

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA - UESB**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE**  
**ALIMENTOS**

**PARTIÇÃO DE  $\beta$ -GALACTOSIDASE EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS  
CONSTITUÍDOS POR POLIETILENO GLICOL E POLIACRILATO DE SÓDIO**

**Wmekson Oliveira Santos**

**ITAPETINGA  
BAHIA – BRASIL  
2011**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA - UESB**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE**  
**ALIMENTOS**

**Wmekson Oliveira Santos**

**PARTIÇÃO DE  $\beta$  - GALACTOSIDASE EM SISTEMAS AQUOSOS**  
**BIFÁSICOS CONSTITUÍDOS POR POLIETILENO GLICOL E**  
**POLIACRILATO DE SÓDIO**

**Dissertação apresentada a Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte integrante das exigências do Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, área de concentração em Engenharia de Processos de Alimentos, para obtenção do título de “Mestre”**

**Orientador:**

**Prof. D.Sc . Luis Antonio Minim**

**Co-orientador:**

**Prof<sup>a</sup>.D.Sc. Renata Cristina Ferreira Bonomo**

**ITAPETINGA**  
**BAHIA – BRASIL**  
**2011**

637.127	Santos, Wmekson Oliveira.
S239p	<p data-bbox="432 667 1378 801">Participação de <math>\beta</math> – galactosidade em sistemas aquosos bifásicos constituídos por polietileno glicol e poliacrilato de sódio. / Wmekson Oliveira Santos. – Itapetinga: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2011.</p> <p data-bbox="483 804 544 837">78 fl.</p> <p data-bbox="432 875 1378 1025">Dissertação do Programa de Pós-Graduação da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos. Sob a orientação do Prof. DSc. Luis Antonio Minim e co-orientação da Prof<sup>a</sup>. DSc. Renata Cristina Ferreira Bonomo.</p> <p data-bbox="432 1153 1378 1317">1. Sistema Aquoso Bifásico (SAB) – Partição de <math>\beta</math> – galactosidade. 2. Sistema Aquoso Bifásico (SAB) – Extração líquido-líquido. 3. Leite – Intolerância a lactose. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. II. Minim, Luis Antonio. III. Bonomo, Renata Cristina Ferreira. IV. Título.</p> <p data-bbox="1155 1355 1378 1386" style="text-align: right;"><b>CDD(21): 637.127</b></p>



## DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

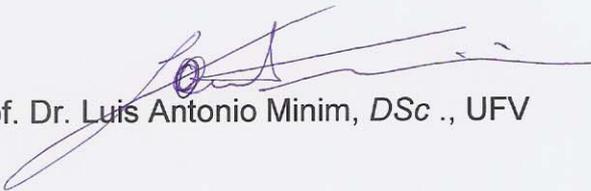
**Título:** “PARTIÇÃO DE BETA-GALACTOSIDASE EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS CONSTITUIDOS DE POLIETILENOGLICOL E POLIACRILATO DE SÓDIO”.

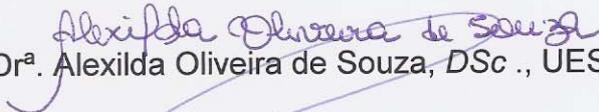
**Autor:** WMEKSON OLIVEIRA SANTOS

**Orientador:** Prof. Dr. Luis Antonio Minim

**Co-orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Renata Cristina Ferreira Bonomo

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

  
Prof. Dr. Luis Antonio Minim, DSc ., UFV

  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alexilda Oliveira de Souza, DSc ., UESB

  
Prof. Dr. Luís Henrique Mendes da Silva, DSc ., UFV

Data da Realização: 28 de fevereiro de 2011.

## **DEUS,**

*É maravilhoso, Senhor, ter braços perfeitos,  
Quando há tantos mutilados!  
Meus olhos perfeitos,  
Quando há tantos sem luz!  
Minha voz que canta,  
Quando tantas emudeceram!  
Minhas mãos que trabalham,  
Quando tantas mendigam!  
É maravilhoso voltar para casa,  
Quando tantos não têm para onde ir!  
É maravilhoso:  
Amar, viver, sorrir, sonhar!  
Quando há tantos que choram,  
Odeiam, revolvem-se em pesadelos,  
Morrem antes de nascer.  
É maravilhoso ter um Deus para crer,  
Quando há tantos que não têm  
O consolo de uma crença.  
É maravilhoso Senhor, sobretudo,  
Ter tão pouco a pedir,  
E tanto a AGRADECER!*

*Dedico este trabalho aos meus pais, Zé Pretinho e Edilene,  
A meu padrasto Toinho e minha madrasta Val  
Aos meus irmãos (as), Tássia, Jade, Luís Otávio e Isadora  
E à minha namorada, Fernanda,  
Pessoas com as quais pude compreender  
O significado da palavra Amor.*

*“Quero, um dia, poder dizer às pessoas que nada foi em vão... que o amor existe, que vale a pena se doar às amizades e às pessoas, que a vida é bela sim, e que eu sempre dei o melhor de mim..e que valeu a pena”!*

*(Mário Quintana)*

*Todo abismo é navegável a barquinhos de papel. (João Guimarães Rosa)*

## AGRADECIMENTOS

Aquele que sonda mentes e corações, o senhor Deus, pelo dom da vida e a graça da saúde.

À universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), pela oportunidade e apoio cedidos desde a graduação.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), pelo Programa de Pós-Graduação.

À FAPESB, pelos recursos financeiros e pela bolsa concedida.

Ao professor e orientador Luis Antonio Minim, pela orientação, confiança, incentivo e apoio durante todo o mestrado. Ressalto a minha admiração e agradeço pela oportunidade, que me fez crescer bastante tanto pessoal como profissionalmente. A professora Renata Bonomo pela amizade de sempre e pela presente orientação.

Aos amigos de República Marconi, Samir, Renan, George, Léo, Maycon, Rogério, Mateus e Júnior, pelos momentos de alegria e amizade.

Ao amigo Fabinho, presidente do coisa linda futebol show, um amigo que a vida me cedeu em Viçosa-MG!

Aos amigos e colegas do Laboratório de Desenvolvimento e simulação de processos: Moysés, Janaína, Ana Paula, Priscila, Alexandre, Rafael, Cecília, Cassiano e especialmente Lizzy pela “orientação” constante, paciência e ajuda, Muito obrigado, Deus os abençoe!

Aos alunos de TAL488 (2010-I), pelo aprendizado desenvolvido em cada dia de aula e pela oportunidade a mim concedida de fazer aquilo que mais gosto na vida.

Aos funcionários do DTA em especial ao amigo Silvério pelos conselhos e boas conversas. Além de Hermano pela ajuda na bioagro, abraço!

E a todos os amigos que de alguma forma contribuíram neste trabalho e não foram aqui citados, meus sinceros agradecimentos.

## SÚMARIO

AGRADECIMENTOS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	vi
RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	viii
1. Introdução .....	1
2. Objetivos.....	3
2.1. Objetivo Geral .....	3
2.2. Objetivos Específicos.....	3
3. Revisão de literatura.....	4
3.1. $\beta$ -galactosidase.....	4
3.2. Importância da $\beta$ -galactosidase sobre a Intolerância a Lactose .....	7
3.3. Produção e Purificação de Enzimas.....	10
3.4. Extração Líquido-Líquido .....	15
3.4.1. Sistemas Aquosos Bifásicos.....	16
4. Partição de Enzimas .....	22
4.1. Coeficiente de Partição .....	23
4.1.1. Diagrama de fases do Sistema Aquoso Bifásico .....	24
5. Materiais e Métodos .....	30
5.1. Materiais .....	31
5.2. Métodos .....	31
5.2.1 Preparação dos Sistemas Aquosos Bifásicos .....	31
5.2.2 Técnicas analíticas.....	31
5.2.3. Experimentos de Partição Utilizando a Enzima.....	33
5.2.4. Cálculos do coeficiente de partição.....	33
5.2.5. Fator de Purificação e Rendimento .....	34
6. Delineamentos Experimentais e Análises Estatísticas .....	35
6.1. Fatorial Completo.....	35
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
7.1. Avaliação da Partição .....	37
7.2. Otimização da Partição .....	40

7.3. Extração de $\beta$ -galactosidase de extrato enzimático ( Validação do experimento) .....	45
7.4. Influência da Variação da concentração de enzima sobre o $K_{\beta}$ e S e Simulação do SAB com a extração liquido-liquido em fluxo cruzado. ....	46
8. CONCLUSÃO .....	49
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Possíveis fontes de obtenção de $\beta$ -galactosidase. ....	5
TABELA 2 – Tipos de sistemas aquosos bifásicos e seus componentes .....	19
TABELA 3 – Aplicações de Sistemas Aquosos Bifásicos .....	20
TABELA 4 – Fatores e níveis testados no delineamento composto central... ..	36
TABELA 5. Condições experimentais avaliadas no delineamento fatorial completo.....	36
TABELA 6 – Resultados experimentais obtidos para o coeficiente de partição e seletividade $\beta$ -galactosidase empregando um delineamento fatorial completo. ....	38
TABELA 7 - ANOVA para partição da $\beta$ -galactosidase .....	40
TABELA 8 - ANOVA para Seletividade $\beta$ -galactosidase. ....	40
TABELA 9– Resultados experimentais obtidos para o coeficiente de partição e seletividade da $\beta$ -galactosidase em SAB PEG/PAS empregando um DCCR 2 <sup>2</sup> .....	42
TABELA 10. Coeficiente de partição, seletividade, fator de purificação e rendimento do extrato enzimático utilizando o sistema PEG/PAS .....	46

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Fórmula química da lactose. ....	7
FIGURA 2 – Representação planar parcial da molécula de PEG com os sítios. .....	22
FIGURA 3 – Representação da molécula de PAS.....	23
FIGURA 4 – Diagrama de fases para um sistema aquoso bifásico Polímero- Polímero. ....	27
FIGURA 5. Superfície de resposta da partição da $\beta$ -galactosidase em sistemas PEG/PAS, em pH 8 e a 25°C, em função da concentração de PEG (% m/m) e PAS (% m/m).....	44
FIGURA 6. Superfície de resposta da seletividade da $\beta$ -galactosidase em sistemas PEG/PAS, em pH 8 e a 25°C, em função da concentração de PEG (% m/m) e PAS (% m/m).....	45
FIGURA 7. Gráfico de Fluxo Cruzado .....	49

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>SAB-</b>	Sistema Aquoso Bifásico
<b>PEG-</b>	Polietileno glicol
<b>PAS-</b>	Poliacrilato de Sódio
<b>ELL-</b>	Extração Líquido-Líquido
<b>K<sub>XR</sub>-</b>	Coefficiente de Partição da Enzima
<b>S-</b>	Seletividade
<b>Nacl-</b>	Cloreto de Sódio
<b>FC-</b>	Fatorial Completo
<b>DCCR-</b>	Delineamento Composto Central Rotacional
<b>MSR-</b>	Metodologia de Superfície de Resposta
<b>Y-</b>	Rendimento de extração
<b>FP-</b>	Fator de Purificação
<b>K<sub>ptn</sub></b>	Coefficiente de Partição da proteína

## RESUMO

Neste trabalho foi estudada a partição da  $\beta$ -galactosidase em SAB's compostos por polietilenoglicol (PEG), poliacrilato de sódio (PAS), água e NaCl. As concentrações dos polímeros, pH e temperatura, foram variadas de acordo com um delineamento fatorial completo seguido de um deslocamento ascendente para auxiliar a determinar a melhor condição de extração. A partir das informações fornecidas pela análise estatística dos dados obtidos, a concentração dos polímeros foi selecionada para ser testada em um delineamento central composto rotacional (DCCR), visto que foi o parâmetro que afetou significativamente a partição da  $\beta$ -galactosidase. Este delineamento combinado a metodologia de superfície de resposta (MSR) foi utilizado para encontrar a região ótima para extração da enzima. Os melhores resultados foram observados para o sistema composto por 11% m/m de PEG, 12% m/m de PAS e 1 % m/m de NaCl em pH 8 a 25°C, que forneceu valores de 1.56 e 0.55 para o  $K_{\beta}$  e para S respectivamente. Foram realizadas análises da eficácia do sistema considerado ideal adicionando um extrato bruto enzimático contendo  $\beta$ -galactosidase e calculando os valores para fator de purificação e rendimento. Experimentos variando a concentração inicial da enzima adicionada ao sistema foram realizados com objetivo de evidenciar os problemas de precipitação causados pela concentração excessivamente elevada da solução de enzima que será particionada. Um gráfico relacionando o SAB com uma extração líquido-líquido em fluxo cruzado também foi construído para determinação do número de estágios teóricos que seriam necessários caso a operação fosse realizada com esse procedimento. Os resultados encontrados mostraram que este sistema é eficiente na separação da enzima estudada, sendo, portanto, uma alternativa promissora para a obtenção e purificação da mesma para diversos fins.

## ABSTRACT

This study investigated the partition of  $\beta$ -galactosidase in SAB `s composed of polyethylene glycol (PEG), sodium polyacrylate (PAS), water and NaCl. The concentrations of polymers, pH and temperature were varied according to a complete factorial design, followed by an upward shift to help determine the best condition for extraction. From the information provided by statistical analysis of results, the concentration of polymers was selected to be tested in a central composite design, since it was parameter that significantly affected the partitioning of  $\beta$ -galactosidase. This design combined with response surface methodology was used to find the optimal region for the extraction of the enzyme. The best results were observed for the composite system 11% m/m of PEG, 12% m/m of PAS and 1% m/m of NaCl in pH 8 to 25 C that provided valuation of 1.56 and 0.55 to the  $K_{\beta}$  and to the S respectively. We analyzed the effectiveness of the system considered ideal by adding a crude extract containing enzyme  $\beta$ -galactosidase and calculating the values for yield and purification factor, the results being found satisfactory. Experiments varying the initial enzyme concentration added to the system were performed to highlight the problems caused by precipitation of excessively high concentration of enzyme solution to be separated. A chart listing the SAB with a liquid - liquid extraction in cross flow was also constructed to determine the number of theoretical stages would be needed if the operation was carried out with this procedure. The results showed this system is effective in separating the enzyme studied, and therefore a promising alternative for obtaining and purifying the same for all purpose.

## 1. Introdução

O desenvolvimento de técnicas e metodologias para separação e purificação de compostos de origem biológica, principalmente proteínas, tem sido essencial para os recentes avanços no desenvolvimento da indústria biotecnológica. Entretanto, sua purificação a nível industrial é dificultada, dentre outros fatores, pela baixa concentração e alta sensibilidade térmica, o que geralmente obriga o uso de técnicas de custo elevado, como processos cromatográficos. Com isso, o custo final dos processos é elevado, dificultando o acesso a estes produtos de grande aplicação nos campos alimentício e terapêutico (COLLEN, 2004).

A extração líquido-líquido usando sistemas aquosos bifásicos (SAB) tem sido utilizada com grande sucesso em processos de separação, concentração e purificação de proteínas. Esta técnica apresenta varias vantagens aos métodos de separação tradicionais, visto que o tipo de sistema utilizado no processo extrativo (usualmente polietilenoglicol, dextrana e água ou polietilenoglicol, sal e água) apresenta alto teor de água em cada fase (entre 70% e 90%), resultando em um ambiente ameno para o trabalho com um componente biologicamente ativo, o qual preserva a sua estabilidade molecular, possibilitando o seu processamento neste meio. Estes sistemas apresentam vantagens como viscosidade e tensão superficial baixas, densidades próximas às da água, curto tempo de processamento e fácil aumento de escala, além de baixo custo, segurança, uso de componentes não tóxicos e de alto conteúdo aquoso em ambas as fases, prevenindo problemas de desnaturação protéica (PESSOA-JR, 2005).

A busca por métodos de extração e purificação de biopartículas (proteínas, enzimas, células, etc.) que sejam eficientes e economicamente viáveis é cada vez maior. Nessa linha, os sistemas aquosos bifásicos constituem um potencial. Entretanto, é notório que os SABs apesar da intensa aplicação em escala laboratorial para purificação de biocompostos, não alcançaram ampla aplicação comercial. Contudo, a urgente demanda por parte da indústria biotecnológica, com objetivo de trazer para o mercado consumidor produtos que possuam alto valor agregado, com ampla aplicação médica,

certamente motivará a aplicação em escala industrial dos SABs (COLLEN, 2004).

Entre as biopartículas citadas acima, uma de grande interesse industrial e que vem sendo bastante estudada é a enzima  $\beta$ -galactosidase. Esta enzima é comercialmente conhecida como lactase, sendo responsável pela hidrólise da lactose, uma boa alternativa para os consumidores que são intolerantes à lactose. Além disso, segundo MANAN (2009), existe um crescimento considerável no interesse de se pesquisar usos potenciais da  $\beta$ -galactosidase devido o seu potencial de aplicação em vários ramos da indústria de alimentos e farmacêutica.

Neste trabalho, foram determinadas as melhores condições de separação da  $\beta$ -galactosidase, justificada a importância da mesma, usando SAB composto por polietileno glicol (PEG), poliacrilato de sódio (PAS), água e NaCl em função da concentração dos polímeros, da temperatura e do pH. Os resultados da pesquisa são de extrema importância para a indústria biotecnológica, visto que, o investimento em métodos para otimizar a produção e purificação de biomoléculas é crescente, sendo um amplo mercado para enzimas.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo Geral**

Estudar a partição da enzima  $\beta$ -galactosidase em um sistema de duas fases constituído por polímeros e encontrar as condições ótimas de extração.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Estudar a partição da enzima, na forma pura, nos sistemas aquosos bifásicos constituídos pelos polímeros PEG e PAS.
- Aplicar a metodologia de superfície de resposta para determinar as condições ótimas de extração da  $\beta$ -galactosidase.
- Avaliar o efeito das concentrações dos polímeros, do pH e temperatura sobre a partição.
- Verificar a eficácia do sistema considerado ideal para extração através da extração da  $\beta$ -galactosidase de um extrato enzimático bruto.
- Determinar a curva de equilíbrio para partição da  $\beta$ -galactosidase nas condições otimizadas do sistema.

### **3. Revisão de literatura**

#### **3.1. $\beta$ -galactosidase**

A maior parte da história da bioquímica é a história da pesquisa sobre enzimas. A catálise biológica inicialmente descrita e reconhecida no início do século XIX, em estudos sobre a digestão da carne por secreções do estômago e a conversão do amido em açúcares simples pela saliva e por vários extratos vegetais. Na década de 50, Louis Pasteur concluiu que a fermentação do açúcar em álcool pela levedura é catalisada por fermentos. Ele postulou que esses fermentos depois nomeados de enzimas eram inseparáveis da estrutura das células vivas do levedo, uma hipótese que prevaleceu por muitos anos. Em 1897, Eduard Buchner, descobriu que extratos de levedo podiam fermentar o açúcar até o álcool, provando que as enzimas envolvidas na fermentação continuavam funcionando mesmo quando removidas da estrutura das células vivas. Desde então numerosos estudos vêm sendo realizados na tentativa do isolamento das numerosas enzimas diferentes e o estudo de suas propriedades catalíticas.

A catálise enzimática das reações é essencial para os sistemas vivos. Sob condições biológicas relevantes, as reações não catalisadas tendem a ser lentas. A maioria das moléculas biológicas é muito estável no ambiente aquoso de pH neutro e temperatura moderada encontrado no interior das células. Muitas reações bioquímicas comuns envolvem eventos químicos que são muito improváveis nas condições do ambiente celular, como a formação transiente de intermediários eletricamente carregados e instáveis ou a colisão de duas ou mais moléculas com a orientação precisa e necessária para que ocorra a reação. (LEHNINGER, 1995).

As aplicações de enzimas estão vinculadas ao mercado mundial e podem ser divididas em aplicações industriais, enzimas para uso médico e enzimas para uso analítico e científico. As principais aplicações, principalmente industriais, estão dentro do que se convencionou chamar de biotecnologia, termo este que transformou-se na última década numa enorme quantidade de atividades ligadas à ciência e tecnologia, que tornou-se difícil definir exatamente quantos são os campos de atuação específicos. Mas certamente envolve microbiologia, bioquímica, genética e engenharia química e bioquímica

no processamento de materiais por agentes biológicos. Dentre esses agentes, as enzimas são freqüentemente utilizadas para melhoria de processos e possibilitar o uso de novas matérias-primas, melhorando suas características físico-químicas e também as de vários produtos, na indústria de processamento, em particular na indústria de alimentos a demanda tem sido cada vez mais acentuada, pois, as enzimas podem modificar o alimento no sentido de melhorar suas propriedades nutricionais, sensoriais e funcionais (LIMA, 2001). Nesse contexto evidencia-se a necessidade de estudos sobre aplicações, formas de extração e purificação das enzimas mais demandadas e utilizadas a nível industrial, como por exemplo, a  $\beta$ -galactosidase.

A enzima  $\beta$ -galactosidase é classificada como uma hidrolase e catalisa, entre outras, a reação de hidrólise da lactose à  $\beta$ -D-galactose e  $\beta$ -D-glicose (LONGO, 2006). Essa enzima está presente em todos os filhotes de mamíferos desde o nascimento, estando muito diminuída nos adultos à exceção dos humanos que, dependendo principalmente da etnia, têm menor ou maior atividade da mesma. Ela está localizada em todo o intestino delgado e não sofre influência na quantidade e atividade com a ingestão de lactose e outros açúcares (FARIAS NETO, 2004).

A  $\beta$ -galactosidase tem diversas funções e aplicações. Na indústria de leite, por exemplo, por razões nutricionais, a enzima tem a função de disponibilizar glicose e galactose em produtos de leite, aliviando os sintomas gastrointestinais da intolerância à lactose em pessoas sensíveis, além de melhorar a solubilidade dos produtos concentrados de leite e torná-los mais facilmente fermentáveis. Já por razões tecnológicas é utilizada para melhorar produtos derivados do leite como doce de leite, leite condensado e sorvetes, em que a baixa solubilidade da lactose confere uma textura arenosa, característica indesejável no produto por poder causar cristalização e, conseqüentemente, problemas tecnológicos durante o processamento na indústria de laticínios (ALVIM, 2004).

O uso da  $\beta$ -galactosidase para produzir quantidades pequenas de leite com baixo teor de lactose para alimentação de crianças e adultos foi feito durante anos em clínicas médicas. Mas o interesse comercial acentuou-se nos anos sessenta, estimulado pela oportunidade de vender mais leite e pela

necessidade de encontrar novas aplicações para o soro de queijo (MAHONEY, 2007).

A  $\beta$ -galactosidase encontra-se espalhada na natureza e pode ser isolada a partir de vegetais (como pêssego, damasco, maçã e amêndoas), órgãos animais (como intestino, cérebro, testículos e placenta), bactérias, leveduras (enzima intracelular) e fungos (enzima extracelular), sendo que a grande vantagem dos microrganismo em relação aos vegetais é o fato de atingirem produtividades maiores (SANTIAGO,2004). Na Tabela 1 estão representadas algumas das possíveis fontes para a obtenção da  $\beta$ -galactosidase.

**Tabela 1.** Possíveis fontes de obtenção de  $\beta$ -galactosidase

<b>Plantas</b>	Pêssego Amêndoa Algumas espécies de rosas
<b>Organismos animais</b>	Intestino Cérebro e tecido da pele <i>Kluyveromyces (Saccharomyces) lactis</i>
<b>Leveduras</b>	<i>Kluyveromyces (Saccharomyces) fragilis</i> <i>Cândida pseudotropicalis</i> <i>Escherichia coli</i>
<b>Bactérias</b>	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Bacillus sp</i> <i>Streptococcus lactis</i>

**Fonte:** Santiago, 2004.

Destas várias fontes de  $\beta$ -galactosidase, nem todas são aceitas ou reconhecidas como seguras quando a enzima está sendo utilizada em processos alimentícios. Preparações enzimáticas a partir de *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* e *Kluyveromyces sp.* (*lactis* ou *marxianus*) são consideradas seguras, porque têm sido bastante utilizadas e submetidas a numerosos estudos (CARMINATTI, 2001). Porém, apresentam diferentes propriedades com potenciais variados de aplicação tecnológica. Segundo a legislação brasileira, a enzima  $\beta$ -galactosidase utilizada na indústria de alimentos deve ser de origem microbiana, proveniente de levedura *Kluyveromyces lactis* (BRASIL, 2003).

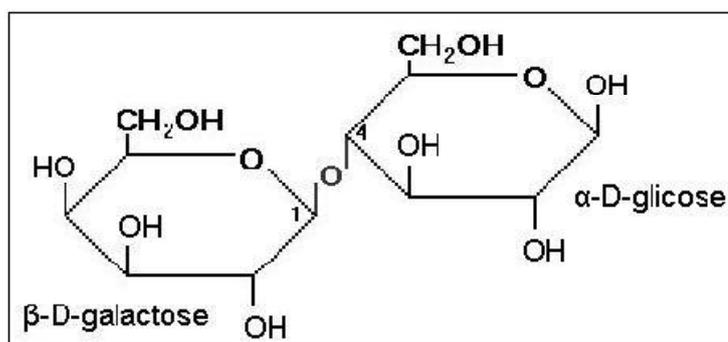
De acordo com a sua fonte de extração a  $\beta$ -galactosidase pode apresentar diferentes propriedades com potenciais variados de aplicação tecnológica, gerando diferentes produtos, como: Leite com teor reduzido de

lactose, medicamentos para combater a intolerância à lactose, produção de xaropes alimentares, além de produtos derivados do leite com baixa concentração de lactose (OLIVEIRA, 2005). Reafirmando, desta forma, sua importância na indústria biotecnológica do ponto de vista nutricional e no campo tecnológico (LONGO, 2006).

### 3.2. Importância da $\beta$ -galactosidase sobre a Intolerância a Lactose

Segundo a legislação brasileira, entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de glândulas mamárias de fêmeas mamíferas, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2002). É um alimento líquido que contém aproximadamente 86% de água e está constituído por uma mistura de várias substâncias como minerais em solução, proteínas, gorduras na forma de emulsão, vitaminas e lactose (TRONCO, 2003).

Segundo BUCHHEIM (2004), a lactose é o principal carboidrato do leite de vaca e possui valor médio de 4,9% da sua composição, sendo sua concentração relativamente constante e pouco sujeita a variações estacionais. A lactose (4-O-( $\beta$ -D-galactopiranosil)-D-glicose) ou “açúcar do leite”, como é comumente conhecida é um dissacarídeo, considerada um açúcar redutor, porque o grupo no carbono anomérico da porção glicose não está envolvido na ligação glicosídica, portanto, ela está livre para reagir com agentes oxidantes (CAMPBELL, 2000). Na Figura 1 está representada a estrutura química da lactose.



**Figura 1** – Fórmula química da lactose. (Macedo, 2003)

Em termos nutricionais a lactose no organismo humano é hidrolisada pela enzima  $\beta$ -galactosidase, sendo absorvida como glicose e galactose. Além

de promover a absorção e retenção de cálcio no intestino (MANAN *et al.*, 2009). Porém, esta enzima não está presente em todas as pessoas, de modo que o consumo de alimentos com lactose fica restrito para as pessoas intolerantes, pois pode levar à fermentação do carboidrato, gerando distensões, desconfortos e, em alguns casos, diarreias. Por estes motivos, a redução do teor de lactose no leite e nos seus derivados é de grande importância não somente comercial, mas também nutricional (SILVA, 2007).

Segundo a OMS (2010), a intolerância aos alimentos é uma reação reproduzível, desagradável (adversa) que pode ocorrer devido a uma falha do processo digestivo, que depende da ação de enzimas capazes de degradar os alimentos, em virtude de deficiências enzimáticas.

O leite é considerado o mais nobre dos alimentos, por ser uma mistura complexa, nutritiva e estável de nutrientes. Porém, cerca de 70% da população adulta do mundo não pode consumir este alimento, pois é incapaz de digerir a lactose, principal carboidrato do leite (BUCHHEIM, 2004). A intolerância a este açúcar é devido à deficiência ou ausência no organismo da  $\beta$ -galactosidase, enzima responsável por “quebrar” a molécula deste carboidrato em monossacarídeos (galactose e glicose), possibilitando a sua absorção pelo intestino (SUENAGA *et al.*, 2003). As pessoas deficientes em  $\beta$ -galactosidase não têm essa capacidade e quando consomem leite, a lactose não é desdobrada no intestino delgado, não sendo absorvida. Desta forma, a pressão osmótica do intestino aumenta e uma quantidade considerável de água é retirada dos tecidos vizinhos. Então a lactose passa para o intestino grosso, onde é fermentada por grupos microbianos produtores de gases e água ou é hidrolisada por bactérias em ácidos orgânicos de cadeia curta. Os gases que não são absorvidos causam inchaço e os ácidos produzidos irritam a parede intestinal e aumentam a motilidade, que combinada com a água secretada no intestino resultam em diarreia. Estes sintomas e outros, como dores abdominais e vômitos, variam em intensidade de indivíduo para indivíduo. Por causa destes sintomas desagradáveis, as pessoas deficientes em  $\beta$ -galactosidase se privam do consumo de leite e com isto de seus benefícios nutritivos (FERREIRA, 2006). Segundo MORIWAKI e MATIOLI (2000), a redução ou eliminação do leite e seus derivados da dieta de crianças intolerantes à lactose pode comprometer a absorção de proteína e riboflavina,

além do cálcio. Portanto é recomendada a adição de cálcio nos produtos lácteos sem lactose ou com quantidade de lactose reduzida porque a absorção desse mineral no intestino é baixa quando não se tem a presença de lactose (SANTIAGO, 2004).

Existem três tipos de intolerância à lactose, decorrentes de diferentes processos. A deficiência congênita de  $\beta$ -galactosidase, que é um defeito genético muito raro e manifesta-se nos recém-nascidos logo após a primeira ou segunda ingestão de leite, sendo uma condição permanente. Já a intolerância ontogenética à lactose ou hipolactasia tipo adulto, possui manifestações clínicas menos intensas e mais tardias, e ocorre devido a uma tendência natural de diminuição da produção de  $\beta$ -galactosidase com o avançar da idade. A intolerância secundária à lactose é a mais comum e pode ocorrer em consequência de doenças que causam algum tipo de dano à mucosa intestinal, ou após todas as cirurgias no aparelho digestivo, ou também em prematuros em que uma imaturidade enzimática associada a um processo infeccioso pode levar à intolerância (LONGO, 2006).

Segundo TORRES (2004) todos os mamíferos terrestres têm um decréscimo da  $\beta$ -galactosidase depois de desmamar. Mundialmente, os humanos perdem de 90% a 95% dos níveis de  $\beta$ -galactosidase do nascimento até o início da infância, continuando o declínio ao passar dos anos. O recente mapeamento do genoma humano encontrou “o código genético” responsável pela inabilidade da maioria dos adultos para produzir  $\beta$ -galactosidase. Esta falha genética é encontrada em várias partes do mundo.

Cerca de 70% da população adulta do mundo não pode consumir este alimento, pois é incapaz de digerir a lactose, principal carboidrato do leite (BEYER, 2004). Na América do Sul, a prevalência de intolerância a esse carboidrato é de 65 a 75% (VRESE et al., 2001). Sendo que, só no Brasil, 58 milhões de pessoas apresentam alguma dificuldade em digerir a lactose pela deficiência da enzima  $\beta$ -galactosidase no intestino (BATAVO, 2004). Segundo Longo (2006), esta é uma das mais comuns desordens genéticas.

Porém, TORRES (2004) ao realizar um estudo realizado com chineses, tidos como intolerantes à lactose, mostrou que uma introdução gradual de leite pode ser aceitável e o leite é melhor tolerado quando consumido junto a uma refeição, afirmando que mesmo os intolerantes à lactose podem tolerar uma

porção de leite em uma refeição sem apresentarem desconfortos gastrointestinais. Já BEYER (2002) ao fazer uma pesquisa envolvendo adultos intolerantes a lactose demonstrou que o consumo de uma pequena quantia do carboidrato (6 a 12g) pode acontecer sem gerar sintomas principais, especialmente quando consumido com refeições ou na forma de iogurte com culturas ativas.

A enzima  $\beta$ -galactosidase e os derivados de leite tratados com ela estão disponíveis para pessoas que não digerem a lactose e possuem desconforto com a ingestão de leite (BEYER, 2002). No Brasil, o mercado voltado para pessoas intolerantes a lactose ainda tem sido pouco explorado. Com exceção do leite UHT, o mercado brasileiro ainda não dispõe de derivados lácteos com baixo teor de lactose voltados a essa clientela (ABLV, 2005). Entretanto, recentemente a indústria de laticínios tem dado especial atenção ao desenvolvimento de produtos contendo baixo teor de lactose, visando atender aos consumidores que apresentam má absorção ou intolerância à lactose (SUENAGA et al., 2003). Uma alternativa que tem sido bastante estudada para produção desse tipo de produto é através da imobilização da  $\beta$ -galactosidase, oriunda de várias fontes, por diversos procedimentos de imobilização, porém até o momento não se conseguiu um procedimento considerado ideal, o que enfatiza a necessidade de estudos sobre formas mais baratas e alternativas de extração e purificação, como os SAB's, desta enzima para sua conseqüente utilização nas indústrias ligadas a biotecnologia.

### **3.3. Produção e Purificação de Enzimas**

O uso de enzimas em aplicações industriais, medicamentos e análises clínicas é uma tendência em todo o mundo. As enzimas são utilizadas como biocatalisadores em química orgânica como uma alternativa aos processos químicos clássicos por apresentarem inúmeras vantagens. Dentre estas se destacam elevada velocidade de reação; utilização de condições brandas; compatibilidade com substratos sintéticos; em alguns casos podem catalisar as reações nos dois sentidos e podem, ainda, apresentar alguma seletividade quanto ao tipo de reação que catalisam. Já em medicamentos, a grande eficiência das enzimas aliada à sua especificidade, tornam-nas, a princípio, agentes de grande potencial para uso terapêutico (SANTIAGO, 2004).

O processo de separação e purificação de bioprodutos, também chamado “downstream processing”, é atualmente um segmento muito importante na indústria, pois pode chegar a representar de 80 a 90% do custo de produção. Portanto, o desenvolvimento de um processo eficiente e de baixo custo é de extrema importância (MERCK, 2008).

Muitas técnicas têm sido utilizadas para a recuperação e purificação de proteínas e enzimas de origem animal, vegetal ou microbiana, porém são encontradas muitas dificuldades, do ponto de vista técnico, e exige um elevado número de etapas. Por exemplo, a remoção dos fragmentos das células é difícil devido ao pequeno tamanho das partículas e à viscosidade da solução. Além disso, as etapas de concentração podem levar a baixos rendimentos e reprodutibilidade limitada e os procedimentos de alta purificação, como a cromatografia, são limitados pela escala de operações e pelo custo das resinas (RABELO, 2005).

A grande questão ao iniciar um processo de purificação é o grau de pureza exigido para a enzima. Enzimas para fins terapêuticos ou de uso direto em humanos necessitam de um alto grau de pureza, o que não é necessário para as enzimas que serão aplicadas em processos industriais. Em uma purificação em larga escala, o processo normalmente consiste de 4 a 6 etapas que podem ser divididas em dois grupos. O primeiro é formado pelos processos de recuperação da proteína: separação e ruptura de células, separação dos fragmentos e concentração da proteína. No segundo grupo o objetivo é purificar a proteína, utilizando-se das etapas de pré-tratamento ou isolamento primário, purificação de alta resolução e refinamento final (AZEVEDO, 2007).

A escolha das técnicas a serem empregadas no processo de purificação está vinculada às propriedades moleculares inerentes a cada enzima; sendo assim, a combinação correta de várias etapas que exploram estas propriedades permitirá a purificação a partir de uma mistura. Nas primeiras etapas quase sempre é desejável reduzir o volume, e para isto é freqüentemente utilizada a precipitação fracionada com sais ou solventes orgânicos. Posteriormente são utilizadas técnicas que exploram interações eletrostáticas (cromatografia de troca iônica) pela sua relativa alta capacidade. Para as etapas finais o objetivo quase sempre é um aumento de resolução, e

para isto utilizam-se técnicas como cromatografia em gel e cromatografia de afinidade. Uma estratégia geral é desaconselhável, desde que os materiais disponíveis e as necessidades para cada caso sejam diferentes. Frequentemente são necessários vários testes do tipo tentativa e erro para se estabelecer as condições ideais e o método mais efetivo para o rendimento e o número de vezes de purificação almejados. Análise via eletroforese em gel (SDS-PAGE) pode indicar a pureza e o número de contaminantes presentes; além disso, o peso molecular da amostra e dos contaminantes pode ser determinados, e assim, auxiliar na escolha ou não de uma cromatografia em gel para a separação dos contaminantes (HARRIS, 2001).

Segundo WABISZCZEWICZ (2006) técnicas mais antigas como a precipitação, extração com solventes e filtração geralmente tem alto poder de concentração e baixa purificação, já as técnicas mais modernas como a cromatografia de afinidade, troca iônica ou gel-filtração, eletroforese, extração em duas fases aquosas, extração com micela reversa, recuperam e purificam, de forma mais eficaz.

A separação de proteínas por precipitação é uma operação unitária muito comum e amplamente utilizada na separação de proteínas, é um dos métodos mais tradicionais para a recuperação e parcial purificação dessas biomoléculas. Este método implica na alteração da estrutura tridimensional da proteína, desconformando-a, e pode ser agressivo, sendo aplicado somente quando a ressolubilização do precipitado é possível. Os precipitados de proteínas são agregados de moléculas protéicas, grandes o suficiente para serem decantados ou centrifugados. É uma técnica de fácil ampliação para escala industrial de escala e com viabilidade para operação contínua a custos aceitáveis para grandes volumes.

Métodos envolvendo a adição de solventes orgânicos miscíveis tais como etanol, metanol ou acetona a um meio aquoso contendo proteínas causa uma variedade de efeitos, os quais, combinados provocam a precipitação da proteína. O solvente destrói a camada de hidratação hidrofóbica em torno das zonas hidrófobas e passa a circundar tais regiões devido à maior solubilidade destas em meio ao solvente. Com isso, as regiões carregadas com carga positiva ou negativa da superfície da proteína podem interagir, atraindo-se umas às outras, formando agregados (SCOPES, 2008). A vantagem da

utilização do etanol como agente de precipitação encontra-se na abundância e baixo custo deste solvente, tornando a recuperação da enzima economicamente interessante, além do fato de que o etanol pode ser reciclado ao processo por uma operação de destilação, reduzindo impactos ambientais pela liberação de efluentes, como é o caso da precipitação com sulfato de amônio. As desvantagens do uso de etanol são: a necessidade de operação em baixa temperatura para minimizar a desnaturação da enzima, e o perigo de inflamabilidade deste solvente.

Além da precipitação, outra técnica de fundamental importância para a purificação de enzimas, que podem ser separadas de acordo com o seu tamanho, forma, carga, hidrofobicidade e afinidade bioespecífica é a cromatografia. A separação cromatográfica pode ser definida como uma separação diferencial dos componentes de uma amostra entre uma fase móvel e uma fase estacionária. Na maioria das vezes a fase estacionária é formada por partículas esféricas de um material insolúvel que é colocado (“empacotado”) numa coluna (MARTINS, 2008). A mistura de enzimas a serem separadas é introduzida na coluna pela fase móvel, e forçada através da coluna. As enzimas que possuem maior atração pela fase estacionária irão mover-se mais lentamente que aquelas que têm maior afinidade pela fase móvel. A fase estacionária é chamada de matriz ou resina, que pode ser modificada pela ligação de grupos químicos para conferir-lhe determinadas características físico-químicas adequadas a cada processo. Lembrando que na seleção da resina adequada para a purificação de uma determinada enzima, o pH de estabilidade desta enzima deve ser considerado para se determinar a faixa de trabalho. As matrizes mais comuns são polímeros do tipo: celulose, dextrana, agarose, poliacrilamida e poliestireno, sendo que de preferência devem ter alta estabilidade química, mecânica e biológica (SCHMIDEL, 2001).

Na cromatografia de peneira molecular ou cromatografia de exclusão, as moléculas de proteínas são separadas pelo seu tamanho e forma. O processo de separação é realizado utilizando-se uma matriz com porosidade controlada, empacotada numa coluna e envolta pela fase móvel. Quando se aplica uma amostra constituída de uma mistura de moléculas de diversos tamanhos, as moléculas menores irão penetrar nos poros da matriz e, em razão disto, terão um movimento relativamente mais lento através da coluna, sendo os

componentes eluídos ao final do processo de separação. Este método trabalha com volumes pequenos de soluções previamente concentradas, pois a capacidade máxima da coluna é de 10% do seu volume. É comercialmente usada para separação, nas etapas finais de purificação e dessalinização de amostras (TRINDADE, 2010).

Já na cromatografia de troca iônica, a técnica de separação envolve adsorção em grupos carregados da resina, seguida de sua eluição com principalmente os resíduos de aminoácidos. É baseado, fundamentalmente, na carga líquida das proteínas presentes em uma mistura. A carga é influenciada pelo pH e esta propriedade é utilizada para separar as espécies protéicas. A capacidade de processamento de volumes maiores de amostras diluídas torna este método bastante útil para aplicação industrial, desde que se disponha de uma matriz de troca iônica com boa resolução, com altos fluxos e resistente ao gradiente salino e à mudança de pH (CAVALCANTI, 2006).

A cromatografia por interação hidrofóbica, por sua vez, baseia-se na interação das regiões hidrofóbicas das proteínas com os grupos hidrofóbicos da matriz. A adsorção ocorre em altas concentrações salinas e o fracionamento é alcançado com um gradiente salino negativo. Este método é ideal para a purificação de enzimas que foram concentradas por precipitação com sulfato de amônio (GERHARTZ, 2008).

Além das citadas acima, existe também, a cromatografia de afinidade que baseia-se na ligação bioespecífica da enzima com ligantes presentes no suporte da coluna, que podem ser substratos ou inibidores. A escolha do ligante torna-se evidente a partir das propriedades da enzima a ser purificada, além disso, o ligante deve ser estável nas condições utilizadas para imobilização, bem como nas condições de uso. Como exemplos de ligantes: inibidores de proteases; heparina e corantes triazínicos. A enzima de interesse é posteriormente recuperada por eluição com solução de pH ou força iônica adequados. Apesar de sua seletividade muito elevada, essa técnica tem aplicação restrita à escala de laboratório ou a segmentos muito específicos, como o caso das enzimas analíticas (KLEMZ, 2007).

Outra técnica que pode ser utilizada no processo de separação e purificação de enzimas é o fracionamento com espuma, uma técnica de separação com bolhas adsortivas, pode ser empregada como um método

adicional de purificação de enzimas ou até mesmo substituir as operações cromatográficas. Especial atenção deve ser dada ao ajuste dos principais parâmetros que afetam a distribuição da enzima na espuma, como pH, concentração da enzima e do detergente, velocidade superficial e tempo de formação de espuma. Porém, resultados recentes refutaram a hipótese que processos com espuma obrigatoriamente vem acompanhados de perda da atividade enzimática (KILIKIAN, 2005).

É importante ressaltar que geralmente é necessária uma concentração ao final ou entre etapas de purificação. Isso porque um volume menor de solução é mais fácil de manusear em etapas subsequentes, tais como precipitação ou cromatografias que exigem volumes pequenos, como cromatografia em gel; além disso, concentrações protéicas mais altas minimizam perdas por adsorção não específica em recipientes e matrizes. A concentração pode ser obtida por remoção de água das seguintes maneiras: adição de um polímero, remoção de água (liofilização) e por remoção do solvente através de uma membrana semi-permeável que não permite a passagem da enzima de interesse (ultrafiltração). Nesse processo, água e pequenas moléculas são direcionadas através de uma membrana por uma força que pode ser exercida por centrifugação ou pressão (LIMA, 2001).

Além das técnicas descritas acima, a purificação e separação de proteínas baseadas nos princípios da extração líquido-líquido envolvendo a partição em sistemas de duas fases aquosas tem sido muito desenvolvida nos últimos anos. Esta técnica de extração parece ser especialmente adequada para as primeiras etapas dos procedimentos de separação, mas pode substituir etapas cromatográficas ou ser aplicada antes da cromatografia. (DA SILVA, 2006). Por isso vem despertando interesse a fim de ser utilizada como uma etapa intermediária de separação, que substitui métodos de separação mais caros ou diminui o número de etapas de separação necessárias ao processo.

### **3.4. Extração Líquido-Líquido**

A extração líquido-líquido (ELL) com solventes orgânicos é uma operação muito utilizada na indústria química como técnica de separação. A extração de biocompostos em sistemas de duas fases líquidas imiscíveis constituídas de uma fase aquosa e um solvente orgânico é utilizada a cerca de

60 anos, na purificação de antibióticos e ácidos orgânicos. Para proteínas e biomoléculas, no entanto, tais sistemas não são adequados devido a sensibilidade desses componentes frente aos solventes orgânicos, que podem promover alterações estruturais das referidas espécies. Alternativamente, proteínas e outros materiais de origem biológica podem ser purificados em sistemas bifásicos constituídos por duas fases aquosas parcialmente miscíveis. A purificação é resultado de uma partição diferenciada da molécula-alvo e impurezas entre as duas fases líquidas (PESSOA-JR, 2005).

Na obtenção de produtos de origem biotecnológica para as indústrias farmacêutica, médica, de alimentos e de química fina, a maior parte dos custos se concentra na parte final da formação do composto. Procurando minimizá-los buscam-se métodos pouco dispendiosos e que reduzam os passos de purificação (HEMAVATHI, 2010). Em relação às técnicas tradicionais de extração líquido-líquido, os sistemas aquosos bifásicos são vantajosos e, por isso, têm sido aplicados com sucesso na separação e purificação de macromoléculas e partículas celulares. Apresentam boa resolução, alto rendimento e baixo custo. Adicionalmente, o alto conteúdo de água de ambas as fases (70-90 %) implica em alta biocompatibilidade e baixa tensão interfacial, minimizando a degradação das biomoléculas (GÜNDOZ, 2000).

#### **3.4.1. Sistemas Aquosos Bifásicos**

Com o despontar das indústrias de biotecnologia e química fina gerou-se uma demanda por processos de extração com sistemas não convencionais devido às rigorosas exigências do mercado no tocante à pureza e qualidade dos produtos, muitos deles de elevado valor comercial. A escala de produção de muitas biomoléculas tem sido alcançadas pelos avanços da biologia molecular e biotecnologia. No entanto, a tecnologia de purificação de tais produtos foi desenvolvida lentamente quando comparado com a tecnologia de produção, devido a complexidade do sistema e a necessidade de manter a biomolécula com atividade biológica (MUTHIAH, 2011).

Sistema aquoso bifásico (SAB) tem sido amplamente utilizados para recuperação e purificação de biomoléculas, como: proteínas, enzimas e antibióticos (RAMASAMI, 2004). O SAB é um processo de separação simples e oferece ambiente não-tóxico suave para biomoléculas sensíveis, o que

favorece a estabilidade das biomoléculas durante a separação, quando se compara com sistemas tradicionais, compostos com solventes orgânicos (SILVA, 2008). Recentes melhorias da técnica, com o emprego de novos SAB's compostos por polímero e sal, polímero e polímero, permitem o seu uso em nível industrial (AZEVEDO, 2007).

A formação dos SAB é conhecida desde o final do século 19. Em 1896, Beijerinck descobriu que soluções aquosas de gelatina e ágar ou gelatina e amido solúvel, misturadas em uma dada faixa de temperatura e concentração, formavam misturas turvas que, em repouso, separavam espontaneamente em duas fases líquidas límpidas. Porém, foi apenas com os trabalhos de ALBERTSSON (1986), em meados da década de 50, que ficou evidente para a comunidade científica a grande potencialidade de aplicação destes sistemas à partição/purificação de materiais biológicos, desde proteínas até células (DA SILVA, 2006). Desde então, as pesquisas nesta área têm-se aprofundado, tornando a utilização dos SAB importante ferramenta na partição e, ou concentração de compostos como células animais ou vegetais, microorganismos, fungos e seus esporos, cloroplastos, mitocôndrias, membrana vesicular, enzimas, proteínas, ácidos nucleicos, vírus, metais, entre outros (SARAVANAN, 2010).

Nos SABs, nas fases formadas, uma é rica em polímero e a outra fase é rica em polímero ou sal (COLLEN et al., 2004). As duas fases líquidas formadas se encontram em equilíbrio termodinâmico, ou seja, as propriedades termodinâmicas intensivas como densidade, índice de refração e composição não estão variando em uma dimensão temporal, ou ainda, não há troca resultante de matéria entre as fases. Estas fases estão separadas por uma interface que é a região na qual as propriedades termodinâmicas intensivas de cada fase transitam para valores diferentes, sempre tendendo para o valor daquela propriedade no seio da outra fase em equilíbrio (CARVALHO, 2004).

Teoricamente, todos os tipos de SABs podem ser empregados na separação de biomoléculas, mas dentre os diferentes sistemas o que apresenta maior número de estudos é aquele composto por polietilenoglicol (PEG), dextrana e água. Porém, para uso em escala industrial, a dextrana apresenta custo elevado. Os sistemas PEG - Sais apresentam vantagens em relação aos sistemas compostos por polímero-polímero-água como custo

reduzido, menor tempo de separação de fases e propriedades físicas favoráveis à operação em larga escala, como por exemplo, elevada seletividade e diferenças de densidade e viscosidade entre as fases adequadas para o trabalho com equipamentos de extração disponíveis no mercado. Assim, os sistemas PEG-sal têm sido usados para a extração em larga escala, uma vez que podem ser formados a temperatura ambiente, sendo a fase superior rica em PEG e a fase inferior rica em sal. A separação de fases é atingida mais rapidamente devido à menor densidade da fase salina em relação à fase polimérica, o que facilita o uso de sistemas polímero-sal em aplicações industriais (ZUÑIGA et al., 2001). No entanto, um novo sistema formado por PEG e PAS tem sido estudado, mostrando bons resultados. Este SAB separa fases relativamente rápido e apresenta baixa viscosidade. Além disso, o poliácrlato de sódio é um polímero de baixo custo, o que possibilita um aumento de escala economicamente viável (JOHANSSON 2008). Dentre os sistemas do tipo polímero-polímero, o mais estudado é aquele formado por PEG e dextrana. Porém, na separação de proteínas os sistemas do tipo PEG/sal são os mais utilizados, já que o sistema PEG/dextrana apresenta viscosidade elevada e o custo da dextrana torna-se proibitivo quando se pensa em aumento de escala (RAGHAVARO, 2010). Na Tabela 2 encontram-se os tipos de sistemas aquosos bifásicos mais comumente utilizados em estudos de partição e dados de equilíbrio.

Os SABs vêm sendo empregados com muito sucesso na separação de diversas biomoléculas, como PERUMALSAMY (2011) que estudou a partição de BSA em sistemas aquosos compostos de Polietileno glicol e citrato de sódio. Já MONTEIRO et al. (2008) estudaram a partição de  $\alpha$ -La,  $\beta$ -Lg por extração no ponto de névoa em sistemas bifásicos contendo copolímeros triblocos. Já SPELZINI (2005) utilizou o SAB para obter a melhor condição de extração da quimosina e da pepsina. OUYANG (2007) avaliou o coeficiente de partição da  $\alpha$ -amilase. ZUÑIGA et al. (2001) avaliaram a influência de massa molar do polímero na partição de  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg em SAB compostos por PEG e fosfato de potássio. DA SILVA et al. (2007) realizaram uma investigação sobre parâmetros termodinâmicos e o efeito do tipo de sal (fosfato de sódio, sulfato de lítio, citrato de sódio e sulfato de sódio) na partição do glicomacropéptido.

MEIRELLES (2001) determinou os coeficientes de partição de BSA,  $\alpha$ -La,  $\beta$ -Lg em sistemas polipropileno glicol-maltodextrina.

**Tabela 2.** Tipos de sistemas aquosos bifásicos e seus componentes.

<b>Polímero</b>	<b>Polímero</b>
Polipropileno glicol	Polietileno glicol (PEG)
	Polivinil álcool (PVA)
	Maltodextrina (MD)
	Dextrana (Dx)
	Ficoll
Polietileno glicol	Hidroxipropil-amido (HPS)
	Polivinil álcool (PVA)
	Polivinil pirrolidona (PVP)
	Maltodextrina (MD)
<b>Polímero</b>	<b>Componente de baixa massa molar (Sais)</b>
Polietileno glicol e copolímeros	Sais inorgânicos: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , $\text{NH}_2\text{CO}_2\text{NH}_4$ , $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , $\text{K}_2\text{CO}_3$ , $\text{K}_3\text{PO}_4$ , $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , $\text{Li}_2\text{SO}_4$ , $\text{FeSO}_4$ , $\text{Na}_3\text{Cit}$
Polietileno glicol	Glicose, maltose
Polipropileno glicol	Sais inorgânicos: $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , $\text{KH}_2\text{PO}_4$
	Glicerol

**Fonte:** Zaslavsky, 1995.

Além destes, ANTOV (2006) utilizou o sistema polietilenoglicol (PEG) 4000 + dextrana para extração de pectinase. Xilose redutase foi purificada em um sistema PEG + sais de fosfato, conforme relatado por SANTIAGO (2004). GÜNDÜZ (2004) empregou o sistema PEG + gel dextrana na obtenção de albumina de soro bovino (BSA). REH et al (2002), estudaram a purificação da alfa-1-antitripsina do plasma humano em SABs, verificando a viabilidade e potencialidade desta técnica. Esta técnica de separação vem sendo aplicada em outros segmentos como no tratamento de efluentes industriais e na indústria de papel e celulose (SONG et al., 2003). São também utilizados na remoção de íons metálicos (GRABER et al., 2000), compostos aromáticos de óleo cru (WAZIRI et al., 2003) e poluentes orgânicos do meio ambiente (ROGERS et al., 1998). Porém, mesmo com tantas utilizações como foram

vistas, ainda assim o maior uso dos sistemas aquosos bifásicos tem sido na etapa de concentração e no processo de purificação de proteínas.

Encontram-se na literatura diversos trabalhos que evidenciam os SAB's e o seu potencial de aplicação a nível industrial e que auxiliam a identificar os sistemas mais adequados à separação de certas biomoléculas, como exemplificado na Tabela 3.

**Tabela 3** - Aplicações de Sistemas Aquosos Bifásicos

<b>Biomolécula</b>	<b>SAB</b>
BSA e ovalbumina	PEG - Dex
Endopoligalacturonase	PEG - polivinil álcool
Amiloglucosidase	PEG - Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
β-galactosidase, lisozima	PEG - Dex
α-la, β-Ig	PEG - FFP
Escherichia coli	PEG - FFP
Álcool desidrogenase	PEG - HPS
BSA	PEG - goma guar
Ácido láctico	EOPO - Dex
Lignina	PEG - K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>
α-amilase	PEG - MgSO <sub>4</sub>
β-Ig, BSA, caseína	Dex - goma guar
Glutenina	PEG - Dex
Lactobacillus acidophilus	PEG - MD
Lisina, glisina	PEG - Dex

**Fonte:** SOUSA, 2008.

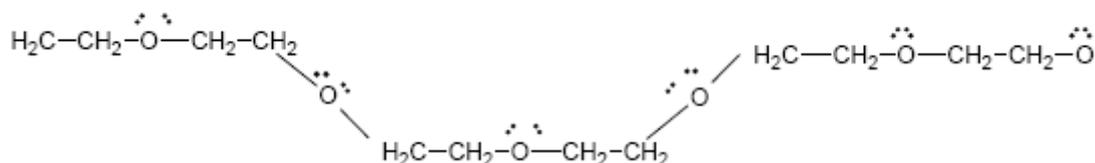
Um amplo conjunto de variáveis, tais como: temperatura, tipo e concentração de sal, concentração e massa molar do polímero, influenciam a separação de fases em SABs e, conseqüentemente, o processo extrativo de um determinado biocomponente (ASENJO, 1990). A base da partição em SAB é a distribuição seletiva de compostos entre as duas fases. Por isto, a predição e a interpretação da partição de biopartículas em sistemas aquosos bifásicos é uma difícil tarefa, embora a manipulação das propriedades do sistema tornando predominante um determinado tipo de interação venha a ser uma forma de

controlar a partição (HATTI-KAUL, 2001). Daí a importância de estudar diferentes SABs, ampliando e facilitando a utilização do mesmo como método de separação e purificação.

### 3.4.1.1. Constituintes das fases

#### 3.4.1.1.1 – Polietilenoglicol (PEG)

O polietileno glicol, (Figura 2), é formado por unidades de óxido de etileno, em que cada unidade contém sítios ativos (oxigênios portadores de pares de elétrons livres), onde são formadas as interações com as moléculas de água e com os íons dissociados do sal (cátions e ânions).



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

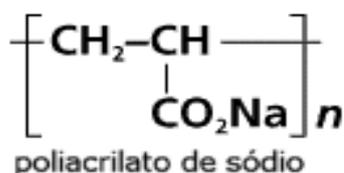
É um polímero sintético, hidrofílico, não iônico, de cadeia linear ou ramificada, com massa molar variável e juntamente com outros polímeros sintéticos, constitui a base para as indústrias de plásticos, embalagens, fibras, adesivos, tintas e esmalte (OLIVEIRA, 2006). É solúvel em água e em vários solventes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

Em aplicações biotecnológicas, a utilização do PEG é de grande interesse, principalmente por excluir, em ambiente aquoso, outros polímeros de sua vizinhança, não se solubilizando com eles. Por serem compostos biodegradáveis e atóxicos, a descarga de PEG não é problemática para o meio ambiente. Uma propriedade do PEG muito importante para sua aplicação comercial é sua atoxicidade. O PEG foi aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration), sendo considerado não antigênico nem imunogênico. Estas características têm permitido a larga utilização de PEG e seus derivados em alimentos, cosméticos, sabões e medicamentos (PEREIRA, 2008). É

importante destacar que na indústria de alimentos, é regulamentada a sua utilização como veículo em adoçantes de mesa (Portaria nº 38, de 13 de janeiro de 1998) e em suplementos vitamínicos e ou minerais (Resolução - RDC nº 2, de 2 de janeiro de 2001). Possivelmente, essa característica do PEG ser inerte está relacionada à manutenção da viabilidade das células sujeitas à partição em sistemas aquosos bifásicos.

#### 3.4.1.1.2. Poliacrilato de Sódio (PAS)

O poliacrilato de sódio,  $[CH_2-CH]_nCOONa$  é um polímero carregado negativamente, não inflamável e não tóxico. A cadeia principal do PAS é hidrofóbica e sua solubilidade é caracterizada pela presença de grupos carboxílicos (ânions) nos grupos poliméricos laterais (PAIVA 2006). Estes grupos são fortemente hidrofílicos quando carregados e, por esse motivo, PEG e PAS se separam em duas fases diferentes. Além de ter se mostrado uma boa alternativa para uso em sistemas aquosos bifásicos do tipo polímero-polímero, já que apresenta baixo custo e baixa viscosidade (SARAVANAN, 2010), o PAS é interessante pelo fato de quando misturado ao PEG leva a formação de um sistema de duas fases polímero-polímero em pH acima de 5,0.



**Figura 3.** Representação da molécula de PAS

## 4. Partição de Enzimas

Devido à atenção que vem sendo dada à produção de proteínas pela engenharia genética e o desenvolvimento da tecnologia de enzimas, renovaram-se os interesses pelos processos de separação de proteínas e suas descrições quantitativas que servem de base para o “*scale up*”. Os fundamentos de partição de biomoléculas utilizando o procedimento de separação por sistemas aquosos bifásicos ainda não são totalmente compreendidos, havendo a necessidade de estudos e pesquisas para melhor informar e auxiliar na utilização desse tipo de extração (ROJAS, 2010).

A tendência de separação de fases apresentada por dois polímeros, quando adicionados num solvente comum, ocorre porque a baixa concentração molar dos polímeros na solução leva a um pequeno ganho de entropia durante a mistura. Por outro lado, cadeias poliméricas têm uma área superficial por molécula maior do que compostos de baixo peso molecular, tanto que as energias de interação entre dois polímeros se sobrepõem à energia de Gibbs do sistema. Estes fatores levam à formação de duas fases em sistemas ternários, polímero-polímero-água, em baixas concentrações de polímeros (SILVA, 2010).

A modelagem quantitativa da partição de proteínas em sistemas de duas fases aquosas representa um complexo problema pelo fato do comportamento do sistema depender de vários fatores, tais quais: tamanho da molécula, conformação, estrutura da superfície, interações de polímeros com as cadeias de proteínas e com diferentes sais, interações polímero-polímero, sal-proteína, proteína-proteína e, quando usados, as interações dos ligantes com os outros componentes presentes. Estudos empíricos com sistemas de duas fases aquosas mostraram que a distribuição da proteína é função de diversos fatores, como: tipo dos polímeros que formam as fases (peso molecular médio, distribuição do peso molecular e modificações químicas poliméricas); composição das fases (comprimento da linha de amarração, tipos de íons presentes ou adicionados ao sistema, força iônica); biomolécula (tamanho, carga, propriedades superficiais e concentração); além do pH e temperatura (CHOUYAEK, 2009). As condições adequadas para a partição devem ser encontradas experimentalmente devido à interdependência dos fatores citados acima.

#### **4.1. Coeficiente de Partição**

O coeficiente de partição é definido como a razão entre a concentração do componente de interesse na fase superior e inferior, respectivamente, quando o sistema entra em equilíbrio. Quando se utiliza os SAB's para separar dois componentes, é interessante que eles tenham coeficientes de partição muito diferentes para que o grau de separação seja elevado.

Diversas variáveis podem influenciar na partição, a temperatura, por exemplo, pode influenciar, já que a sua variação pode levar a alterações na

curva binodal. Em casos extremos, alterações na temperatura podem levar a mudanças estruturais, como desnaturação de proteínas. Neste caso, a partição é alterada porque proteínas precipitadas se comportam de maneira diferente das proteínas em seu estado nativo (BERNARDO, 2000). O tamanho da molécula a ser particionada também influencia o coeficiente de partição. De uma forma geral, quanto maior a biomolécula, mais desigual a sua partição. Componentes como DNA e vírus, cuja massa molar é muito elevada, tendem a migrar apenas para uma das fases. Se o tamanho da molécula for excessivamente grande, ela tende a migrar para a interface, podendo, em alguns casos ser coletada integralmente nessa região. (ALBERTSSON, 1971).

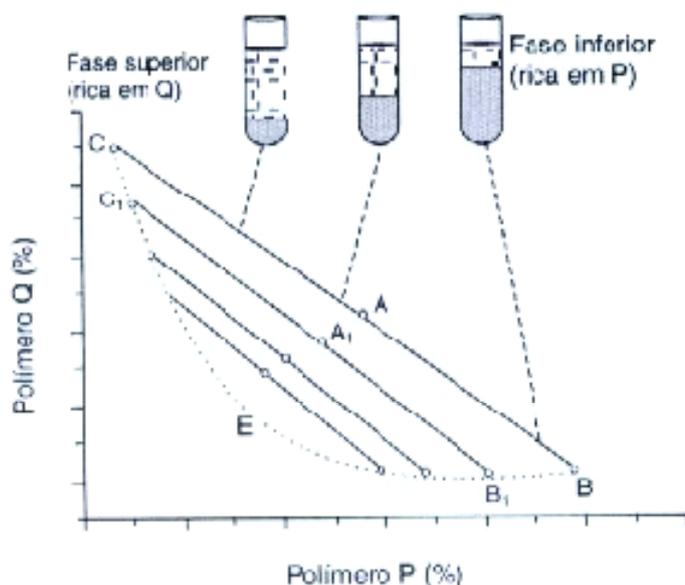
O comportamento dos componentes em SAB's está também intimamente relacionado com suas propriedades interfaciais. Proteínas, por exemplo, são polímeros de aminoácidos que possuem diferentes características de carga e hidrofobicidade. A posição destes aminoácidos na molécula determina suas propriedades superficiais, assim como define por qual fase a molécula terá mais afinidade. Os SAB's, inclusive, são utilizados por alguns pesquisadores como ferramenta para determinar hidrofobicidade de proteínas (FORCINITI et al., 1991).

A base da partição em SAB é a distribuição seletiva de compostos entre as duas fases. Esta distribuição é governada por um grande número de fatores, por exemplo: natureza e tamanho da partícula alvo; constituição, tamanho e estrutura molecular do polímero; temperatura; natureza do eletrólito e pH do sistema bifásico (PEREIRA, 2008). Por isto, a predição e a interpretação da partição de biopartículas em sistemas aquosos bifásicos é uma difícil tarefa, embora a manipulação das propriedades do sistema tornando predominante um determinado tipo de interação venha a ser uma forma de controlar a partição (HATTI-KAUL, 2001). Daí a importância de estudar diferentes SAB, ampliando e facilitando a utilização dos mesmos na extração líquido-líquido.

#### **4.1.1. Diagrama de fases do Sistema Aquoso Bifásico**

Entende-se como diagrama de equilíbrio uma representação gráfica utilizada para expressar as concentrações de um sistema de fases. Os dados de equilíbrio são representados a temperatura e pressão fixas. Para a

utilização de SAB é necessário o conhecimento do comportamento das fases nos sistemas. Para isto são efetuados os diagramas de fases para os componentes, nos quais as composições dos constituintes para a separação das fases são determinadas. A representação gráfica dos dados de composição de fases do SAB é de grande importância para os estudos de separação de biomoléculas, já que são usados como ferramenta básica de ponto de partida para o desenvolvimento de um processo de extração (FARRUGIA, 2008). A Figura 4 representa um exemplo de diagrama de fases.



**Figura 4.** Representação do diagrama de fases em um sistema polímero-polímero.

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

As linhas de amarração (“tie lines”) são representadas como as retas que ligam pontos no diagrama que representam a composição das duas fases em equilíbrio. Qualquer conjunto de pontos que pertençam à região bifásica e que estejam sobre a mesma linha de amarração fornecerá fases superiores que possuirão propriedades termodinâmicas intensivas iguais (densidade,

volume molar, entalpia molar, etc.), entretanto, sendo distintas as suas variáveis termodinâmicas extensivas (massa, volume, etc.). Aplica-se o mesmo raciocínio para as fases inferiores formadas a partir de composições globais localizadas sobre uma mesma linha de amarração (DA SILVA, 2006).

#### **4.1.2. Variáveis que Influenciam o coeficiente de partição no sistema aquoso bifásico**

As variáveis que influenciam a partição de biomoléculas entre duas fases podem ser classificadas como variáveis inerentes ao próprio sistema (por exemplo: componentes do sistema, massa molar do polímero, concentração do polímero ou do sal, pH e temperatura) ou à proteína alvo (por exemplo: hidrofobicidade, distribuição de cargas, ponto isoelétrico e massa molar) (TUBIO et al., 2004). Sabe-se que o coeficiente de partição é resultante de forças de van der Waals, hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e interações iônicas das biomoléculas com as fases do sistema (KORKMAZ, 2000). Porém, os mecanismos que governam a partição de materiais biológicos não são ainda entendidos por completo, sendo necessários estudos sobre a influência dos mesmos no K.

##### **4.1.2.1. Concentração da enzima**

A concentração da proteína presente na amostra influencia o K. Para determinar seu valor é importante trabalhar com concentrações não muito altas de proteínas, pois essas concentrações podem provocar a precipitação da proteína (SCHMIDT, 2008).

A concentração de proteínas também é importante perto do ponto crítico, pois ao se adicionar uma pequena quantidade de proteína em um sistema próximo ao ponto crítico, o diagrama de fases pode modificar-se deslocando a curva binodal, com isso, o valor de K poderá mudar (MINAMI, 1997). Quando o sistema está afastado do ponto crítico, não ocorre deslocamento da curva binodal para concentrações muito baixas de proteína, pois a composição das fases praticamente não se modifica com a adição de proteína. Porém, para altas concentrações pode haver influência na formação das fases que provoca

redistribuição dos componentes do sistema, modificando o diagrama de fases e, conseqüentemente, o valor de K (GUAN, 1994).

O ponto crítico ( $P_c$ ) é um outra particularidade de um diagrama de fases. Este ponto é aquele no qual as propriedades físico-químicas (composição e volume, dentre outras) das duas fases são teoricamente iguais (ALBERTSSON, 1986). Quanto mais a composição do sistema se aproxima do ponto crítico, menor é a diferença entre as fases, ou seja, no ponto crítico as composições e os volumes entre as fases teoricamente são iguais (LOH, 2006).

#### **4.1.2.2. Temperatura**

A influência da temperatura é bastante complexa devido ao seu efeito na composição das fases em equilíbrio, assim como a alteração da estrutura da biomolécula e desnaturação (SARUBBO, 2000). O efeito da temperatura varia de acordo com o tipo de sistema, polímero e polímero ou polímero e sal. Pereira (2008) ao estudar o sistema PEG e dextrana, constatou que com o aumento da temperatura era necessária uma concentração maior dos polímeros para a separação das fases. Neste caso, para que a separação das fases seja favorecida, deve-se atentar para realizar o trabalho em temperaturas inferiores. Já LOH (2008) observou ao estudar sistemas contendo PEG e sal, que ocorre justamente o efeito contrário ao observado por Pereira, afirmando que em temperaturas maiores ou próximas à ambiente a separação das fases do sistema foi facilitada. Além disso, foi observado por ZASLAVSKY (1995) também para o sistema PEG e sal, que o aumento da temperatura favorece o aumento da concentração de PEG na fase superior do sistema e conseqüentemente ocorre uma redução da concentração do polímero na fase inferior. Alguns trabalhos relatam um aumento do coeficiente de partição com a temperatura (OLIVEIRA 2006), entretanto PEREIRA (2008) ao estudar a partição de  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactoalbumina observou que não houve relação entre o coeficiente de partição e a temperatura, esses resultados evidenciam a necessidade de estudos mais aprofundados sobre esse parâmetro para melhor compreensão do seu efeito sobre os SAB's.

#### **4.1.2.3 Massa molar e concentração do polímero**

Em geral, um aumento da massa molar do polímero do sistema de duas fases aquosas, para uma determinada composição de fases, diminui a partição de material biológico para a fase rica em polímero. Quanto maior for a massa molar do polímero, menor é o volume de solvente disponível, o que implica em uma diminuição de solubilidade das proteínas na fase rica em polímero e conseqüentemente uma diminuição do coeficiente de partição (WABISZCZEWICZ, 2006). O efeito da massa molar dos polímeros por sua vez depende da massa molar da biomolécula a ser separada. No caso de proteínas, aquelas com massas molares maiores são mais influenciadas pelas mudanças na massa molar dos polímeros que as proteínas com pequena massa molar (ASENJO, 1990).

O PEG é capaz de excluir as proteínas sem desnaturação de acordo com o aumento de sua massa molar. O mesmo efeito não pode ser observado quando as moléculas menores de proteínas são utilizadas (SCHMIDT et al., 1994). A massa molar do polímero influencia na separação do biomaterial por alteração do diagrama de fase (isto é, por influenciar a composição das fases) e por mudança no número de interações polímero-proteína. Em geral, o aumento na massa molar de um dos polímeros (em sistemas polímero e polímero) levará a uma separação mais acentuada do material em outra fase. Entretanto, a magnitude desse efeito decresce com o aumento da cadeia do polímero (FORCINITI, 1991). Com relação à concentração do polímero, tem sido demonstrado que o sistema de fases desloca-se em direção à região bifásica com o aumento da concentração do polímero. A viscosidade das fases também aumenta com o aumento na concentração do polímero e isto pode influenciar a partição da proteína alvo (ASENJO, 1990).

#### **4.1.2.4. Tipo e Concentração de sal**

A composição do sal é outra variável de suma importância na partição de todas as espécies de moléculas e partículas celulares (COSTA, 1998). Sais que possuem distribuição diferenciada entre as duas fases são importantes para o sistema, pois eles terão grande influência na diferença de potencial elétrico entre as fases. A adição de sais, mesmo que em concentrações

milimolares, influencia fortemente a partição de materiais eletricamente carregados. A adição de sais, tais como NaCl, em um sistema PEG e dextrana tende a diminuir o coeficiente de partição das proteínas carregadas negativamente e tende a aumentar o coeficiente de partição das proteínas carregadas positivamente (SCHIMIDT et al., 1996).

#### **4.1.2.5. pH**

Outro fator importante que pode influenciar o K é o pH do sistema. Mudanças no pH podem também induzir mudanças conformacionais na estrutura das proteínas, causando mudança em seus comportamentos de separação. Em condições extremas de pH é possível que ocorra a desnaturação das proteínas. Geralmente, a partição de proteínas desnaturadas é diferente da partição das mesmas proteínas na forma nativa, o que pode ser atribuído não só a maior área superficial da forma desnaturada, mas também ao fato da superfície exposta desta ser muito mais hidrofóbica (RAMASAMI, 2011). Além disso, segundo SARAVANAN (2010) a influência da carga da biomolécula depende muito do tipo de sal presente no sistema, uma vez que diferentes sais dão origem a diferentes potenciais elétricos entre as fases.

As proteínas são constituídas por diferentes aminoácidos que podem estar carregados ou não, dependendo do pH do meio. Em pH's baixos o grupo amino de seus aminoácidos ganham um próton extra, portanto a proteína apresenta carga líquida positiva. Já em pH's mais elevados o grupo carboxil perde seu próton e a proteína passa a apresentar carga líquida negativa. No ponto isoelétrico, a soma das cargas de todos os grupos da proteína é zero. Com a existência de uma diferença de potencial entre as fases, a carga líquida da proteína pode passar a influenciar a sua partição. Assim como a temperatura, mudanças no pH podem levar a mudanças conformacionais da proteína, afetando sua partição (DA SILVA, 2007).

#### **4.1.2.6. Peso Molecular da Enzima**

O peso molecular da substância a ser separada também influencia em K, pois quanto maior for a molécula, maior será a área de contato que interage com os componentes do sistema e, de acordo com as características da

molécula e com o tipo de interação, ela será mais favorável a uma das fases. Esse fator é muito importante quando se deseja separar duas substâncias com pesos moleculares muito diferentes (ALBERTSSON, 1986)

FORCINITI et al., 1991 observou que o K diminui com aumento do peso molecular e a magnitude dessa diminuição é maior para PEG com baixo peso molecular e tende a ficar estável para PEG com alto peso molecular. O tipo de proteína também influi no valor de K, porque as proteínas são macromoléculas polieletrólitas que carregam cargas quando estão em soluções aquosas. As cargas dependem da composição, da seqüência de aminoácidos, e também das propriedades da solução aquosa, como o pH e a concentração dos solutos (SCHLUCK et al., 2005).

#### **4.1.2.7. Interações entre a Enzima e o Sistema de Fases**

Para o entendimento da influência de alguns fatores em K, é importante compreender o que é solubilidade de proteínas. Uma proteína apresenta uma superfície formada por regiões carregadas positivamente e negativamente, além de possuir regiões hidrofílicas e hidrofóbicas. A distribuição dessas regiões depende do tipo de proteína. A solubilidade da proteína é determinada pelas interações entre tais regiões e o solvente que está presente no meio onde ela está contida. A solubilidade depende, portanto, de fatores termodinâmicos que favorecem ou não a sua solubilidade no solvente. O aumento da proporção de zonas hidrófobas na superfície da proteína resulta no aumento da afinidade a solventes apolares, como é o caso do PEG, fazendo com que esta permaneça na fase superior.

A solubilidade das proteínas nas soluções de PEG depende da interação hidrofóbica entre a proteína e o grupo etileno do PEG. Isso pode explicar a alta tendência das proteínas hidrófobas de se deslocarem para a fase superior rica em PEG. Neste caso, o PEG tende a interagir fortemente com as regiões apolares da proteína (SCHMIDT et al., 1996).

## **5. Materiais e Métodos**

Os experimentos que compõem este trabalho foram realizados no Laboratório de Simulação e Desenvolvimento de Processos do Departamento

de Tecnologia de Alimentos (DTA), da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG.

## **5.1. Materiais**

Os reagentes utilizados foram o Polietileno Glicol (PEG) massa molar média  $2000 \text{ g mol}^{-1}$  (ISO FAR, Brasil); o Poliacrilato de Sódio massa molar média  $8000 \text{ g mol}^{-1}$  (SIGMA-ALDRICH, USA) e Cloreto de Sódio (Sigma Aldrich, EUA). Já a enzima  $\beta$ -galactosidase, utilizada, foi obtida da Prozyn Solutions. Nos experimentos foram empregados água ultra pura (sistema Milli-Q, Millipore Inc., EUA) e reagentes químicos de grau analítico.

## **5.2. Métodos**

### **5.2.1 Preparação dos Sistemas Aquosos Bifásicos**

As soluções estoque dos polímeros utilizadas para montar os sistemas foram PEG 40% (m/m), PAS 35% (m/m) e NaCl 25% (m/m) visto que o volume foi pesado, as soluções tiveram o pH ajustado com o auxílio de um pHmetro (HI 221, HANNA instruments, Brasil) para a condição desejada. Os sistemas de 12 ml de volume total foram obtidos através da mistura das soluções estoque dos polímeros e do NaCl, de forma a se obter as concentrações definidas pelo delineamento experimental. Eles foram preparados em tubos de centrifuga de 15 ml. Os tubos foram agitados em vortex, centrifugados a  $4000 \times g$  por 15 minutos (Eppendorf Mod. 5804, Alemanha) para acelerar a separação das fases, e então incubados por no mínimo 12 h em estufa B.O.D. (Tecnal TE-184, Brasil) sob a temperatura desejada, para que alcançassem o equilíbrio. Após o tempo de incubação as alíquotas das fases foram imediatamente separadas, cuidadosamente, com a utilização de seringas.

### **5.2.2 Técnicas analíticas**

#### **5.2.2.1. Espectrofotometria**

A concentração de proteína total em cada fase foi quantificada pelo método de Bradford (1976) utilizando o azul de Cromassie G através da leitura de absorbância em um comprimento de onda de 595 nm (Biomate 3, USA). A

curva de calibração foi feita a partir de soluções padrão de  $\beta$ -galactosidase. Para eliminar qualquer interferência causada pela interação dos componentes da fase com o reagente de Bradford, amostras das fases equilibradas livres de enzima foram utilizadas como branco durante a leitura das amostras.

### **5.2.2.2. Ensaio Enzimático**

A atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase foi medida de acordo com o protocolo de Ralser *et al.* (2005), adicionando 10  $\mu$ L da solução inicial de  $\beta$ -galactosidase a 1500  $\mu$ L de tampão H (100 mM Hepes/KOH pH 7,0; 150 mM NaCl; 2 mM  $MgCl_2$  e 1% BSA) e 125  $\mu$ L da solução de O-nitrofenil-  $\beta$  -d-galactopiranosídeo (ONPG; Sigma, St. Louis, USA). A mistura de reação foi incubada por 10 minutos à temperatura de 37°C. A reação foi interrompida adicionando-se 400  $\mu$ L de  $Na_2CO_3$  1,0 M. O produto da reação foi detectado em espectrofotômetro (Biomate 3, USA) no comprimento de onda de 420 nm ( $A_{420}$ ). A unidade da atividade de  $\beta$ -galactosidase foi expressa em milimoles de o-nitrofenol (ONP) formada por minuto, de acordo com a curva padrão obtida para a atividade enzimática.

### **5.2.2.3. Preparo do extrato enzimático (Inóculo e ativação das leveduras)**

A linhagem de levedura utilizada foi a *Kluyveromyces marxianus* UFV-3, que é uma espécie selvagem de acordo com sua característica genotípica, como proposto por OLIVEIRA (2005). A levedura foi mantida em meio completo YPD (2% extrato de levedura, 1% peptona e 2% lactose) com glicerol 40% (v/v) a -80 °C ou quando utilizada com frequência, em placas de YPL sólido (1,5% ágar) a 4 °C.

O meio de cultura utilizado neste estudo para preparação do extrato enzimático que foi utilizado posteriormente no experimento foi o YPL sólido (1,5% ágar) a 4 °C em concentrações de: 2%. O meio YPL foi preparado, a solução de lactose foi esterilizada por calor úmido em autoclave 121 °C por 20 minutos separadamente dos demais componentes do meio de cultura e posteriormente foi acrescentado assepticamente ao meio de cultura.

Volume de 1,0 mL da cultura estocada a -80 °C ou uma colônia isolada da placa a 4 °C foi transferido para um volume de 20 mL de meio YPL em Erlenmeyers de 100 mL. As culturas foram incubadas sob agitação de 200 rpm, à temperatura de 37 °C por aproximadamente 24 horas, para a produção de inóculo. Após este tempo, todo o cultivo foi centrifugado a 3000 *g* por cinco minutos, à temperatura de 4 °C. O sedimento de célula foi lavado duas vezes em água peptonada 0,01% (p/v), antes de ser adicionado ao sistema de interesse.

### **5.2.3. Experimentos de Partição Utilizando a Enzima**

Os experimentos de partição também foram preparados em tubos de centrifuga de 15 ml, utilizando 2,0 ml das fases superior e inferior previamente equilibradas. Volumes de 50 µL da solução estoque de enzima foram adicionados aos sistemas, que foram em seguida agitados e centrifugados a 4000 × *g* por 15 minutos (Eppendorf Mod. 5804, Alemanha). Como o volume da solução de proteína foi muito pequeno comparado com o sistema, a mudança de volume das fases foi desprezada. Os tubos centrifugados foram incubados em estufa B.O.D. (Tecnal TE-184, Brasil) sob a temperatura desejada por no mínimo 8 h e com o auxílio de seringas, amostras das fases inferiores e superiores foram coletadas para posterior quantificação de proteínas e cálculo do coeficiente de partição.

### **5.2.4. Cálculos do coeficiente de partição**

A relação entre as concentrações de certa biomolécula nas fases superior e inferior do SAB define o coeficiente de partição (**K**) em sistemas aquosos (ALBERTSSON, 1986). Desta forma, o coeficiente é usado para quantificar o grau de separação alcançado em um processo de extração.

Para determinação do coeficiente de partição da enzima (**K<sub>XR</sub>**) foi utilizada a Equação 1.

$$K_{XR} = \frac{[U]_S}{[U]_I} \quad (1)$$

Onde  $[U]_S$  é a atividade da enzima na fase superior calculado e  $[U]_I$  é a atividade da enzima na fase inferior do sistema utilizado.

Já para determinação do coeficiente de partição para a proteína total ( $K_{ptn}$ ) foi utilizada a equação 2.

$$K_{ptn} = \frac{[ptn]_S}{[ptn]_I} \quad (2)$$

onde  $[ptn]_S$  e  $[ptn]_I$  são as concentrações de proteína total das fases superior e inferior respectivamente.

Através da determinação do  $K_{XR}$  e do  $K_{ptn}$  foi possível determinar o valor da seletividade da enzima no sistema, através da equação 3.

$$S = \frac{K_{XR}}{K_{ptn}} \quad (3)$$

Onde  $K_{XR}$  e  $K_{ptn}$  correspondem ao coeficiente de partição da enzima e o coeficiente de partição da proteína total na fase superior e inferior, respectivamente.

### 5.2.5. Fator de Purificação e Rendimento

O fator de purificação é a variável que indica quantas vezes é possível purificar o extrato enzimático na fase superior utilizando o sistema em questão. É calculado como a razão entre a atividade específica na fase superior ( $[U]_S / [ptn]_S$ ) e a atividade específica do extrato enzimático bruto ( $[U]_{EE} / [ptn]_{EE}$ ), equação 4.

$$FP_S = \frac{\frac{[U]_S}{[ptn]_S}}{\frac{[U]_{EE}}{[ptn]_{EE}}} \quad (4)$$

Já o valor do rendimento da fase (**Y<sub>S</sub>**) é uma maneira de avaliar a eficiência de partição da enzima-alvo a partir da quantidade da enzima presente na fase superior, ou seja, quanto de enzima particionou para a fase superior do sistema considerado ideal para extração. Foi calculado de acordo com a equação 5.

$$Y_S = \frac{[U]_S}{[U]_{EE}} \times 100 \quad (5)$$

Onde  $[U]_S$ , é a atividade total na fase superior e  $[U]_{EE}$  a atividade total no extrato enzimático inicial. Sendo o valor calculado apresentado em porcentagem.

## 6. Delineamentos Experimentais e Análises Estatísticas

### 6.1. Fatorial Completo

Inicialmente, foram realizados experimentos exploratórios para verificar os fatores principais que influenciam a partição da enzima em SAB. Para isto, foi utilizado um delineamento composto central. Este tipo de delineamento constitui-se da combinação adequada dos fatores nos diferentes tratamentos para avaliar efeitos principais dos fatores em estudo (PESSOA-JR, 2005).

O experimento para avaliar quais variáveis são significativas para a partição e seletividade foi feito segundo um delineamento fatorial completo adicionado de 4 pontos centrais para avaliar o erro puro e a falta de ajuste do modelo. Em seguida, utilizou-se a técnica de deslocamento ascendente para encontrar uma região de curvatura e realização de experimentos subsequentes.

O delineamento foi utilizado de forma a determinar a influência do pH, temperatura e as concentrações de PEG e PAS sobre o coeficiente de partição

da  $\beta$ -galactosidase. A Tabela 4 mostra os fatores, assim como os níveis testados nesse delineamento.

**Tabela 4.** Fatores e níveis testados no delineamento Fatorial Completo.

Fator	Nível		
	-1	0	+1
%PEG	10	12	14
%PAS	6,0	8,0	10
pH	7,0	8,0	9,0
Temp (°C)	25	30	35

Em seguida, na tabela 5 seguem os valores utilizados de cada variável na formação dos sistemas utilizados no experimento.

**Tabela 5** – Condições experimentais avaliadas no delineamento Fatorial Completo

pH	NaCl (%)	Temperatura (°C)	% PEG 2000	% PAS 8000
7,0	1	25	10	6
9,0	1	25	10	6
7,0	1	35	10	6
9,0	1	35	10	6
7,0	1	25	10	10
9,0	1	25	10	10
7,0	1	35	10	10
9,0	1	35	10	10
7,0	1	25	14	6
9,0	1	25	14	6
7,0	1	35	14	6
9,0	1	35	14	6
7,0	1	25	14	10
9,0	1	25	14	10
7,0	1	35	14	10
9,0	1	35	14	10
8,0	1	30	12	8
8,0	1	30	12	8
8,0	1	30	12	8
8,0	1	30	12	8

A próxima etapa após verificar quais parâmetros avaliados foram significativos sobre a variável resposta em estudo, outra ferramenta estatística muito eficiente para maioria dos casos estudados foi utilizada, o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), que segundo Rodrigues (2005) é um Delineamento Composto Central que tem pontos axiais definidos, sendo utilizado no experimento com a finalidade de otimizar as condições que levam ao maior coeficiente da variável resposta, neste caso, o coeficiente de partição da  $\beta$ -galactosidase.

Os coeficientes obtidos experimentalmente foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) que, associada a uma análise de superfície de resposta, foi utilizada para visualizar o efeito dos fatores estudados na variável dependente. Todas as análises estatísticas foram feitas no software SAS v.9.

## **7. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **7.1. Avaliação da Partição**

Sistemas aquosos bifásicos (SAB) compostos por PEG 2000 e PAS 8000 foram aplicados para investigar o comportamento de partição e a seletividade da  $\beta$ -galactosidase pura. A mudança da concentração dos reagentes formadores de fases, o pH, a temperatura e a adição de NaCl podem alterar o comportamento de partição de materiais biológicos (ALBERTSSON, 1986) e por isso esses fatores foram sistematicamente estudados.

Os valores médios obtidos para o coeficiente de partição e seletividade utilizando o fatorial completo estão mostrados na Tabela 6.

Como pode ser observado, os coeficientes de partição para a  $\beta$ -galactosidase variaram de 1,02 a 1,45 aproximadamente. Os resultados obtidos experimentalmente foram comparáveis àqueles obtidos por Franco (2002). Tais autores avaliando as características da partição da  $\beta$ -galactosidase em SAB's compostos por PEG 4000 (10% m/m) e Dextrana (8% m/m), pH 8,0 e temperatura de 25 °C encontraram valores para o coeficiente de partição da  $\beta$ -gal próximos a 1,8. Já para seletividade observa-se que os valores encontrados variaram de 0,17 a 0,50. Verificou-se também que os erros provenientes do balanço de massa (equação 8), não excederam aos valores de 15% em relação a quantidade inicial de proteína pura adicionada no sistema,

um erro relativamente baixo para esse tipo de experimento, validando os dados obtidos.

**Tabela 6.** Resultados experimentais obtidos para o coeficiente de partição e seletividade da  $\beta$ -galactosidase empregando um delineamento fatorial completo.

%PEG (%m/m)	%PAS (%m/m)	pH	Temp (°C)	%NaCl (%m/m)	$K_{\beta}$	S	Erro (%)
10%	6%	7	25	1	1,34	0,50	-9,502
14%	6%	7	25	1	1,26	0,49	-4,072
10%	10%	7	25	1	1,20	0,47	-6,787
14%	10%	7	25	1	1,21	0,49	-12,217
10%	6%	9	25	1	1,32	0,17	-11,312
14%	6%	9	25	1	1,41	0,19	4,072
10%	10%	9	25	1	1,28	0,21	-2,262
14%	10%	9	25	1	1,21	0,23	-4,072
10%	6%	7	35	1	1,05	0,37	-10,407
14%	6%	7	35	1	1,14	0,32	-14,027
10%	10%	7	35	1	1,13	0,41	-12,217
14%	10%	7	35	1	1,16	0,35	-6,787
10%	6%	9	35	1	1,39	0,46	-13,122
14%	6%	9	35	1	1,45	0,49	-14,932
10%	10%	9	35	1	1,30	0,48	-12,217
14%	10%	9	35	1	1,32	0,50	-0,140
12%	8%	8	30	1	1,06	0,28	-5,882
12%	8%	8	30	1	1,04	0,30	-5,882
12%	8%	8	30	1	1,04	0,27	-8,597
12%	8%	8	30	1	1,02	0,26	-1,357

$$Erro(\%) = \frac{m_{ad} - m_{qnt}}{m_{ad}} \times 100 \quad (8)$$

Onde  $m_{ad}$  é a massa de proteína inicialmente adicionada no sistema e  $m_{qnt}$  é a soma das massas de proteína quantificadas nas duas fases.

Os resultados apresentados na tabela 6 foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e teste de Fisher para avaliação da significância estatística

dos fatores analisados. Observa-se na Tabela 7 que as concentrações de PEG e PAS afetaram significativamente ao nível de 5% ( $p < 0,05$ ) a partição da  $\beta$ -galactosidase. Portanto, esses fatores foram escolhidos para serem testados em um delineamento central composto rotacional (DCCR).

**Tabela 7.** ANOVA para partição da  $\beta$ -galactosidase

FV	GL	QM	F	Pr > F
PEG	1	9,923	17,11	0,0256
PAS	1	24,01	298,41	0,0004
pH	1	0,810	4,94	0,1128
Temperatura	1	0,003	62,23	0,0776
Falta de ajuste	11	6,606	8,51	0,0534

Os resultados experimentais da Seletividade também foram submetidos à análise de variância como pode ser observado na Tabela 8, sendo essa variável também influenciada significativamente pelas concentrações de PEG e PAS. Portanto, esses fatores também foram escolhidos para serem testados em um delineamento central composto rotacional (DCCR) para a seletividade.

**Tabela 8 -** ANOVA para Seletividade da  $\beta$ -galactosidase.

FV	GL	QM	F	Pr > F
PEG	1	9,923	93,14	0,0012
PAS	1	24,01	145,22	0,0024
pH	1	0,810	0,34	0,5991
Temperatura	1	0,003	2,50	0,2123
Falta de ajuste	11	6,606	32,80	0,0779

A concentração de PEG e de PAS influenciaram de maneira semelhante a partição e a seletividade da  $\beta$ -galactosidase. Em outras palavras, foi observado que o acréscimo na concentração dos polímeros direciona a partição da  $\beta$ -galactosidase para a fase superior, levando ao aumento do seu coeficiente de partição. Inúmeras propriedades físico-químicas do sistema e da proteína podem influenciar o coeficiente de partição (HEMAVATHI 2010). Fatores associados à enzima como: tamanho, composição (estrutura), presença de carga elétrica e hidrofobicidade determinam a sua distribuição nas fases (RAGHAVARAO 2010). Além desses fatores, segundo LOH (2006) existem ainda propriedades importantes das fases que contribuem nesta

distribuição, como por exemplo, a natureza química dos componentes formadores dos SABs; a massa molar e a concentração dos polímeros, a presença de ligantes ao longo da cadeia polimérica que possam interagir especificamente com sítios da proteína, além do pH e temperatura.

Os resultados encontrados no experimento de partição da  $\beta$ -galactosidase podem ser comparados aos trabalhos realizados por Johansson et al. (2008) que ao estudar a partição da proteína GFP (Green Fluorescent Protein) observaram que o aumento na concentração do PEG favorece a migração da proteína para a fase superior rica deste polímero. Além deste trabalho, RAO (2010) ao utilizar o sistema PEG/PAS para particionar ovoalbumina percebeu a preferência da proteína pela fase superior rica em PEG. Segundo Da Silva (2006), esta distribuição desigual da biopartícula, neste caso a  $\beta$ -galactosidase, entre as duas fases é resultante de um intrincado e delicado balanço de interações entre a enzima e as outras espécies (polímeros, H<sub>2</sub>O e/ou sal) presentes nas duas fases que coexistem em equilíbrio. Essas interações buscam promover uma entalpia favorável que pode ser conseguida de duas formas: devido à interação molecular entre a enzima e os componentes de cada fase ou devido à auto-energia das fases. Ou aumentando-se a concentração de PEG, aumentam as interações intermoleculares entre a enzima e o polímero e, assim, mais energia é liberada pelo sistema. Além da questão entálpica, a contribuição entrópica também está relacionada com o coeficiente de partição, explicando o porquê da partição da  $\beta$ -galactosidase para a fase superior no sistema PEG-PAS. Possivelmente, a  $\beta$ -galactosidase ao migrar para a fase superior promove a liberação de moléculas de água que estavam interagindo com o PEG, o que favorece a entropia do sistema, fazendo com que aja preferência da enzima pela fase superior do sistema estudado.

## **7.2. Otimização da Partição**

As concentrações de PEG e PAS foram utilizadas para montar um delineamento central composto rotacional (DCCR) 2<sup>2</sup> adicionado de 4 pontos centrais, sendo apresentados na tabela 9 os resultados experimentais para os valores do coeficiente de partição e seletividade, esses resultados combinados

com à MSR, serviu como ferramenta para se obter a condição ótima para partição da  $\beta$ -galactosidase. Dentre os fatores tidos como não significativos, a temperatura foi fixada em 25°C, já que ela se aproxima da temperatura ambiente, o pH foi fixado em 8,0 porque dentre os valores avaliados foi o que obteve o valor de partição e seletividade levemente superior aos outros estudados, já a concentração de NaCl foi fixada em 1% como durante todo o experimento.

**Tabela 9.** Resultados experimentais obtidos para o coeficiente de partição e seletividade da  $\beta$ -galactosidase em SAB PEG/PAS empregando um DCCR 2<sup>2</sup>.

<b>%PEG</b> (%m/m)	<b>%PAS</b> (%m/m)	<b>K<sub><math>\beta</math></sub></b>	<b>S</b>	<b>Erro (%)</b>
10,5	10	1,46	0,43	-1,35
10,5	14	1,51	0,42	0,45
11,5	10	1,49	0,41	4,97
11,5	14	1,50	0,43	-4,07
10,30	12	1,53	0,41	3,16
11,70	12	1,49	0,45	2,26
11	9,1716	1,42	0,46	-4,97
11	14,82	1,45	0,44	-4,07
11	12	1,56	0,54	1,35
11	12	1,57	0,50	-0,45
11	12	1,56	0,49	4,97
11	12	1,56	0,50	3,07

Como pode ser visto na tabela acima, o coeficiente de partição da  $\beta$ -galactosidase teve valores que variaram de 1,42 a 1,57, sendo o maior valor encontrado no SAB composto de PEG (11%) e PAS (12%). Já para seletividade da  $\beta$ -galactosidase observa-se que os valores variaram de 0,41 a 0,54, sendo que o maior valor da seletividade foi obtido também no SAB composto de PEG (11%) e PAS (12%).

Os valores encontrados de K <sub>$\beta$</sub>  foram superiores aos encontrados por Estela (1999) que ao estudar o coeficiente de partição para  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces Fragilis* em um SAB composto de PEG + Dextrana encontrou

valores médios de 0,7. Já para a seletividade, no mesmo trabalho, foram encontrados valores em torno de 0,63.

Os resultados obtidos por meio do DCCR foram submetidos à ANOVA e análise de regressão para ajustar modelos matemáticos aos dados experimentais obtidos nesse delineamento. Os modelos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e o teste F indicou que os dois fatores testados foram significativos ( $p < 0,05$ ) tanto para a partição da  $\beta$ -galactosidase, quanto para a seletividade. A falta de ajuste do modelo não foi significativa nos dois casos ( $p < 0,05$ ), ou seja, os modelos não apresentaram falta de ajustamento aos dados experimentais a um nível de significância de 5%.

Os modelos obtidos por meio da análise de regressão descrevem a relação entre as variáveis independentes e a variável dependente (coeficiente de partição), levando em conta apenas os termos estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ), ou seja, aqueles termos que exercem um efeito sobre o coeficiente de partição das proteínas ao nível de 5% de probabilidade.

Os modelos que descrevem a relação entre os fatores significativos e a variável dependente, no caso o coeficiente de partição e da seletividade, são mostrados na Eq. 9 para o coeficiente de partição da  $\beta$ -galactosidase e na Eq. 10 para a seletividade.

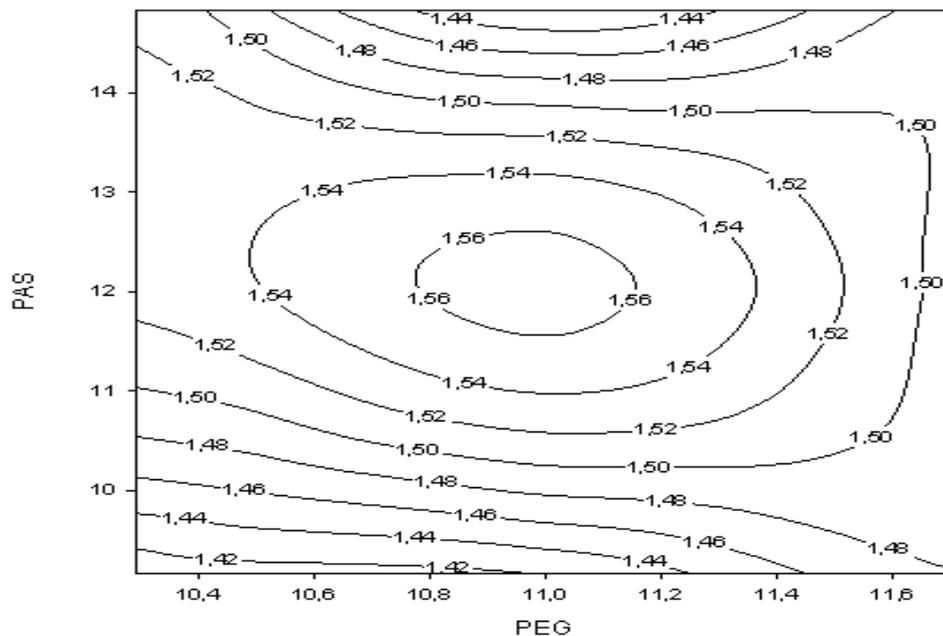
$$K_{\beta} = 13,11 - 0,016x^2 - 0,0881y^2 \quad (9)$$

$$S = -21,05 - 0,011x^2 - 0,1738y^2 \quad (10)$$

onde  $x$  é a concentração de PEG,  $y$  é a concentração de PAS.

Os modelos foram avaliados pelo teste F e ANOVA, confirmando que as regressões são significativas ao nível de 94% de certeza ( $p < 0,05$ ). A avaliação dos modelos foi também feita através da análise do coeficiente de determinação ( $R^2$ ), sendo de 0,83 para o coeficiente de partição, o que é completamente aceitável segundo AZEVEDO (2007), visto que houveram apenas dois fatores significativos. Já para a seletividade o  $R^2$  foi de 0,95, mostrando-se satisfatório.

As Figuras 5 e 6 ilustram o efeito combinado das variáveis independentes sobre o coeficiente de partição da  $\beta$ -galactosidase e da seletividade nos SAB's estudados.

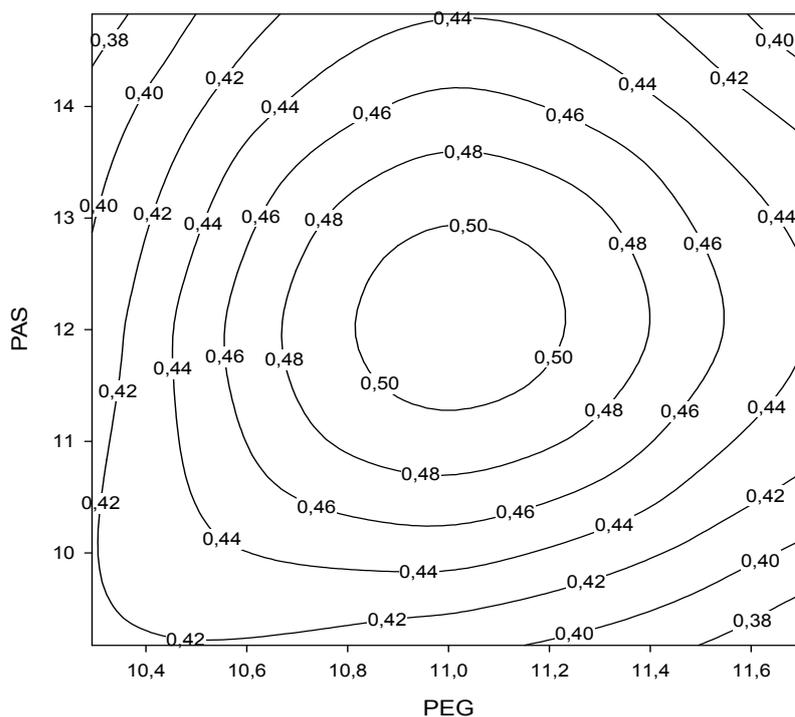


**Figura 5.** Superfície de resposta da partição da  $\beta$ -galactosidase em sistemas PEG/PAS, em pH 8 e a 25°C, em função da concentração de PEG (% m/m) e PAS (% m/m).

Através da visualização do gráfico é possível compreender o comportamento dos parâmetros estudados, onde o coeficiente de partição e seletividade aumentam com elevação na concentração de PEG e PAS.

A curva de nível combinando os fatores significativos foram plotadas sendo encontrada a região de máximo para a partição da  $\beta$ -galactosidase. A Figura 5 mostra que o coeficiente de partição da  $\beta$ -galactosidase aumenta com o aumento das concentrações de PEG e PAS alcançando seu ponto ótimo de 1,56 nas concentrações de 11% e 12% respectivamente.

Em seguida, na Figura 6, nota-se que o maior valor para a seletividade que é de 0,5 é obtido nas concentrações de 11% e 12% de PEG e PAS, sendo essa região considerada ótima também para esse parâmetro.



**Figura 6.** Superfície de resposta da seletividade da  $\beta$ -galactosidase em sistemas PEG/PAS, em pH 8 e a 25°C, em função da concentração de PEG (% m/m) e PAS (% m/m).

As superfícies de resposta permitiram determinar as condições ótimas para obter uma melhor extração da enzima, que são: 11% de PEG, 12% de PAS, pH 8,0, 25°C e 1% de NaCl.

Os resultados encontrados na superfície de resposta no experimento foram similares aos encontrados por HEMAVATHI (2010) que ao estudar a partição da  $\beta$ -galactosidase em sistemas aquosos bifásicos compostos de 14% de PEG e 13% de sulfato de amônio encontrou valores de coeficiente de partição de aproximadamente 1,9. Apresentando um modelo de regressão com o mesmo comportamento encontrado no trabalho desenvolvido, onde apenas as concentrações dos polímeros foram significativas para o coeficiente de partição, e com valor de coeficiente de determinação ( $R^2$ ) para o coeficiente de partição próximo a 80%.

### 7.3. Extração de $\beta$ -galactosidase de extrato enzimático ( Validação do experimento)

Baseado nas condições otimizadas, foi realizado um estudo de extração de  $\beta$ -galactosidase em quatro repetições a partir de um extrato enzimático bruto obtido da fermentação de lactose.

Os valores de coeficiente de partição ( $K_{\beta}$ ), seletividade (S), fator de purificação (FPs) e rendimento (Ys) são apresentados na tabela 10.

**Tabela 10** – Coeficiente de partição, seletividade, fator de purificação e rendimento do extrato enzimático utilizando o sistema PEG/PAS

%PEG (%m/m)	%PAS (%m/m)	pH	Temp (°C)	%NaCl (%m/m)	S	$K_{\beta}$	Y (%)	FP
11	12	8	25	10	0,30	1,23	57,95	5,74
11	12	8	25	10	0,38	1,28	52,81	5,33
11	12	8	25	10	0,27	1,20	54,28	5,17
11	12	8	25	10	0,33	1,23	56,72	5,50

O extrato apresentou comportamento de partição semelhante ao observado para a enzima pura. Ou seja, a enzima migrou para a fase superior do sistema rica em PEG. Comportamento semelhante ao encontrado por HUDDLESTON (2005) ao estudar a partição de proteínas oriundas de *saccharomyces* por sistemas aquosos bifásicos.

Nos valores da tabela pode-se observar que houve uma redução no valor do coeficiente de partição do extrato com relação à enzima pura, o que pode ser justificado segundo LOH (2006) pelo fato de que o extrato, como é acompanhado de outros componentes biológicos, além da enzima, pode alterar o sistema de maneira distinta a enzima pura com relação à contribuição entálpica e entrópica, ou seja, a presença dos outros componentes influencia de forma menos favorável os fatores como interações intermoleculares e entropia organizacional e conformacional, o que faz com que o  $K_{\beta}$  apresente um decréscimo no seu valor.

O fator de purificação foi considerado satisfatório, visto que o valor encontrado foi superior ao encontrado por RAGHAVARAO (2010), que ao estudar um SAB contendo extrato enzimático de  $\beta$  - galactosidase obteve valores de FP de aproximadamente 4,1. Já o valor do rendimento (Y)

conseguido teve resultado semelhante à HEMAVATHI (2011) que ao avaliar o rendimento da partição de  $\beta$ -galactosidase de cevada *Hordeum Vulgare* em um SAB composto por PEG e sulfato de amônio conseguiu valores também em torno de 50%.

De acordo com os valores encontrados para as variáveis  $K_{\beta}$ , FP e Y fica evidenciado o potencial de extração do sistema aquosos bifásico composto por PEG e PAS para partição de  $\beta$ -galactosidase. .

#### **7.4. Influência da Variação da concentração de enzima sobre o $K_{\beta}$ e S e Simulação do SAB com a extração liquido-liquido em fluxo cruzado.**

Após a determinação da condição ótima de extração, experimentos variando a concentração da solução inicial de enzima adicionada ao SAB foram realizados para comprovar a hipótese de que concentrações muito elevadas da solução enzimática inicial resultariam em problemas de precipitação e conseqüente redução nos valores de partição e seletividade. Adicionaram-se a cinco sistemas com a composição considerada adequada para partição, soluções iniciais mais concentradas da enzima, com concentração variando de 10% até 50%, respectivamente, sendo observada elevação do coeficiente de partição, chegando a um valor de aproximadamente  $K_{\beta} = 1,61$  para o sistema contendo a solução com concentração de 30%. Entretanto, logo em seguida, quando adicionadas às soluções de 40 e 50% o valor do coeficiente de partição foi sofrendo uma redução chegando a  $K_{\beta}=1,44$ .

Efeito similar foi observado para a seletividade, visto que houve uma elevação máxima no seu valor para  $S=0,60$  na concentração de 30%, porém, quando foram adicionadas as concentrações 40 e 50% ao sistema esse valor foi decrescendo até alcançar  $S=0,42$ . Acredita-se que para a enzima seja mais favorável entropicamente e/ou entropicamente manter suas moléculas unidas e não particionadas, gerando a precipitação da proteína na interface do sistema, e conseqüentemente a redução nos valores de K e S.

Após essas análises conclui-se que o uso de soluções muito concentradas de enzima, afeta negativamente o comportamento da partição, confirmando a hipótese de que soluções com concentrações elevadas podem gerar problemas e conseqüente perdas no processo de extração em SAB em detrimento da precipitação gerada.

Em seguida, com objetivo de determinar um número de estágios teóricos que seriam necessários para extração da  $\beta$ -galactosidase caso a operação fosse um processo de extração líquido-líquido em fluxo cruzado foi utilizada a equação 11, que é a comumente usada para esse tipo de processo.

$$\frac{X_f}{X_R} = \left(1 + \frac{mS}{nF}\right)^n \quad (11)$$

Onde,

$X_f/X_R$  = taxa de redução

$m = k_\beta$  (Coeficiente de Partição médio)

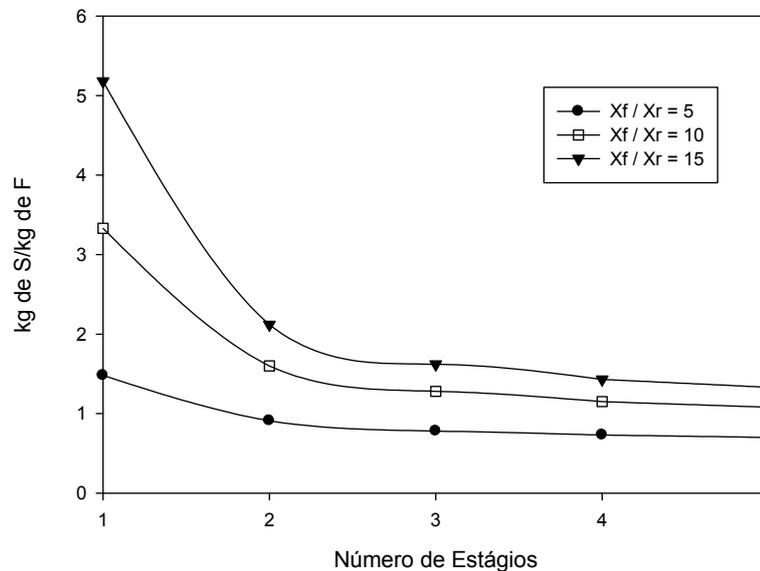
$n$  = número de estágios

$F$  = fluxo de alimentação

$S$  = quantidade de solvente

Foram realizadas simulações nos valores de taxa de redução (5,10 e 15), fluxo de alimentação (100L/h) e quantidade de solvente de 1 até 6 (Kg de S/Kg de F). Já o coeficiente de partição utilizado foi o valor ótimo encontrado a partir da curva de equilíbrio. A partir da substituição desses valores na equação foi possível construir o gráfico que relaciona o requerimento de solvente e o número de estágios, sendo representado na Figura 7.

Gráfico de Fluxo Cruzado



**Figura 7.** Gráfico de Fluxo Cruzado

No gráfico estão plotados os cinco pontos referentes à relação entre o número de estágios e quantidade de solvente por fluxo que seriam utilizados.

A extração líquido-líquido com operação em fluxo cruzado é muito utilizada em operação batelada, com plantas multiproduto de baixa capacidade típicas de indústrias farmacêuticas e agroquímicas, quando poucos estágios são requeridos. Esta operação é econômica e prática, além de oferecer grande flexibilidade (MINIM, 2010). Lembrando que ao se trabalhar com um processo de extração líquido-líquido, o solvente a ser usado não deve ser de caráter tóxico, não ser danoso ao meio ambiente, ter alta seletividade pelo composto a ser extraído e ter alta capacidade de carga do soluto (QUEIROZ, 2005).

## 8. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi estudado o coeficiente de partição da  $\beta$ -galactosidase em SAB's compostos por PEG e PAS. Verificou-se que o sistema estudado é uma ferramenta adequada para a partição da enzima analisada.

A partir de um DCCR aliado a Metodologia de Superfície de Resposta, foram definidas as condições ótimas para a obtenção de uma melhor condição de extração para a  $\beta$ -galactosidase. As condições do sistema foram 11% de PEG, 12% de PAS, 1% de NaCl e pH 8,0 a 25°C, obtendo valores de 1,57 e 0,55 para o coeficiente de partição e seletividade, respectivamente.

Verificou-se os efeitos das variáveis sobre o coeficiente da partição e concluiu-se que apenas as concentrações dos polímeros PEG e PAS afetam de forma significativa a partição da  $\beta$ -galactosidase.

Verificou-se a eficácia do sistema considerado ótimo para extração adicionando um extrato enzimático bruto ao mesmo, e calculando os valores para o coeficiente de partição, seletividade, fator de purificação e rendimento, sendo os valores encontrados considerados satisfatórios afirmando que o sistema pode ser utilizado como uma forma de extração para a enzima estudada.

Ao testar o efeito do aumento na concentração da solução inicial de enzima adicionada ao sistema verificou-se que a elevação na concentração é favorável até certo ponto, devido a problemas relacionados com a precipitação da enzima na interface do sistema.

Com base nas informações obtidas neste trabalho, conclui-se que os sistemas aquosos bifásicos constituídos de PEG/PAS são uma alternativa eficiente e promissora para a extração e purificação da enzima  $\beta$ -galactosidase.

## **Sugestões para trabalhos futuros**

- Adição de um ligante ao PEG para verificar se há melhora no coeficiente de partição
- Estudar a termodinâmica do sistema como forma de confirmar os fatores responsáveis pelos fenômenos de partição.
- Utilizar o sistema considerado ótimo para obter coeficiente de partição da  $\beta$ -galactosidase em diferentes fontes de obtenção da mesma.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABLV. Associação Brasileira de Leite Longa Vida. Leites especiais. Disponível em: <<http://www.ablv.org.br/Index.cfm?fuseaction=longavida>> Acesso em: 25 agosto. 2010.

ABBOTT, N. L.; BLANKSCHTEIN, D.; HATTON, A. T.; *Macromolecules* 1991, 24, 4334.

ABRAHAM DAMIAN GIRALDO ZUÑIGA **sistemas aquosos polietilenoglicol-sal: separação de  $\alpha$ -lactoalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina do soro de queijo e hidrodinâmica em um extrator graesser**. Dissertação de mestrado DTA/ UFV.

AHMAD, A. L., DEREK, C. J. C., ZULKALI, M. M. D., **Optimization of thaumatin extraction by aqueous two phase system (ATPS) using response surface methodology (RMS)**, *Separation and Purification Technology*, 62, 702-708, 2008.

ANDRADE, V. T.; BRANDÃO, S. C. C.; ALVIM, T. C. **Sorvete de doce de leite delactosado**. In: XXI CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 2004, Juiz de Fora. Anais... Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, v. 59, n. 339, p. 126-130, jul.-ago. 2004.

ANDRADE, A.C. de. **Estudo da fermentação simultânea à hidrólise, de soro de queijo, utilizando  $\beta$ -galactosidase e *Saccharomyces cerevisiae***. 2005. 97f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005.

ALBERTSSON, P-A. **Partition of Cell Particles and Macromolecules**, 2<sup>nd</sup> edition, Wiley, New York, 1986.

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

AZEVEDO, A.M., ROSA, P.A.J., FERREIRA, I.F. AND AIRES-BARROS, M.R., 2007, **Chromatography-free recovery of biopharmaceuticals through aqueous two-phase processing**. Trends in Biotechnology.

BATAVO. **Leite Batavo** Sensy baixa lactose. 2004. 2p. Publicidade.

BATISTA, L. **Recovery of proteins from fish waste products by alkaline extaction**. Eur. Food res. Technol., vol. 210, pp. 85-89, 1999.

BEHMER, M. L. A. **Tecnologia do leite: produção, industrialização e análise**, 9 ed. São Paulo: Nobel, 1979. 322p.

BEM-HASSAN, R.M. e GHALY, A.E. **Continuous propagation of *Kluyveromyces fragilis* in cheese whey for pollution potential reduction**. Appl. Biochem. Biotech.,47:89-105, 1994.

BERNARDO RA, MARCONI E, AMINE A and PALLESCHI G (2000), **Rapid determination of lactulose in milk by microdialysis and biosensors**, *Analyst*, **124** 325–329.

BEYER, P.L. **Terapia clínica nutricional para distúrbios do trato gastrointestinal baixo**. In: MAHAN, L.K.; ESCOTT-STUMP, S. (Ed.). Krause alimentos, nutrição & dietoterapia. 10aed. São Paulo: Roca, 2002, p.643-670.

BÓDALO, A.; GÓMEZ, E.; GÓMEZ, J.L.; BASTIDA, J.; MÁXIMO, M.F.; DÍAZ, F. A. **Comparison of Different Methods of  $\beta$ -Galactosidase Immobilization**. Process Biochemistry, v.26, n.6, p.349–353. 1991.

BONEKAMP, F. J.; OOSTEROM, J. **On the safety of *Kluyveromyces lactis* – a review**. Appl Microbiol Biotechnol, 41:1-3, 1994.

BOTTOMLEY, R.C. **Process for obtaining concentrates having a high lactoalbumin content from whey**, US Patent 5,008,376, 1991

BOX, G. E. P. **Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis, and model building**. New York: John Wiley, p. 653, 1978.

BRAMAUD, C., AIMAR, P. e DAVEEE, G. **Whey protein fractionation: Isoelectric precipitation of  $\alpha$ -lactoalbumin under gentle heat treatment.** *Biotechnology and Bioengineering*, 56:391-397, 1997.

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

C.A.S. Silva ; E.E.G. Rojas **Partitioning of glycomacropéptide in aqueous two-phase systems** , 2010.

CAVALCANTI, M.T.H T.S. PORTO, B.B. NETO, J.L. LIMA-FILHO, A.L.F. PORTO, A. PESSOA JR., **Aqueous two-phase systems extraction of toxin from *Clostridium perfringens* type A**, *J. Chromatogr. B* 833 (2006) 135–140.

CAMPBELL, M.K. **Bioquímica**. Porto Alegre: Artmed Editora, 2000. 3a ed. 751p.

CARMINATTI, C.A. **Ensaio de hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana utilizando beta-galactosidase *Kluyveromyces lactis***. 2001. 66f.

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

CHOUAYEKH , C. **PURIFICATION OF CBS 819.72 AMYLASE BY AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEMS: MODELLING USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY** Centre de Biotechnologie de Sfax, Laboratoire d'Enzymes et de Métabolites des Procaryotes, Sfax, Tunisia

Dallora NLP, Klemz JGD, Filho PAP. **Partitioning of model proteins in aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol and ammonium carbamate** *Biochem Eng J* 2007

Dissertação (**Mestrado em Engenharia Química**) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

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

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

CÉSAR AUGUSTO SODRÉ DA SILVA. **Partição do Glicomacropéptido usando sistemas aquosos bifásicos**. Dissertação de mestrado DTA, UFV.

COIMBRA, J. D.; THOMMES, J.; MEIRELLES, A. J. and KULA, M. R. **Performance of a Graesser contactor in the continuous extraction of whey proteins: Mixing, mass transfer and efficiency**. *Bioseparation*. v. 5 p. 259-268, 1995.

COLLEN, A.; WARD, M.; TJERNELD, F.; STALBRAND, H.; **J. Chromatogr., A** 2001, 910, 275.

CHAN, Y.H., SHECK, L.P. QWAK, A.M., LEE, B.W. **Use of hypoallergenic formula in the prevention of atopic disease among Asian Children**, *J. Pediatr. Child Health*, 38, 84–88, 2002.

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

DA SILVA, L. H. M.; DA SILVA, M. C. H.; AQUINO, R. A. N.; FRANCISCO, K. R.; CARDOSO, M. V. C.; MINIM, L. A. and COIMBRA, J. S. R. **Nitroprusside-PEO enthalpic interaction as a driving force for partitioning of the  $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]_2^-$  anion in aqueous two-phase systems formed by poly(ethylene oxide) and sulfate salts**. *J. Phys. Chem. B*, v. 110, p. 23540-23546, 2006.

DISTLER, J. J.; JOURDIAN, G. W. **The purification and properties of  $\beta$ -galactosidase from bovine tests**. The Journal of Biological Chemistry, v. 248, n. 19, p 6772-6780, 1973.

DURING, M. J.; XU, R.; YOUNG, D.; KAPLITT, M. G.; SHERWIN, R. S.; LEONE, P. **Peroral gene therapy of lactose intolerance using an adeno-associated virus vector**. Nature Medicine, v. 4, p.1131-1135, 1998.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de alimentos**, 2 ed. São Paulo: Atheneu, 1998. 652p.

ESKIN, N.A.M. **Biochemistry of Foods**. 2 ed. New York: Academic, 1990. 557p.

FARIAS, F.F.; FAGUNDES NETO, U. **Intolerância aos carboidratos**. The Electronic Journal of Pediatric, v. 8, n. 3, dec 2004. Disponível em: <http://www.egastroped.com.br/dec04/intolerancia.htm>. Acesso em: 27 fev. 2007.

FARRUGGIA, B.; NERLI, B.; PICO, G.; J. Chromatogr., *B: Anal. Technol Biomed. Life Sci.* 2003, 798, 25.

FERREIRA, C. L. L. F. Valor **nutritivo e bioterapêutico de leites fermentados**. In: LERAYER, A. L. S.; SALVA, T. J. G. **Leites fermentados e bebidas lácteas: tecnologia e mercado**. Campinas: ITAL, 1997, cap. 1, p. 1-7.

FORCINITI, D., HALL, C. K., KULA, M. R., **Analysis of polymer molecular weight distributions in aqueous two-phase systems**, Journal of Chromatography, 20, 151-162, 1991.

FOSUM, E. **Nutritional evaluation of whey protein concentrates and their fractions**, J. Dairy Sci., 57, 665-670, 1973.

GOURSAUD, J. **O leite de vaca: composição e propriedades físico-químicas**. In: LUQUET, F. M. **O leite: do úbere à fábrica de laticínios**. Portugal: Publicações Europa-America Lda, 1985, v.1, parte 1, cap. 1, p. 31-56.

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

GUNAWAN, E. R., BASRI, M., ABD RAHMAN, M.B., SALLEH, A.B., ABD RAHMAN, R.N.Z. **Study on response surface methodology (RSM) of lipase-catalyzed synthesis of palm-based wax esters.** Enzym. Microb. Technol. 37, 739–744, 2005.

GRASSELLI, M., NAVARRO, A., FERNADEZ, H.L., MIRANDA, M.V.,CAMPERI, Y. e CASCONI, O. **Que hacer con el suero de queso.** Ciencia Hoy, 43,1997.

HAMEED, B. H., I. A. W. TAN and A. L. AHMAD. **Preparation of oil palm empty fruit bunch-based activated carbon for removal of 2,4,6-trichlorophenol: Optimization using response surface methodology.** J. Hazardous Mater., vol. 164: p. 1316-1324, 2009.

HANEMAAIJER, J.H. **Microfiltration in whey processing.** Desalination, 53:143-155, 1985.

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

HARRIS, E.L.L **Protein purification methods: a practical approach.** Nova York, Oxford (2001)

HEMAVATHI,K.S. M.S. RAGHAVARAO **Differential partitioning of  $\beta$  - galactosidase and  $\beta$ -glucosidase using aqueous two phase extraction,** Process Biochemistry. 2010.

HICHEM CHOUAYEKH. **Purification of amylase by aqueous two-phase systems:** 2009

HOBMAN, P.G. **Review of Process and Products for Utilization of Lactose in Deproteinated Milk Serum.** Journal of Dairy Science, v.67, n.11, p.2630–2653. 1984.

INAHORA-OCHIAI, M.; NAKAYAMA, T.; NAKAO, M.; FUJITA, T.; UEDA, T.; ASHIKARI, T.; NISHINO, T.; SHIBANO, Y. **Unique primary structure of a thermostable multimetal Beta-galactosidase from *Saccharopolyspora rectivirgula***. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1388:77-83, 1998.

JOHANSSON, H.O. G. KARLSTROM, F. TJERNELD, C. HAYNES, J. *Chromatogr. B* 711 (2008).

RABELO A.P.B., E.B. TAMBOURGI, A. PESSOA JR., **Bromelain partitioning in two-phase aqueous systems containing PEO-PPO-PEO block copolymers**, *J. Chromatogr. B* 807 (2005) 61–68.

RADHOUANE KAMMOUN\*, HICHEM CHOUAYEKH **Purification of CBS 819.72-amylase by aqueous two-phase systems: Modelling using Response Surface Methodology**, 2009

KIESNER, C., CLAWIN-RADECKER, I., MEISEL, H., BUCHHEIM, W. **Manufacturing of  $\alpha$ -lactalbumin-enriched whey systems by selective thermal treatment in combination with membrane processes**, *Lait*, 80, 99–111, 2000.

KIESNER, C., CLAWIN-RADECKER, I., MEISEL, H., BUCHHEIM, W. **Manufacturing of  $\alpha$ -lactalbumin-enriched whey systems by selective thermal treatment in combination with membrane processes**, *Lait*, 80, 99–111, 2000.

KIRKPATRICK, K. J.; FENWICK, R. M. **Manufacture and general properties of dairy ingredients**. *Food Technology*, v. 41, n. 10, p. 58-65, Oct. 1987.

KOCIÁN, J. **Lactose intolerance – minireview**. *International Journal Biochemistry*, v. 20, n. 1, p.1-5, 1988.

KULIKOVA, A. K.; GOMARTELI, M. M.; TSERETELI, A. K.; BEZBORODOV, A.M.; KVESITADZE, G. I.; BILAI, T. I. **-galactosidase of lower eukaryotes (fungi and yeasts)** (review)1990.

KRISTIANSEN, K.R., OTTE, J., IPSEN, R., QVIST, K.B. **Large-scale preparation of  $\beta$ -lactoglobulin A and B by ultrafiltration and ion-exchange chromatography**, *Int. Dairy J.*, 8, 113–118, 1998.

LESSOF, M.H. **Alergia e intolerancia a los alimentos**. Zaragoza: Acribia S.A., 1996.218p..

Lehninger, A.L.; Nelson, D.L.; Cox, M.M. (1993). **Principles of Biochemistry**. Worth Publishers, New York.

LIMA, U.A., AQUARONE, E., BORZANI, W., SCHMIDELL, W., **Biotechnologia Industrial**, vol. 3, Editora Edgard Blucher Ltda, 2001.

LONGO, G. **Influência da adição de  $\beta$ -galactosidase na produção de iogurtes**. 2006. 89f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

L. s. Martinez; 1Alunos do DQ/FURG Professores do DQ/FURG Departamento de Química - Fundação Universidade Federal de Rio Grande 2-Gisele Duque Bernardes de Sousa<sup>1</sup>, Líbia Diniz Santos Marquez<sup>1</sup> e Eloízio Júlio Ribeiro<sup>1</sup>

MACEDO, N. L. T. **Leites fermentados: iogurtes e bebidas lácteas**. Juiz de Fora: EPAMIG/CT/ILCT, 2003.

MAHONEY, R. R. (1997). **Lactose: enzymatic modification**. In: FOX, P.F.(Ed.).**Advanced Dairy Chemistry. Vol. 3: Lactose, water, salts and vitamins**. London: Chapman & Hall, p. 77-125.

MANAN, D.M.A.; ADB KARIM, A.; KIT, W.K. **Lactose Content of Modified Enzymetreated “Dadih”**. *Food Chemistry*, v.65, n.4, p.439–443. 1999.

MARIA ESTELA DA SILVA<sup>1</sup>; TELMA TEIXEIRA FRANCO<sup>2</sup> **Purification of microbial  $\beta$  -galactosidase from *kluveromyces fragilis* by bioaffinity partitioning** *Revista de Microbiologia* (1999)

MINAMI, N.M., **Extração Líquido-Líquido aplicada à separação e purificação da amiloglicosidase**, São Paulo, 1997, 190p., Universidade de São Paulo, Dissertação de Mestrado.

MORIWAKI, C.; MATIOLI, G. **Influência de J-galactosidase na tecnologia do leite e na má digestão da lactose.** Arquivos de Ciência da Saúde da Unipar, v. 4, n. 3, p. 283-290, set.-dez. 2000.

L.H.M. da Silva, M.D.H. da Silva, J.A. Junior, J.P. Martins, J.S.R. Coimbra, L.A. Minim, **Sep. Purif. Technol.** 60 (2008)

MATEUS, N. B., BARBIN, D., CANAGIN, A. **Viabilidade de uso do delineamento composto central.** Acta Scientiarum, Maringá, Vol. 23, n. 6, pag. 1537-1546, 2001.

MATIOLI, G.; ENDO, A.S.; MORAES, F.F.; ZANIN, G.M. **Beta-Galactosidase de Kluyveromyces fragilis: estabilidade operacional.** In: 10º Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 1994. Anais. 1994. p. 1308-1311.

MERCK. Disponível em: <http://chemdat.merck.de>, abril, 2008.

MEZZAROBA, L.F.H. CARVALHO, J.E., PONEZI, A.N., ANTÔNIO, M.A., MONTEIRO, K.M., POSSENTI, A., SGARBIERI, V.C. **Antiulcerative Properties of Bovine  $\alpha$ -Lactalbumin.** International Dairy Journal, 16,1005-1012, 2006.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA. **Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade de Leite Tipo A, Leite Tipo B, Leite Tipo C, Leite Pasteurizado e Leite Cru Refrigerado.** Aprovado pela Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Brasília-DF, 2002.

MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments**, 6th ed.; John Wiley & Sons, Inc.: New York, 2005.

MONTIPÓ, R.B. **Determinação do ponto de congelamento do leite bovino "in natura" da bacia leiteira de Santa Maria-RS.** 1992. 244f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1992.

MOOR, C. e HA, E.W. **Whey protein concentrates and isolates processes and functional properties.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* Columbus, 33(6):431-476, 1993.

MULLER, A., CHAUFER, B., MERIN, U., DAUFIN, G. **Purification of  $\alpha$ -lactalbumin from prepurified acid whey: ultrafiltration or precipitation,** *Lait*, 83,439–451, 2003.

MÜLLER, E. E. **Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite.** In: Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil, 29-30 de agosto de 2002, Toledo-PR. Anais do II Sul- Leite. Maringá: UEM/CCA/DZO NUPEL, 2002. 212p. p. 206-217.

MUTHIAH P. **Synergistic extraction of bovine serum albumin using polyethylene glycol based aqueous biphasic system.** (2011)

MYERS R. H.; MONTGOMERY. D. C. **Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments.** Canada: John Wiley & Sons. 1995.

OBÓN, J. M.; CASTELLAR, M. R.; IBORRA, J. L.; MANJÓN, A.  **$\beta$ -Galactosidase immobilization for milk lactose hydrolysis: a simple experimental and modeling study of batch and continuous reactors.** *Biochemical Education*, v. 28, p. 164-168, 2000.

OLIVEIRA, C.C.M. de. **Produção de beta-galactosidase por levedura recombinante Desenvolvimento de um sistema de produção estável.** 2005. 100f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade do Minho, Braga, 2005.

ORNELLAS, L. H. **Técnica Dietética: seleção e preparo de alimentos.** São Paulo: Atheneu, 1995, 6a ed. 320p.

PESSOA-JR, A., KILIKIAN, B. V. **Purificação de Produtos Biotecnológicos.** Editora Manole Ltda, Sao Paulo, 2005.

PERUMALSAMY M. **Synergistic extraction of bovine serum albumin using polyethylene glycol based aqueous biphasic system** Chemical Engineering Department, National Institute of Technology, Tiruchirappalli, India

PEREIRA, V.A.L. **Dissertação de mestrado**, Universidade Federal de Viçosa, 2008.

PETRUS, J.C.C. **Hidrólise da Lactose em Reator a Membrana**. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes. v.1, p.17–19. 1990.

POULIOT, Y., WIJERS, M.C., GAHTHIER, S.F., NADEAU, L. **Fractionation of whey protein hydrolysates using charged UG/NF membranes**. J. Membr. Sci., 158, 105–114, 1999.

QUEIROZ, C.N. **Métodos de Extração líquido-líquido em compostos biológicos**, Unicamp, 2005.

Rao, J. R. T. Murugesanb, B. U. Nair, and T. Ramasami. **partition of tannerywastewater proteins in aqueous two-phase poly (ethylene glycol)-magnesium sulfate systems: effects of molecular weights and pH**. chemical engineering science

RAMASAMI T. **Aqueous two-phase poly(ethylene glycol)–poly(acrylic acid) system for rotein partitioning: Influence of molecular weight, pH and temperature**

RENNER, E. **Milk Dairy Products in Human Nutrition**, Volkswirtsch Verlag, Munchen, 1983

RICHMOND, M. L.; GRAY, J. I.; STINE, M. **Beta-galactosidase: Review of recent research related to technological application, nutritional concerns, and immobilization**. Journal Dairy Science, 64:759-1771, 1981.

X.R. Xia, N.A. Monteiro-Riviere, J.E. Riviere, J. Chromatogr. A 1129 (2006)

RODRIGUES, M. I., IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos**. 1ª ed. Campinas - SP, 2005.

ROGERS, L., MAUBOIS, J.L., BRULE, G., PIOT, M. **Process for obtaining an  $\alpha$ -lactoalbumin enriched product from whey, and uses thereof, US Patent.**

SALABAT, A. **The influence of salts on the phase composition in aqueous two-phase systems: experiments and predictions.** Fluid Phase Equilibria, v. 187–188, p. 489–498, 2001.

SANTIAGO, P.A. et al. **Estudo da produção de  $\beta$ -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 24, n. 4, p.567-572, out.-dez. 2004.

SANTOS, A.; LADERO, M.; GARCÍA-OCHOA, F. **Kinetic Modeling of Lactose Hydrolysis by a  $\beta$ -Galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*.** Enzyme and Microbial Technology, v.22, n.7, p.558–567. 1998.

SARAVANAN, J.Rao. **Aqueous two-phase poly(ethylene glycol)–poly(acrylic acid) system for protein partitioning: Influence of molecular weight, pH and temperature.** 2010

SARUBBO, L.A. A.L.F. PORTO, G.M. CAMPOS-TAKAKI, AND E.B. TAMBOURGI. **Partition of trypsin in aqueous two-phase systems of poly(ethylene glycol) and cashew-nut tree gum.** Process Biochemistry 38 (2000) 693-699.

SCHLIMME, E.; BUCHHEIM, W. **La leche y sus componentes: Propiedades químicas y físicas.** Zaragoza: Acribia S.A., 2002. 121p.

SCHMIDELL W. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e enzimáticos.** (2001)

SCHMIDT, A.S.; VENTOM A.M.; ASENJO J.A. **Partitioning and purification of alpha-amylase in aqueous two-phase systems.** Enzyme Microb. Technol., 16(2), 131-142.

SCOPES, R.K. **Protein Purification: principles and practice.** 2. ed. New York, Springer Verlag, 1994, 329 p.

SELBER, K.; TJERNELD, F.; COLLEN, A.; HYYTIA, T.; NAKARI-SETALA, T.; BAILEY, M.; FAGERSTROM, R.; KAN, J.; VAN DER LAAN, J.; PENTTILA, M.; KULA, M. R.; **Process Biochem.** 2004, 39, 889

SPELZINI, D. **Features of the acid protease partition in aqueous two-phase systems of polyethylene glycol-phosphate: Chymosin and pepsin**. Physical Chemistry Department, Faculty of Biochemical and Pharmaceutical Sciences, CONICET, CIUNR and FonCyT, National University of Rosario, S 2002 RLK Rosario, Argentina April 2005

SHAH, N. P.; FEDORAK, R.N.; JELEN, P. J. **Food consistency effects of quarg in lactose malabsorption.** International Dairy Journal, n. 2, p. 257-269, 1992.

SHUKLA, T. P.  **$\beta$ -Galactosidase technology: a solution to the lactose problem.** Critical Reviews in Food Technology, v. 1, p. 325-356. 1985.

SILVA, D.O.; CARDOSO, V.L. **Hidrólise da lactose do soro de queijo**

SOMKUTI, G. A.; HOLSINGER, V. H. **Microbial technologies in the production of low-lactose dairy foods.** Food Science and Technology International, 3:163-169, 1997.

SPG. Sociedade Portuguesa de Gastrenterologia. **O que é? Intolerância ao leite.** Disponível em: <<http://www.spg.pt>>. Acesso em: 26 Ago. 2010.

SUENAGA, C. I. et al. **Intolerância à lactose.** UNIFESP: Escola Paulista de Medicina. Disponível em: <<http://www.virtual.epm.br/material/tis>>, 2003.

THURLKILL RL, GRIMSLEY GR, SCHOLTZ JM, PACE CN (2006) **Hydrogen bonding markedly reduces the pK of buried carboxyl groups in proteins,** J Mol Biol. 362, 594-604

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

TÉO, C. R. P. A. **Intolerância à lactose: uma breve revisão para o cuidado nutricional.** Arq. Ciênc. Saúde Unipar, v. 6, n. 3, p. 135-140, set./dez. 2002.

TRINDADE, I.P. M.M. DIOGO, D.M.F. PRAZERES, J.C. MARCOS, **Purification of plasmid DNA vectors by aqueous two-phase extraction and hydrophobic interaction chromatography,** J. Chromatogr. A 1082 (2005) 176–184.

TRONCO, V.M. **Manual para inspeção da qualidade do leite.** Santa Maria: Ed. Da UFSM, 2003. 192 p.

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

UCHIDA, Y., SHIMATANI, M.M., MITSUHASHI, T. e KOUTAKE, M. **Process for preparing a fraction having a high content of  $\alpha$ -lactoalbumin from whey and nutritional compositions containing such fractions,** US Patent 5,503,864, 1996.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA – Faculdade de Engenharia Química 3- Gustavo Paiva Ribeiro<sup>1</sup> , Fernanda Ferreira Freitas<sup>1</sup> e Eloízio Júlio Ribeiro<sup>1</sup>, Universidade Federal de Uberlândia – Engenharia Química - **IMOBILIZAÇÃO DE  $\beta$ -GALACTOSIDASE DE *Aspergillus oryzae* EM ALGINATO DE SÓDIO.**

VALSECHI, O. **Tecnologia de produtos agrícolas de origem animal: o leite e seus derivados.** Araras – SP: UFSCar, Centro de Ciências Agrárias, 2001. 36p. Apostila digitada.

VELEDO, M.T., FUENTES, M., DIEZ-MASA, J.C. **Analysis of trace amounts of bovine  $\beta$ -lactoglobulin in infant formulas by capillary electrophoresis with on capillary derivatization and laser-induced fluorescence detection,** J. Sep. Sci. 28, 941–947, 2005.

VESA, T.H.; MARTEAU, P.; KORPELA, R. **Lactose intolerance.** Journal of the American College of Nutrition, v. 19, n. 90002, 165S-175S, 2000.

VINHAL, E.F. **Hidrólise da lactose no leite por [-galactosidase de Kluyveromyces fragilis**. 2001. 100f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2001.

VRESE, M.de et al. **Probiotics – compensation for  $\beta$ -galactosidase insufficiency**. American Journal of Clinical Nutrition, v. 73, n. 2, 421S-429s, 2001.

WABISZCZEWICZ A.C. **Tese de Doutorado Faculdade de Engenharia Química Engenharia Química.- 2006-UNICAMP**.

Wu,C. **Whey treatment process for achieving high concentration of  $\alpha$ -lactalbumin**, US Patent 6,312,755 B1, 2001.

W. ZHI, J. SONG, F. OUYANG, J. BI, **Application of response surface methodology to the modeling of  $\alpha$ -amylase purification by aqueous two-phase systems**.

ZADOW, J.G. Lactose – **Properties and Uses**. Journal of Dairy Science, v.67, n.11, p.2654–2679. 1984.

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