamente, para todas as concentrações de NaCl avaliadas.

Observando a Figura 15, é possível constatar um aumento da capacidade adsortiva da proteína GMP na resina aniônica Streamline Q XL com o aumento da temperatura. Nas Figuras 15E e 15F, é possível constatar uma diminuição da capacidade adsortiva quando se eleva a temperatura de 15 para 30°C. Porém, esse comportamento se mostrou isolado em relação a essas duas observações. Sendo assim, é possível afirmar que para tais condições experimentais avaliadas o processo de adsorção é favorecido com a elevação na temperatura. MIHELIC *et al.* (2003) também relatam esse fenômeno em seus estudos e concluíram que, para o processo de adsorção da proteína em uma coluna cromatográfica de troca iônica, o aumento da temperatura aumenta consideravelmente a capacidade de adsorção do adsorvente.

Em pH 8,2 mostrado na Figura 16 (A, B, C, D E e F), o efeito da temperatura sobre a adsorção do GMP na resina aniônica Streamline Q XL demonstra ser dependente da concentração de NaCl, sugerindo que os mecanismos de interação da proteína e do adsorvente sejam específicos para cada condição. Para as menores concentrações de NaCl, em pH 8,2, é possível observar um aumento na capacidade adsortiva da proteína com a elevação da temperatura, enquanto, a partir de 30mM de NaCl, para as maiores concentrações salinas um efeito contrário é observado, mostrando um decréscimo da capacidade adsortiva com a elevação na temperatura. DESILVA & KOEBEL (2000) relatam que resinas com alta capacidade de troca iônica, como a utilizada nesse experimento (Streamline Q XL), são ligeiramente ionizadas. Conseqüentemente a área de troca é maior, e, aumentando a temperatura, aumenta-se também o grau de dissociação, facilitando a zona de troca, podendo favorecer a capacidade de troca iônica e diminuir o tempo de processo. Esses autores acrescentam ainda que mudanças de 10°C podem alterar significativamente a capacidade de troca da resina aniônica (DESILVA e KOEBEL, 2000). Os resultados sugerem ainda que as forças de interações eletrostáticas predominam em menores concentrações de NaCl, enquanto as forças de interações hidrofóbicas assumem maior significância com a elevação da concentração salina. GERARD *et al.* (1997) demonstram que existe uma tendência de aumento na capacidade adsortiva com a elevação da temperatura, no processo de adsorção de proteínas em trocadores aniônicos, atribuindo esse fenômeno à contribuição de interações hidrofóbica com a elevação da temperatura, concluindo que um aumento na temperatura induz um rearranjo estrutural nas moléculas de proteína, facilitando a adsorção pela exposição dos grupos hidrofóbicos na superfície da proteína. Uma conclusão semelhante também foi relatada por FANG *et al.* (1996).

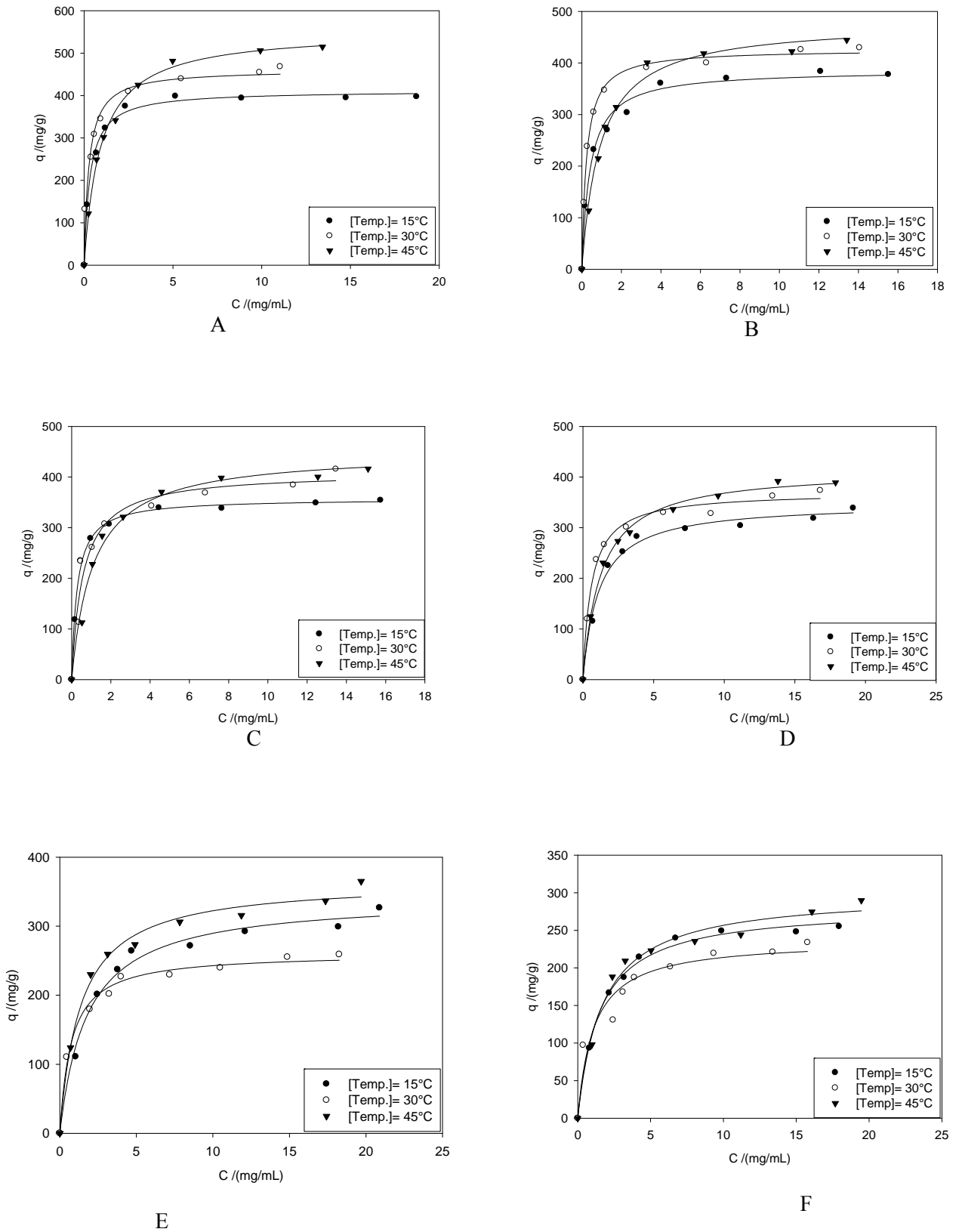


Figura 15 - Isothermas de adsorção de GMP em resina aniônica Streamline Q XL, com diferentes temperaturas e concentração de NaCl (A: 0mM; B: 10Mm; C: 30mM; D: 60mM; E: 80mM e F: 110Mm), em pH 7,4.

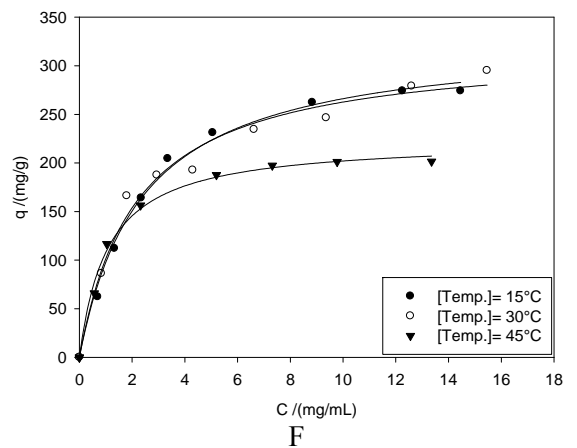
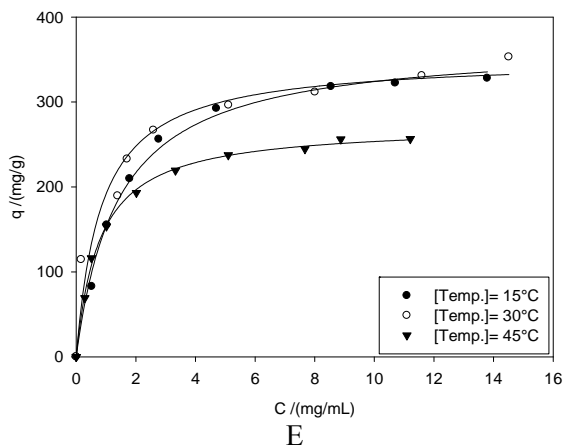
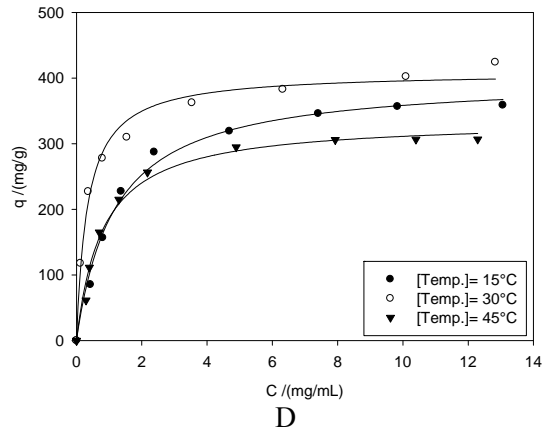
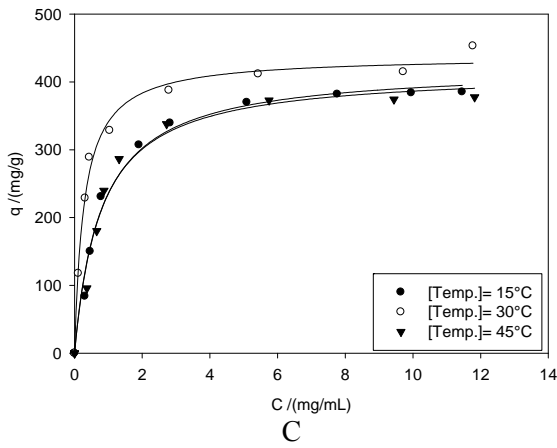
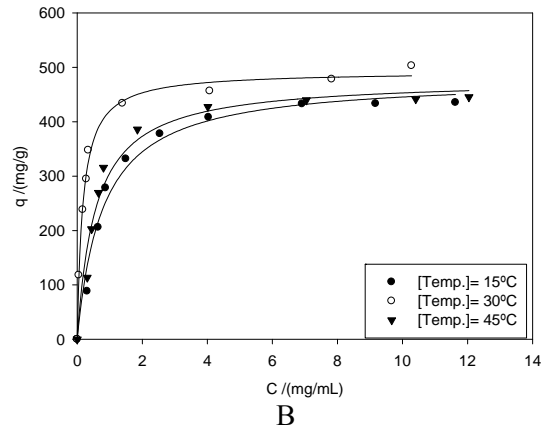
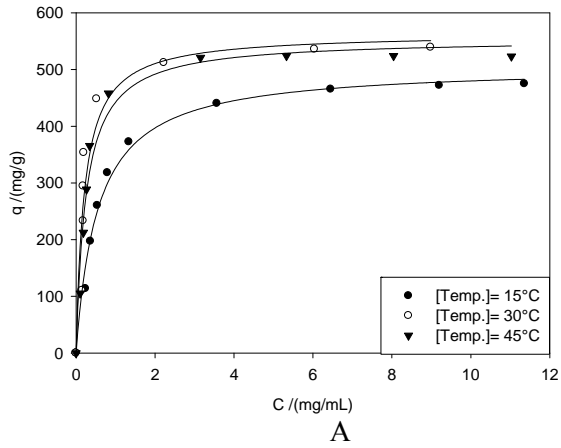


Figura 16 - Isotermas de adsorção de GMP em resina aniônica Streamline Q XL, com diferentes temperaturas e concentração de NaCl (A: 0mM; B: 10Mm; C: 30mM; D:60mM; E: 80mM e F: 110Mm), em pH 8,2.

No processo de adsorção de proteínas, ocorre uma diminuição da energia livre superficial do sistema. É, portanto, um processo espontâneo, isto é, ΔG é menor do que zero. MIHELICĀ *et al.* (2003) demonstram que a mudança na temperatura de trabalho no processo de troca iônica influencia a conformação das proteínas e na liberação de contra-íons e água das superfícies do adsorvente e da proteína e que esse processo é exotérmico e o fenômeno entalpicamente dirigido, implicando aumento na capacidade adsortiva da resina com a elevação da temperatura. Já BOWER & HUGHES (1993), em estudo da adsorção de BSA em trocadores aniônicos, concluíram que ocorrem dois mecanismos de interações diferentes quando se tem a presença de NaCl em solução. Quando em baixas concentrações de NaCl, o processo se mostra entropicamente dirigido com predomínio de interações eletrostáticas, enquanto para maiores concentrações de NaCl o processo é entalpicamente dirigido com predomínio de interações hidrofóbicas, sendo favorecido pela elevação da temperatura. O efeito da temperatura é um fenômeno complexo, que pode afetar tanto as propriedades físico-químicas do adsorvente como as constantes de dissociação de eletrólitos, quanto as propriedades do soluto, como mudanças conformacionais das moléculas de proteína (MIHELICĀ *et al.*, 2003). A influência da temperatura no processo de adsorção de pequenos compostos inorgânicos e aminoácidos tem sido estudada, enquanto estudos com compostos de alta massa molar, em particular de proteínas, não têm sido extensivamente desenvolvidos (FANG *et al.*, 1996). Em alguns casos, a elevação na temperatura aumenta a capacidade adsortiva (MIHELICĀ *et al.*, 2003), enquanto em outros, ocorre o inverso (HUANG *et al.*, 1990). Tais diferenças ainda não são bem compreendidas, necessitando de um melhor suporte termodinâmico para determinação das contribuições entálpicas e entrópicas nesses processos.

5.6. Análise termodinâmica

O processo de adsorção do GMP é determinado termodinamicamente pela variação da energia livre de Gibbs de adsorção, $\Delta_{\text{ads}}G^\circ$. Esta função termodinâmica expressa aspectos associados à interação intermolecular, $\Delta_{\text{ads}}H^\circ$, e à configuração molecular do sistema $\Delta_{\text{ads}}S^\circ$. A relação entre estas variáveis é dada pela equação de Gibbs-Helmholtz $\Delta_{\text{ads}}G^\circ = \Delta_{\text{ads}}H^\circ - T\Delta_{\text{ads}}S^\circ$. Assim, para determinar completamente a termodinâmica de adsorção do GMP, é necessário obter os valores de $\Delta_{\text{ads}}G^\circ$, $\Delta_{\text{ads}}H^\circ$ e $\Delta_{\text{ads}}S^\circ$.

Para a obtenção de $\Delta_{\text{ads}}G^\circ$, o valor k' foi calculado de acordo com JACOBSON *et al.* (1984):

$$k' = q_m \cdot b \cdot \varphi \quad 15$$

Em que b e q_m são parâmetros do modelo de Langmuir, e φ é a razão das fases.

A Tabela 4 mostra k' e a dependência de $\Delta_{\text{ads}}G^\circ$ e q_m em função da concentração de NaCl e temperatura.

Tabela 4 - Valores de energia livre de Gibbs e capacidade máxima aparente de adsorção para diferentes temperaturas e concentrações de NaCl

Temperatura (°C)	Conc. NaCl (mM)	k'	q_m (mg/g)	$\Delta_{\text{ads}}G^\circ$ (kJ/mol)
45	0	139,82	553,96	-13,06
45	30	318,28	415,94	-15,24
45	80	213,13	273,24	-14,18
45	110	240,07	223,69	-14,49
25	0	279,08	463,86	-13,96
25	30	335,80	337,79	-14,41
25	80	521,42	251,46	-15,50
25	110	781,44	219,08	-16,51

Com o aumento da concentração do eletrólito ocorre uma diminuição na quantidade máxima de proteína adsorvida nas duas temperaturas avaliadas. Este comportamento pode ser explicado considerando uma adsorção competitiva entre a proteína e os ânions Cl^- do sal adicionado. Entretanto, os valores da energia livre de Gibbs de adsorção tornam-se mais negativos com o aumento da concentração de NaCl, passando por um valor mínimo quando a concentração de NaCl é igual a 30 mM para a temperatura de 45°C e 110mM de NaCl para a temperatura de 25°C. Para compreender este comportamento, é necessário analisar a dependência do $\Delta_{\text{ads}}H^\circ$ em relação à quantidade de NaCl adicionada.

5.6.1. Efeito da concentração de NaCl sobre a entalpia de adsorção do GMP na resina aniônica Streamline Q XL

Os efeitos da concentração de NaCl sobre a entalpia de adsorção ($\Delta_{\text{ads}}H^\circ$) da proteína GMP na resina aniônica Streamline Q XL em pH 8,2 e temperatura de 45°C são apresentados na Figura 17.

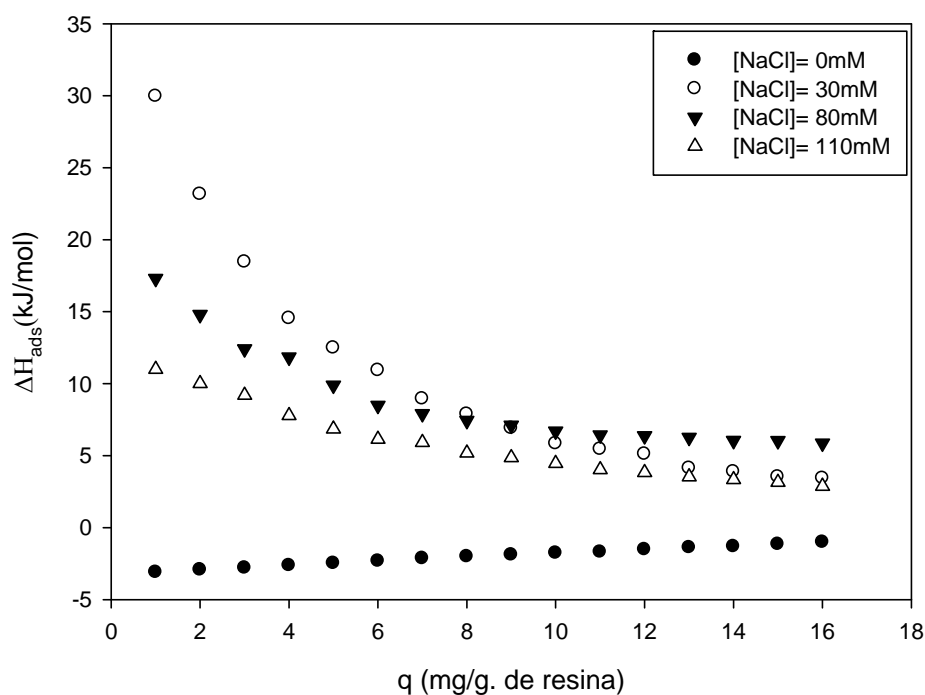


Figura 17. Entalpia de adsorção de GMP em resina aniônica Streamline Q XL, em pH 8,2 e temperatura de 45°C.

Os resultados mostram que o processo de adsorção do GMP na ausência de NaCl ocorre com a liberação de energia, enquanto na presença do eletrólito o processo adsorptivo ocorre com o aumento da entalpia do sistema. Observa-se também uma diminuição nos valores de entalpia à medida que se aumenta a concentração salina. A presença do eletrólito também influencia na dependência do $\Delta_{\text{ads}}H^\circ$ em relação ao recobrimento da superfície adsorptiva. Na ausência de NaCl, $\Delta_{\text{ads}}H^\circ$ aumenta à medida que aumenta a concentração de proteína, enquanto nas demais situações em concentrações de NaCl o comportamento oposto é verificado. O processo em todas as condições é espontâneo, ($\Delta G^\circ_{\text{ads}} < 0$) como pode ser verificado na Tabela 5. Isso conduz à afirmação de que, somente para o caso da adsorção do GMP na resina aniônica Streamline Q XL em solução tampão Tris, o processo é regido entalpicamente. Para as demais situações de concentrações crescente de NaCl, o processo se mostrou dirigido entropicamente. Entretanto, este efeito do eletrólito na adsorção do GMP é dependente da temperatura do sistema.

Na Figura 18, verifica-se o efeito da concentração de NaCl sobre a entalpia de adsorção de GMP na resina aniônica Streamline Q XL em pH 8,2 e temperatura de 25°C. Nesta temperatura, a dependência do $\Delta_{\text{ads}}H^\circ$ em relação à quantidade de proteína adsorvida é diferente da apresentada à temperatura de 45°C. A 25 °C, a adsorção é endotérmica, mesmo na ausência do NaCl.

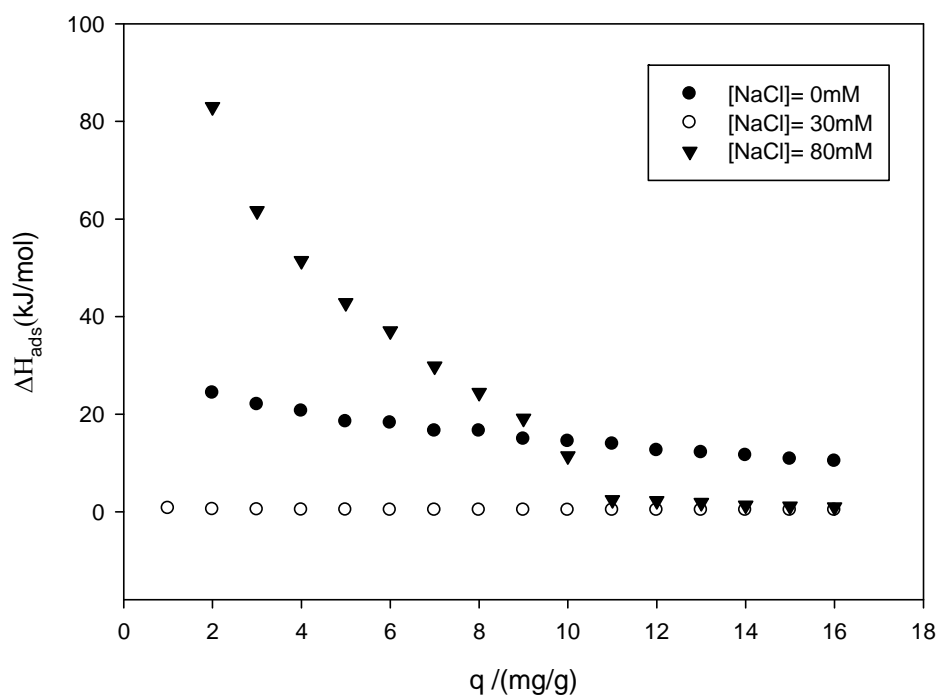


Figura 18. Entalpia de adsorção de GMP em resina aniônica Streamline Q XL, em pH 8,2 e temperatura de 25°C.

Além disso, o aumento na concentração de NaCl (de 0 para 30 mM) provoca inicialmente uma diminuição no valor de $\Delta_{\text{ads}}H^\circ$, enquanto um novo aumento (30 para 80mM) na concentração de NaCl causa um aumento na entalpia de adsorção. A 80 mM de NaCl, o processo se mostrou altamente endotérmico em baixas quantidades de proteína adsorvida, apresentando em seguida um decréscimo sistemático nos valores de $\Delta_{\text{ads}}H^\circ$ com aumento da concentração interfacial da proteína. Na maior força iônica avaliada (110mM de NaCl) para essa condição de temperatura, a concentração de NaCl foi elevada o bastante para ocasionar a precipitação da proteína, e o experimento de titulação não pôde ser realizado.

Para que uma molécula de proteína seja adsorvida na superfície de um trocador iônico, é necessário que ocorra uma série de eventos moleculares tais como: (a) desidratação e/ou remoção da dupla camada elétrica da proteína; (b) desidratação ou deionização do adsorvente; (c) interações eletrostáticas e dispersivas entre proteína e adsorvente; (d) rearranjo conformacional da proteína após a adsorção; e (e) redistribuição das moléculas de água e contra-íons, anteriormente presentes na camada de solvatação da proteína e da resina em solução. A entalpia de adsorção final é o resultado da contribuição de cada um desses fatores (LIN et al., 2001). Nos experimentos aqui apresentados, a proteína GMP possuía, em sua superfície de troca, carga líquida negativa, enquanto a resina de troca-aniônica Streamline Q XL possuía carga líquida positiva, neutralizada por contra-íons (ânions Cl^-) de troca iônica. Em geral, observa-se que a interação proteína-adsorvente é exotérmica (BOWERN E HUGHES, 1993).

Esse resultado é evidenciado no processo de adsorção de GMP na resina Streamline Q XL quando apenas em solução tampão Tris e a 45 °C. Nesta condição termodinâmica, a interação proteína-substrato e a redistribuição das moléculas de H₂O e íons Cl⁻ na solução liberam mais energia do que a absorvida nos processos de dessolvatação e de liberação dos íons pertencentes à dupla camada elétrica da proteína e do adsorvente.

Quando se tem um aumento na força iônica da solução, pela adição de NaCl, as interações eletrostáticas íon-íon existentes na dupla camada elétrica diminuem devido à blindagem eletrostática, alterando a distribuição molecular e iônica na região, levando a uma menor contribuição exotérmica dessas interações, e, no balanço geral da energia de adsorção, as etapas a, b e d adsorvem mais energia que as liberadas nas etapas c e e, levando a valores de $\Delta_{ads}H$ endotérmicos. O decréscimo nos valores de $\Delta_{ads}H$ devido ao aumento da concentração salina (Fig 17) pode ser atribuído a uma menor contribuição da energia endotérmica associada aos processos de desidratação e de eliminação da dupla camada elétrica. Resultados semelhantes também foram observados por BOWEN E HUGES (1993), em um estudo microcalorimétrico do efeito da concentração de NaCl sobre o equilíbrio de adsorção da proteína Albumina de Soro Bovino (BSA) em um trocador aniônico. Entretanto, neste trabalho, estas contribuições não foram evidenciadas para o processo de adsorção do GMP na resina aniônica Streamline Q XL quando somente em solução tampão Tris na temperatura de 45°C. Nestas condições (0mM NaCl), a diferença na densidade de cargas na região difusa é reduzida favorecendo a interação dos íons com a proteína e a contribuição nas etapas exotérmicas (c e e) que assumem um papel mais significativo,, ocasionando valores de $\Delta_{ads}H$ negativos.

Rearranjos na molécula de proteína em solução tampão Tris com crescente concentração de NaCl causam aumento na entropia do sistema, o que a torna uma força motriz da adsorção espontânea em condições em que o processo global se mostra endotérmico. Vários autores têm concluído que a entalpia conformacional é endotérmica (GILL *et al.*, 1995; LIN *et al.*, 2001), fato confirmado também neste experimento pelos valores de $\Delta_{ads}S$ apresentados na Tabela 6.

Tabela 5 - Média das propriedades termodinâmicas em função da concentração de NaCl e temperatura

	0mM NaCl		30mM NaCl		80mM NaCl		110mM NaCl	
	25°C	45°C	25°C	45°C	25°C	45°C	25°C	45°C
$\Delta_{ads}G^\circ$	-13,96	-13,07	-14,41	-15,24	-15,51	-14,18	-16,51	-14,49
$\Delta_{ads}H^\circ$	15,81	-2,01	0,36	10,29	24,70	8,80	-	5,76
$\Delta_{ads}S^\circ$	29,77	11,05	14,78	25,53	40,21	22,98	-	20,25

Nota: Parâmetros termodinâmicos em kJ/mol.

Nos casos relatados por LIN *et al.* (2001), é sugerido que o processo de adsorção foi acompanhado por um substancial rearranjo estrutural. Os valores de $\Delta_{\text{ads}}H^\circ$ encontrados por estes autores é de cerca de 3,66 kJ/mol. Os valores de $\Delta_{\text{ads}}H^\circ$ endotérmicos apresentados na Tabela 5 são de modo geral maiores, sugerindo que as mudanças estruturais possuem uma característica favorável ao processo de adsorção do GMP, de fundamental importância para a reversibilidade da adsorção protéica no trocador aniônico, uma vez que, para a otimização da operação de purificação protéica, faz-se necessário o conhecimentos das variáveis do processo das etapas de adsorção e dessorção.

5.6.2. Efeito da temperatura sobre a entalpia de adsorção do GMP na resina aniônica Streamline Q XL

Os valores de $\Delta_{\text{ads}}H^\circ$ nas temperaturas avaliadas são mostrados nas Figuras 19, 20 e 21 para as concentrações de 0, 30 e 80 mM de NaCl em pH 8,2, respectivamente.

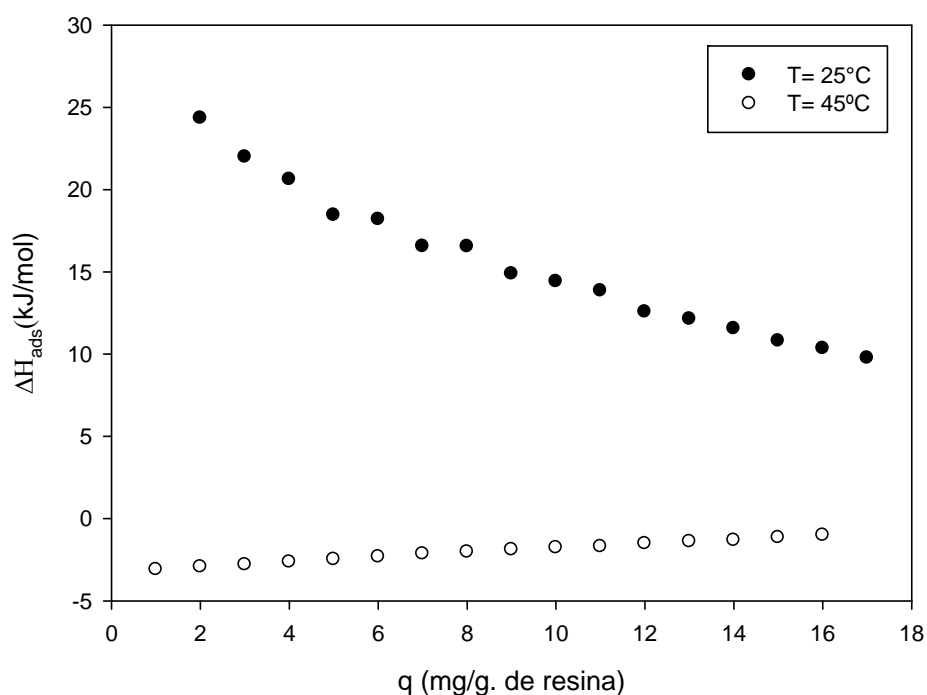


Figura 19. Efeito da temperatura sobre a entalpia de adsorção de GMP em resina aniônica Streamline Q XL a 0mM NaCl em pH 8,2.

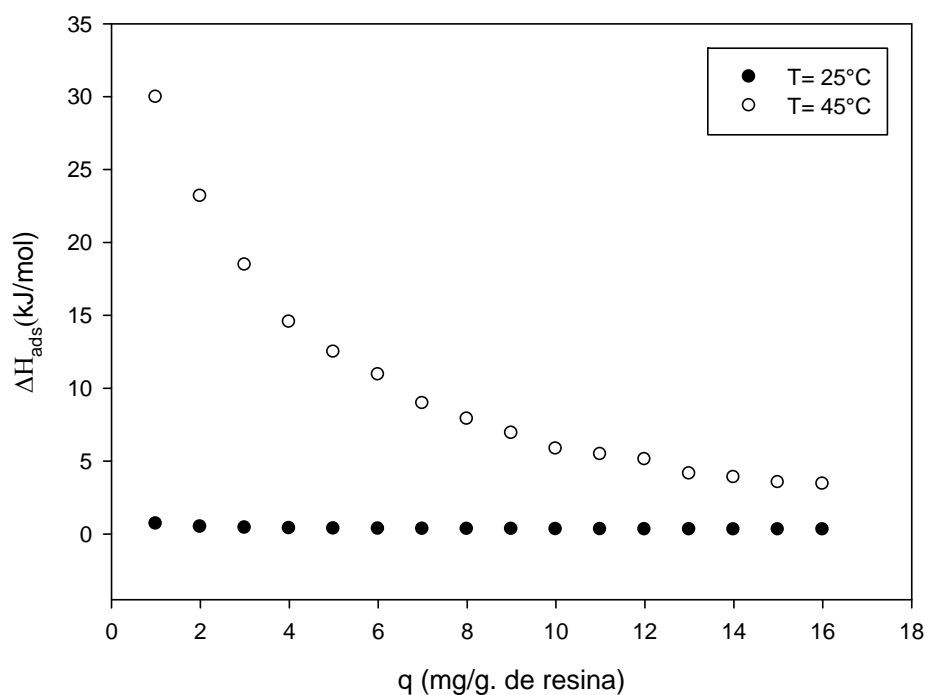


Figura 20. Efeito da temperatura sobre a entalpia de adsorção de GMP em resina aniônica Streamline Q XL a 30mM NaCl em pH 8,2.

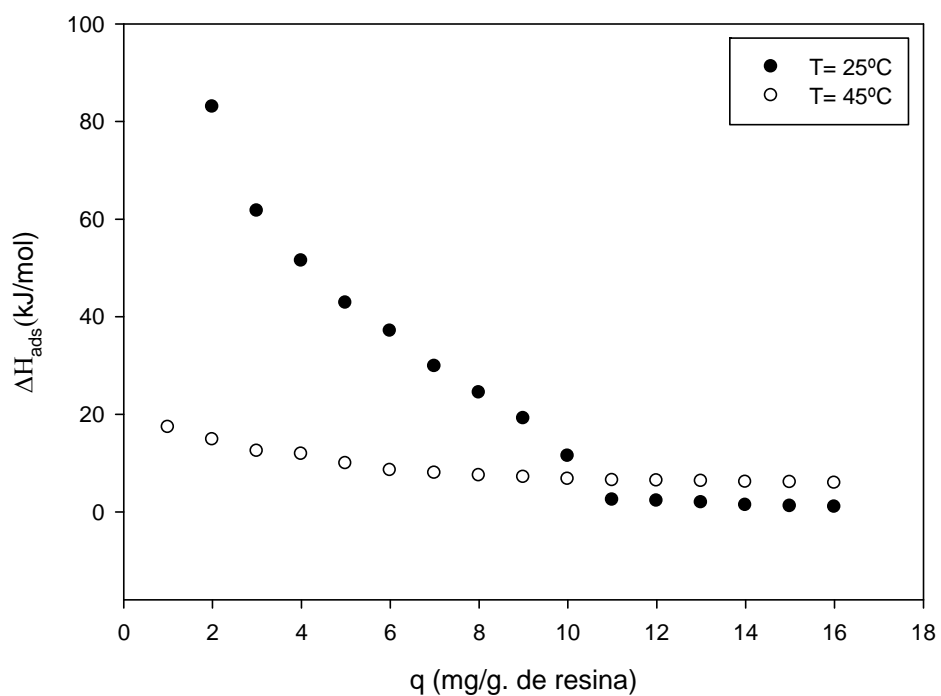


Figura 21. Efeito da temperatura sobre a entalpia de adsorção de GMP em resina aniônica Streamline Q XL a 80mM NaCl em pH 8,2.

Estes valores confirmam que o efeito da temperatura sobre o equilíbrio de adsorção de GMP na resina aniônica Streamline Q XL é dependente da concentração de sal, evidenciando a presença de diferentes mecanismos de interação, isto é, o processo de adsorção a 45°C apenas em solução tampão Tris (0mM NaCl) é regido entálpica e entropicamente e com a adição de NaCl o processo passa a ser governado apenas entropicamente. Analisando o efeito da temperatura sobre o $\Delta_{\text{ads}}H^\circ$, é possível observar que com 0 mM de NaCl ocorre uma diferença no balanço energético entre as duas temperaturas avaliadas. Enquanto a 45°C, os valores de $\Delta_{\text{ads}}H^\circ$ se mostram negativos, da ordem de -2,01kJ/mol, a 25°C os valores de $\Delta_{\text{ads}}H^\circ$ são positivos, da ordem de 15,81kJ/mol. Com 30mM de NaCl, é possível observar um incremento nos valores de $\Delta_{\text{ads}}H^\circ$ com aumento da temperatura, enquanto para 80mM de NaCl, o efeito observado é contrário. Constata-se ainda, com os valores de $\Delta_{\text{ads}}H^\circ$, que o efeito da temperatura sobre a energia de adsorção de GMP na resina aniônica Streamline Q XL se torna maior quando há um aumento na concentração salina.

Quando ocorre a elevação da temperatura de 25 para 45°C no processo de adsorção em solução tampão Tris (0mM de NaCl), ocorre uma diminuição na energia de interações proteína-água e um incremento nas interações eletrostáticas íon-íon e íon-proteína existentes na dupla camada elétrica. Dessa forma, o aumento na temperatura é suficiente para a desestruturação da região difusa da dupla camada elétrica. Assim, as moléculas de proteína interagem mais fortemente com a resina, o que favorece o fenômeno adsortivo e, conseqüentemente, leva ao aumento da energia liberada na adsorção, tornando o processo exotérmico.

Com crescentes concentrações de NaCl, o processo adquiriu um comportamento exclusivamente endotérmico nas duas temperaturas avaliadas. Isso sugere que a contribuição do eletrólito na região difusa causa uma desestruturação das moléculas de água de solvatação. Dessa forma, a energia necessária para retirar os contra-íons aderidos à resina e da água ligada à proteína é maior que as contribuições de interação proteína-adsorvente e contra-íon/água, tornando o processo de adsorção nessas condições endotérmico.

Os efeitos da temperatura sobre a entalpia de adsorção do GMP na resina aniônica Streamline Q XL podem ser exemplificados pelas seguintes sugestões: (i) a energia necessária para desidratação e remoção da dupla camada elétrica é reduzida com a elevação da temperatura quando o processo é conduzido em solução com 0 e 80mM de NaCl (ou seja, processos a e b); (ii) as forças de interação se tornam mais significativas quanto à liberação de energia com a elevação da temperatura para o processo em solução com 30mM de NaCl (ou seja, processo c); e (iii) a energia necessária para o rearranjo conformacional da proteína após a adsorção, sugestivamente, diminui com o aumento da temperatura nos processos com 30 e 80mM de NaCl.

GERARD *et al.* (1997), avaliando a adsorção de proteínas numa resina catiônica, observaram que a diferença na energia de afinidade de ligação ocorre devido a efeitos das forças

de interações, concluindo que nas menores temperaturas prevalecem as interações eletrostáticas, enquanto as interações hidrofóbicas se tornam mais significativas com a elevação na temperatura. Esse resultado tem como base o efeito da temperatura sobre a natureza da carga líquida da proteína que diminui conforme o aumento da temperatura. Este efeito foi confirmado no estudo microcalorimétrico do mecanismo de interação de moléculas de proteína em resina aniônica feito por LIN *et al.* (2001). Os resultados observados pelas isotermas de adsorção (Figuras 15 e 16) no presente trabalho sugerem que as forças de interações eletrostáticas predominam em menores concentrações salinas. Isso se mostra coerente com os valores $\Delta_{ads}H^\circ$ na temperatura de 45°C com 0mM de NaCl (Figura 19) observados no estudo microcalorimétrico, em que é possível constatar que o processo de adsorção do GMP se mostra exotérmico nessas condições. As forças de interações hidrofóbicas assumem maior significância com a elevação da concentração salina, perfil esse demonstrado nas isotermas de adsorção (Figuras 4 a 9) e também observado pelos valores de $\Delta_{ads}H$ nas temperaturas de 25 e 45°C (Figuras 20 e 21) em que o processo se mostrou totalmente endotérmico.

6. CONCLUSÕES

Nas condições experimentais avaliadas, foi possível observar que o comportamento no processo de adsorção do GMP na resina aniônica Streamline Q XL é influenciado pela concentração de NaCl, ocorrendo um importante efeito na redução da capacidade de adsorção com aumento da concentração salina, para todas as temperaturas e valores de pH avaliados.

Quanto ao efeito do pH, foi possível verificar que a adsorção do GMP ocorre de maneira espontânea nos dois valores estudados (acima do $pI= 4,3$) e em quantidades elevadas. Entretanto, o aumento no valor de pH de 7,4 para 8,2 demonstrou aumentar a capacidade máxima de adsorção, sendo provável que a alteração da carga líquida negativa na superfície da proteína favoreça a adsorção.

Foi possível observar ainda que o aumento da temperatura, dentro da faixa estudada, possui uma tendência a favorecer a capacidade adsortiva da proteína GMP na resina aniônica Streamline Q XL, principalmente quando em menores concentrações de NaCl.

O modelo de Langmuir ajustou-se satisfatoriamente aos dados observados e, desta forma, foi possível expressar os parâmetros deste modelo em função das variáveis temperatura, pH e concentração de NaCl.

A análise termodinâmica indicou que a adsorção do GMP na resina aniônica Streamline Q XL é um processo espontâneo ($\Delta G^{\circ}_{ads} < 0$), orientado entálpica e entropicamente, principalmente quando conduzindo apenas em solução Tris (0mM de NaCl), sugerindo uma maior capacidade adsortiva nesta condição.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIROLDI, C., ALCÂNTARA, E. F. C., Chemisorption of divalent cations on N-(2-pyridyl)acetamide immobilized on silica gel - a thermodynamic study. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 27, Number 6, p. 623-632, 1995.
- ANSPACH, F. B.; JOHNSTON, A.; WIRTH, H. J.; UNGER, K. K.; HEARN, M. T. W. High-performance liquid chromatography of amino acids, peptides and proteins – XCVa Thermodynamic and kinetic investigations on rigid and soft affinity gels with varying particle and pore sizes: comparison of thermodynamic parameters and the adsorption behaviour of proteinsevaluated from bath and frontal analysis experiments. **Journal of Chromatography**, v. 499, p. 103-124, 1990.
- AYERS, J.; COOLBEAR, K.; ELGAR, D.; PRITCHARD, M. Process for isolating glycomacropptide from dairy products with a phenylalanine impurity of 0,5% w/w. **World Patent WO 98/14071**, 1998.
- BELLOT, J. C.; CONDORET, J. S. Theoretical study of the ion-exchange preparative chromatography of a two-protein mixture. **Journal of Chromatography**, v. 635, p. 1-17, 1993.
- BOSTRÖM, M., TAVARES F. W., BRATKO, D., NINHAM, B. W. Specific ion effects in solutions of globular proteins: Comparison between analytical models and simulation. **J Phys Chem B Condens Matter Mater Surf Interfaces Biophys**. 109; p. 24489–24494; 2005.
- BOSTRÖM, M., WILLIAMS, D. R. M., NINHAM, B. W. Specific ion effects: role of salt and buffer in protonation of cytochrome C, **European biophysics journal**. E13; pp. 239–245; 2004.
- BOSTRÖM, M., WILLIAMS, D. R. M., NINHAM, B. W. Specific ion effects: why the properties of lysozyme in salt solutions follow a Hofmeister series, **European biophysics journal**. 85; pp. 686–694; 2003.
- BOWEN, R. W. & HUNGHEES, T. D. Ion exchange of proteins: A microcalorimetric study of the adsorption of bovine serum albumin on-exchange materials, **Journal of colloid and interface science**, v. 158, p. 395-402, 1993.
- BRAMANTI, E.; SORTINO, C.; ONOR, M.; BENI, F.; RASPI, G. Separation and determination of denature α s1-, α s2-, β and k-caseins by hydrophobic interaction chromatography in cows', ewes' and goats' milk, milk mixtures and cheeses; **Journal of Chromatography A**, 994; 59-74; 2003.
- BRANDÃO, S. C. C.; PARREIRA, J. F. M.; ALVIM, T. C. Detecção da adição de soro de queijo ao leite. In: **Anais do X Congresso Nacional de Laticínios**, 41 p. 1988.
- CASAL, E.; CORZO, N.; MORENO, F.J.; OLANO, A. Selective recovery of glycosylated caseinmacropptide with chitosan. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.1201-1204, 2005.
- CESTARI, A. R., AIROLDI, C., J. Chemisorption on Thiol–Silicas: Divalent Cations as a Function of pH and Primary Amines on Thiol–Mercury Adsorbeds. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.195, p. 338–342, 1997.

- CHEN, W. D.; HUC, H.; WANG, Y. Analysis of steric mass-action model for protein adsorption equilibrium onto porous anion-exchange adsorbent. **Chemical Engineering Science**. 61; p. 7068 – 7076; 2006.
- CRESCENZI, V., AIROLDI, C., DENTINI, M., PIETRELLI, L., RIZZO, R., Calorimetric data on salt-induced conformational transitions of ionic polysaccharides in aqueous solutions. **Makromolekulare Chemie-Macromolecular Chemistry and Physics**, Alemanha, v. 182, n. 02, p. 219-223, 1981.
- DA SILVA, C. A. S.; COIMBRA, J. S. R.; ROJAS, E. E. G.; MINIM, L. A.; DA SILVA, L. H. M. Partitioning of caseinomacropéptide in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**, v.858, p.205–210, 2007.
- DECHOW, F. J. Separation and Purification Techniques in Biotechnology. **Noyes Publications**, Cap. 2, 65-162, 1989.
- DESILVA, F.; KOEBEL, B. **Water temperature affects both resin and system functions**. Published in the Water Quality Products Magazine, August 2000. Disponível em <http://www.resintech.com/pdf/Somelikeithot.pdf>, Acesso em Janeiro de 2008.
- DOUTANI, S.; TURHAN, K.N.; ETZEL, M.R. Whey protein isolate and glycomacropéptide recovery from whey using ion exchange chromatography. **Journal of Food Science**, v.68, n.4, p.1389-1395, 2003.
- DOULTANI, S.; TURHAN, N.; ETZEL, M.R. Fractionation of proteins from whey using cation exchange chromatography. **Process Biochemistry**, v.39.p.1737-1743, 2004.
- DRACZ, S. **Desenvolvimento de um novo método imunoenzimático para análise de soro de queijo em leite**. Viçosa, MG: UFV, 1996. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- DZHAFAROV, S. E. Study of Interphases Between Subunits of Human Serum Albumin By Tritium Labelling, **Journal Biology**. V. 24, p. 345–351, 2000.
- DZIUBA, J.; MINKIEWICZ, P. Influence of glycosylation on micelle-stabilizing ability and biological properties of C-terminal fragments of cow's k-casein. **International Dairy Journal**. 6, 1017-1044, 1996.
- EIGEL, W. N., J. E. BUTLER, C. A. ERNSTROM, H. M. FARELL JR., V. R. HARWALKER, R. JENNESS, R. MC.L. WHITNEY. Nomenclature of proteins in cow's milk. Fifth revision. **Journal of Dairy Science**. 67: 1599–1631, 1984
- EL-SALAM; A. M.; EL-SHIBINY, S. BUCHHEIM, W. Characteristics and potential uses of the casein macropéptide. **International Dairy Journal**. 6:327. 1996.
- ETZEL, M.R. **Production of k-casein macropéptide for nutraceutical uses**. United States Patent 5.968.586, 1999.
- ETZEL, M.R. **Production of substantially pure kappa casein macropéptide**. United States Patent 6.168.823 B1, 2001.
- FANG, F.; AGUILAR, M. I.; HEARN, M. T. W. Influence of temperature on the behaviour of proteins in cation-exchange chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 729, p. 49-66, 1996.

FONSECA, M. G.; AIROLDI, C. Mercaptopropyl magnesium phyllosilicate - thermodynamic data on the interaction with divalent cations in aqueous solution. **Thermochimica Acta**, v. 359, p. 1-9, 2000.

FONTAN, R. C. I. **Estudo do processo de purificação de proteínas do soro de queijo através de técnicas adsorptivas**, Relatório Final PIBIC/CNPq, Universidade Federal de Viçosa, 2001.

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

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

GEANKOPLIS, C. J. **Transport processes and unit operations**, 3rd edition, Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, 921p., 1993.

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

GERSTNER, J. A.; BELL, J. A.; CRAMER, S. M. Gibbs free energy of adsorption for biomolecules in ion-exchange systems. **Biophysical Chemistry**, v. 52, p. 97-106, 1994.

GILL, D. S.; ROUSH, D. J.; SHICK, K. A.; WILLSON, R. C. Microcalorimetric characterization of anion-exchange adsorption of recombinant cytochrome b₅ and its surface-charge mutants. **Journal of Chromatography A**. v. 715, p. 81-93, 1995.

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

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

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

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

HORSTMANN, B. J.; KENNEY, C. C. & CHASE, H. A., Adsorption of Proteins on Sepharose Affinity Adsorbents of Varying Particle Size. **Journal of Chromatography**, v.361, p. 179-190, 1986.

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

IDOTA, T.; KAWAKAMI, H.; NAKAJIMA, I. Bifidobacterium growth promoting activity effect on N-acetylneuraminic acid containing substances. **Bioscience Biotechnology & Biochemistry** 58: 1720-1722, 1994.

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

JACOBSON, J.; FRENZ, J.; HORVÁTH, C. Measurement of adsorption isotherms by liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 316, p. 53-68, 1984.

JAMES, E. A.; DO, D. D. Equilibria of biomolecules on ion-exchange adsorbents. **Journal of Chromatography**, v. 542, p. 19-28, 1991.

KAWASAKI, Y.; DOSAKO, S. **Process for producing kappa-casein glycomacropetides**. European Patent Application 0488589 A1, 1991.

KAWASAKI, Y.; KAWAKAMI, M.; TANIMOTO, M.; DOSAKO, S.; TOMIZAWA, A.; KOTAKE, M. pH-dependent molecular weight changes of k-casein glycomacropetide and its preparation by ultrafiltration. **Milchwissenschaft**. 48 (4), 191-196, 1996.

KIMURA, I.Y., GONÇALVES JR, A.C., STOLBERG, J., LARANJEIRA, M.C.M., FÁVERE, V.T. Efeito do pH e do tempo de contato na adsorção de corantes reativos por microesferas de quitosana, **Polímeros**, vol.9, No. 3, São Carlos SP, 1999.

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

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

LEVINE, I. N. **Physical chemistry**. 4th edition. McGraw-Hill Inc., New York, 901p., 1995.

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

MARSHAL, S. C. Casein macropetide from whey. A new product opportunity. **Food Res. Quar.**, 51, 86-91, 1991.

MARTÍN-DIANNA, A.B.; FONTECHA, M.J.F.J. Isolation and characterization of caseinomacropetide from bovine, ovine and caprine cheese whey. **European Food Research and Technology**, v.214, p.282-286, 2002.

MARTÍN-DIANA, A.B.; GOMEZ-GUILLÉN, M.C.; MONTERO, P.; FONTECHA, J. Viscoelastic properties of caseinomacropetide isolated from cow, ewe and goat cheese whey. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.86, n.9, p.1340- 1349, 2006.

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

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. ASSESSORIA DE GESTÃO ESTRATÉGICA. **Projeções do agronegócio mundial e do Brasil 2006/07 a 2016/2017**. Disponível em www.agricultura.gov.br. Acesso em novembro de 2007.

MIRALLES, B.; ROTHBAUER, V.; MANSO, M.A.; AMIGO, L.; KRAUSE, I.; RAMOS, M. Improved method for the simultaneous determination of whey proteins, caseins and para-k-casein in milk and dairy products by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, 915, 225-230, 2001.

MORR, C.; HÁ, E. W. Whey protein concentrates and isolates processing and functional properties critical reviews. **Nutrition & Food Science**, v.33, n.6, p.431-476, 1993.

NAKANO, T.; SILVA-HERNANDEZ, E.R. IKAWA, N. OZIMEK, L. Purification of κ -casein glycomacropeptide from sweet whey with undetectable level of phenylalanine. **Biotechnology Progress**, v. 8, n.2, p.409-412, 2002.

NAKANO, T.; OZIMEK, L. Purification of glycomacropeptide from non-dialyzable fraction of sweet whey by anion-exchange chromatography. **Journal Biotechnology Techniques**, v.13, n.11, p.739-742, 1999.

NAKANO, T.; IKAWA, N.; OZIMEK, L. Use of epichlorohydrin-treated chitosan resin as an adsorbent to isolate k-casein glycomacropeptide from sweet whey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p.7555-7560, 2004.

NEESER, J. R.; GOLLIARD, M.; WOLTZ, A.; ROUVET, M.; GILLMANN, M. L.; GUGGENHEIM, B. In vitro modulation of oral bacterial adhesion to saliva-coated hydroxyapatite beads by milk casein derivatives. **Oral Microbiol Immunol**. 9, n°4193-201, 1994.

PAVAN, F. A., LIMA, I. S., BENVENUTTI, E. V., GUSHIKEM, Y., AIROLDI, C., J. **Journal of Colloid and Interface Science**, 275 (2004) 386.

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

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

PHARMACIA BIOTECH. High capacity expanded bed adsorption. **Pharmacia biotech AB**. 18-1123-81 AD, p1, 2002-09.

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

SAITO, T.; YAMAJI, A. ITOH, T. A new isolation method of caseinoglycopeptide from sweet cheese whey. **Journal Dairy Science**, v.74. p.2831-2837, 1991.

SAMUELSON, O. **Ion exchange separations in analytical chemistry**. John Willey & Sons Inc., New York, 474p., 1963.

SCHUPBACH, P.; NEESER, J. R.; GOLLIARD, M.; ROUVET, M.; GUGGENHEIM, B. Incorporation of caseinoglycomacropeptide and casinophosphopeptide into the salivary pellicle inhibits adherence of mutants streptococci. **Journal of Dental Research**, 75, n°10:1779-88, 1996.

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

SAS Institute, Inc. (1998). SAS/STAT User's Guide Release 6.03. Cary, NC, USA.

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

TAKAHASHI, N., ASAKAWA, S. DOSAKO, S. , TADASHI, I. Hypoallergenic nutritive composition. **French Pat. Appl.**, FR 2677850 A1, 1992.

TANIMOTO, M.; KAWASAKI, Y.; DOSAKO, S.; AHIKO, K. Large-scale preparation of κ -casein glycomacropeptide from rennet casein whey. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 56, n.1, p.140-141, 1992.

TOLKACH, A.; KULOZIK, U. Fractionation of whey proteins and caseinomacropeptide by means of enzymatic crosslinking and membrane separation techniques. **Journal of Food Engineering**, v.67. p.13-20, 2005.

TOSI, E.; CAZOOPLY.; CATALANO, O. Usu de la harina de tricale y suero de leche ultrafiltrado em polvo para la fabricaci´n de pastas frescal. **Alimentaria**, v.39, p.39-41, 1997.

XU, Y; SLEIGH, R.; HOURIGAN, J.; JOHNSON,R. Separation of bovine immunoglobulin G and glycomacropeptide from dairy whey. **Process Biochemistry**, v.36. p.393-399, 2000.

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

YVON, M.; BEUCHER, S.; GUILLOTEAU, P.; LÊ HUEROU-LURON I; CORRING, T. Effects of casinomacropeptide (CMP) on digestion regulation. **Reproduction Nutrition Development**. 34, n° 6: 527-37, 1994.

WADSÖ, I. Trends in isothermal microcalorimetry. **Chemical Society Reviews**, v. 26, p. 79-86, 1997.

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