

ESTUDO DA PARTIÇÃO DA α -LACTOALBUMINA EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS COMPOSTOS POR POLIETILENO GLICOL E CITRATO DE SÓDIO

Rafael de Araújo Lira¹, Fabíola Cristina Oliveira², Jane Selia Reis Coimbra³, Rosana Moura de Oliveira⁴, Abraham Damian Giraldo Zuniga⁵

¹ Professor do Instituto Federal de Matogrosso, Campus de Confresa.

^{2 e 4} Doutorando em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Av. P.H. Rolfs s/n, 36570-000, Viçosa, MG, Brasil

³ Professora do Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Av. P.H. Rolfs s/n, 36570-000, Viçosa, MG, Brasil

⁵ Professor Fundação Universidade Federal do Tocantins, Palmas – Brasil
(abraham@uft.edu.br)

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo estudar a partição da α -lactoalbumina utilizando SABs compostos por polietileno glicol (PEG) (1500 g.mol^{-1}) e citrato de sódio, sendo avaliado o efeito da concentração de PEG e sal, em diferentes temperaturas (5 a 45 °C). Os sistemas foram preparados pela adição de quantidades apropriadas de água, proteína, citrato de sódio e solução estoque de PEG 1500 (50% em massa), com valor de pH próximo de 8,0. A concentração da proteína, em cada fase, foi determinada por espectrofotometria na região do Ultravioleta a 280 nm. Para estudar a partição das proteínas nos sistemas preparados foi utilizada uma medida numérica de referência para a composição das fases. Esta medida se refere ao valor do comprimento da linha de amarração (TLL), sendo determinada pela diferença de concentração dos componentes do sistema em cada fase. Os resultados mostraram que a TLL tem um efeito sobre o coeficiente de partição da α -lactoalbumina. Foi observado que em todas as temperaturas estudadas o aumento da TLL resultou num aumento do coeficiente da proteína. O sistema provou ser eficiente e economicamente viável para a separação de α -lactoalbumina do soro de queijo, e que é possível concentrar a mesma na fase superior.

PALAVRAS CHAVE: α -lactoalbumina, coeficiente de partição, sistemas aquosos bifásicos

PARTITION OF α -LACTOALBUMIN IN AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEMS CONTAINING POLYETHYLENE GLYCOL AND SODIUM CITRATE

ABSTRACT

The goal of this work was the study of α -lactoalbumin partition in aqueous two-phase systems (SABs) containing polyethylene glycol (PEG) (1500 g.mol^{-1}) and sodium citrate, evaluating the effect of PEG and salt concentration at different temperatures (5 to 45) °C. Systems were prepared by addition of appropriate amounts of water, protein, sodium citrate and stock aqueous solutions of PEG 1500 with mass fraction of 50 %, with a pH value close to 8.0. Protein concentration in each phase was determined by spectrophotometry in the ultraviolet area at 280 nm. The study of the partition of the proteins in the prepared systems was made by a numeric measure of reference used for the composition of the phases. It is referred to the value of the tie

line length (TLL), being determined by the difference of concentration of the components of the system in the phases. Results showed the TLL effect in the α -lactoalbumin partition coefficient. It was observed in all the temperatures studied that an increase in TLL promoted an increase in protein partition coefficient. The system proved to be efficient and economically viable for the separation of α -lactoalbumina from whey cheese, and that it is possible to concentrate it in the upper phase.

KEYWORDS: α -lactoalbumin, partitioning, aqueous-two phase systems

INTRODUÇÃO

O soro do leite é um subproduto resultante da fabricação de queijos, possuindo alto valor nutricional, conferido pela presença de proteínas com elevado teor de aminoácidos essenciais. Além das propriedades nutricionais, as proteínas do soro do leite são muito conhecidas pela versatilidade de suas propriedades funcionais tecnológicas como ingredientes em produtos alimentícios, principalmente por sua elevada solubilidade e capacidade de geleificação (CAPITANI et al., 2005). Recentemente, têm sido atribuídas às proteínas do soro propriedades funcionais fisiológicas, capazes de produzir um importante controle na modulação do metabolismo e nos mecanismos de defesa dos organismos animal e humano (SGARBIERI & PACHECO, 1999; MICKE et al., 2002; ROSANELI et al., 2002). Entre as principais proteínas presentes no soro, a α -lactoalbumina (α -la), correspondendo a 19% do total de proteínas (ZUNIGA, 2000).

A α -la é uma proteína do soro de leite apropriada para preparação de diversos alimentos por possuir abundantes aminoácidos essenciais como o triptofano que é o mais abundante nessa proteína, representando, aproximadamente, 6% (BRAMAUD et al., 1997; FERREIRA, 2001). A partir da α -la são obtidos peptídeos que contêm o triptofano, precursores da serotonina, uma substância que regula a vigília e o sono (GRASSELLI et al., 1997; FERREIRA, 2001), porém os métodos de separação dessa proteína ainda necessitam ser melhores desenvolvidos. O ponto isoelétrico da α -la é de 5,1, sendo esta facilmente desnaturada em pH 6,7, à temperatura de 65,2 °C (MORR e HA, 1993). Uma das técnicas de separação que vem sendo utilizada para separação de macromoléculas desta natureza são os Sistemas Aquosos Bifásicos (SABs) (MACHADO, 1999; ZUÑIGA, 2000; ROJAS, 2001; ZUÑIGA, 2003; MONTEIRO, 2005; DE OLIVEIRA, 2006).

Os SABs são formados por espécies químicas que, quando misturadas em determinadas faixas de composição e temperatura dividem-se em duas fases com composições diferentes, sendo a água o componente majoritário destes sistemas, favorecendo a estabilidade das biomoléculas durante a separação (ALBERTSSON, 1986). Soluções aquosas de polímeros formam sistemas bifásicos com sais inorgânicos, ou com outros polímeros hidrofílicos estruturalmente diferentes, possuindo assim um grande emprego em biotecnologia para separação e purificação de biomaterias (ZASLAVSKY, 1995).

Estes sistemas possuem baixas viscosidade e tensão superficial e densidade próxima a da água, mostrando-se então, como ambientes mais suaves para biocompostos (como proteínas, enzimas e células), quando comparados aos sistemas tradicionais de extração, que são baseados em solventes orgânicos.

Outras vantagens destes sistemas são o curto tempo de processamento e o fácil aumento de escala (COIMBRA, 1998).

Estudos recentes mostram que a distribuição das proteínas é função de diversos fatores como: massa molar do polímero, concentração dos polímeros, potencial hidrogeniônico (pH), espécies iônicas, grupos hidrofóbicos e temperatura (SILVA, 2000; MADEIRA, 2005; FARAVASH, 2007; ALVES, 2000; SILVA, 2001; ROSA, 2007; GAUTAM, 2006).

Neste trabalho foi estudada a partição da α -lactoalbumina utilizando SABs compostos por polietileno glicol (PEG) (1500 g.mol^{-1}) e citrato de sódio, sendo avaliado o efeito da concentração de PEG e sal, em diferentes temperaturas (5 a 45) °C.

MATERIAL E MÉTODOS

Materiais

Os reagentes utilizados foram polietileno glicol de massa molar de 1500 g.mol^{-1} , (Sigma, USA), citrato de sódio (Vetec, Brasil) e α -lactoalbumina (Daviisco Foods International, USA), todos de grau analítico. Água deionizada obtida em um equipamento Milli-Q System (Millipore, USA) foi utilizada em todo experimento. Os reagentes foram utilizados sem maiores purificações.

Preparação dos sistemas

Os sistemas aquosos bifásicos foram preparados pela adição de quantidades apropriadas de água, proteína, citrato de sódio e solução estoque de PEG 1500 (50 % em massa) em um tubo de centrifuga até a obtenção de 40 g de mistura. A massa de proteína em cada sistema foi de 15 mg, sendo a última a ser adicionada ao sistema. Tais sistemas apresentaram pH próximo de 8,0 (Digimed DM-20 pHmetro, Brasil). Para garantir uma completa homogeneização do sistema, esse foi agitado manualmente por cerca de cinco minutos e deixado em um banho termostático (Tecnal TE-184, Brasil) de acordo com a temperatura trabalho (5, 10, 25, 35 e 45) °C, por 14 h, garantido dessa forma a condição de equilíbrio. Em seguida, a mistura foi centrifugada (Eppendorf AG-5804 Centrifuge, Alemanha) a 2880 g por 10 min, à temperatura ambiente. As fases superior e inferior foram cuidadosamente retiradas com auxílio de seringas, deixando uma camada de cinco mm de espessura acima da interface.

Análise de proteínas

A concentração da proteína, em cada fase, foi determinada por espectrofotometria na região do Ultravioleta a 280 nm (Espectrofotômetro Cary 50 - Varian, Austrália). Foi construída, previamente, uma curva analítica. O branco foi composto por uma amostra idêntica de cada fase, porém sem proteína. As quantificações do teor protéico foram conduzidas em duplicatas.

Coeficiente de partição

O coeficiente de partição das proteínas foi calculado utilizando a equação (1):

$$K = \frac{C_s}{C_I} \quad (1)$$

Onde K é o coeficiente de partição da proteína, e C_s e C_i são, respectivamente, as concentrações da proteína nas fases superior e inferior.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para estudar a partição das proteínas nos diferentes sistemas preparados foi utilizada uma medida numérica de referência para a composição das fases. Esta medida se refere ao valor do comprimento da linha de amarração (TLL), e é determinado pela diferença de concentração dos componentes do sistema em cada fase (CARVALHO, 2004; DE OLIVEIRA, 2006). O TLL é expresso em porcentagem e é calculado de acordo com a equação (2):

$$\%TLL = \sqrt{(C_{PEG}^S - C_{PEG}^I)^2 + (C_{sal}^S - C_{sal}^I)^2} \times 100 \quad (2)$$

Onde C_{PEG}^S e C_{PEG}^I são as porcentagens em massa de PEG na fase superior e inferior, e C_{sal}^S e C_{sal}^I são as porcentagens em massa de sal na fase superior e inferior, respectivamente. A Tabela 1 apresenta os valores do coeficiente de partição da alfa em função da TLL em diferentes temperaturas.

TABELA 1. Dados da partição da α -lactoalbumina em sistemas aquosos bifásicos formados por PEG 1500 e citrato de sódio.

Temperatura (°C)	PEG (% em massa)	Sal (% em massa)	TLL (% em massa)	K
5	12,03	15,09	23,14	1,70
	14,01	16,80	31,51	2,82
	16,02	18,31	38,83	7,64
10	14,02	13,87	34,60	1,75
	16,03	15,26	40,55	2,45
	18,04	16,17	44,76	6,26
25	14,02	14,89	28,91	1,98
	16,01	16,09	39,22	3,76
	18,02	17,29	42,15	20,03
35	14,04	14,55	32,85	1,81
	16,01	15,46	38,50	3,36
	18,03	16,77	45,10	18,61
45	14,01	14,93	33,78	2,55
	16,00	15,61	37,50	5,86
	18,00	16,83	43,46	28,24

Como pode ser observado na Tabela 1 o coeficiente de partição da α -lactoalbumina foi maior que um ($K > 1$) significando que uma grande quantidade desta proteína migrou para a fase superior. O comportamento da partição de proteínas em PEG/sal SABs provavelmente é dependente da hidrofobicidade da proteína. Proteínas com maiores aminoácidos apolares irão mostrar uma alta afinidade pela fase polimérica, que é mais hidrofóbica que a fase salina (ROJAS, 2004). Além

disso, de acordo com a Tabela 1, a TLL tem um efeito sobre o coeficiente de partição da α -lactoalbumina.

Na Figura 1 observa-se que em todas as temperaturas estudadas o aumento da TLL resultou num aumento do coeficiente da proteína, ou seja, com a elevação dos teores de sal e PEG no sistema, a proteína foi concentrada na fase superior (fase polimérica). Esse comportamento pode ser explicado, em parte, pelo efeito *salting out*, ou seja, com o aumento do conteúdo de sal no sistema, a proteína tende a se tornar mais insolúvel na fase salina e mais solúvel na fase polimérica.

Em geral, altas concentrações de sal provocam alterações na tensão superficial da água. Os sais da série Hofmeister são conhecidos por afetarem a tensão superficial da água e assim a solubilidade das proteínas. Os cátions e ânions da série Hofmeister, são: $\text{NH}_4^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+ > \text{Mg}^{+2} > \text{Ca}^{+2}$ e citrato > fosfato > tartarato > sulfato > acetato > cloreto > nitrato > brometo (NELSON et al., 1962). Os primeiros íons de cada série (catiônica e aniônica) rompem a estrutura da água, aumentando a tensão superficial e diminuindo a solubilidade das moléculas não polares (efeito *salting out*). Com aumento da concentração do sal, ocorre também, desidratação da proteína.

De acordo com Boaglio et al. (2006), a variação da TLL afeta o volume livre disponível para um diferente soluto se acomodar em uma determinada fase. A adição de PEG ao sistema tem influência sobre o volume específico das fases. O aumento da concentração de PEG praticamente não altera o volume específico da fase superior, enquanto o volume específico da fase inferior decresce rapidamente. Conseqüentemente, as moléculas disponíveis de água para solvatação do soluto na fase inferior diminuem e a proteína alcança sua solubilidade limite, sendo forçada a particionar para a fase superior (RODRIGUES, 2001). Além disso, CHEN (1992) verificou que a partição de dipeptídeos contendo triptofano é favorecida fortemente para a fase superior, rica em PEG, em sistemas contendo PEG-sal. De acordo com o mesmo autor, o triptofano representa cerca de 5,2 mols % do conteúdo total de aminoácidos da α -lactoalbumina.

Como pode ser observado na Figura 1, a temperatura também influencia nos valores de K da proteína, sendo estes valores maiores em temperaturas mais elevadas. O efeito da temperatura pode está associado a mudança na composição das fases, já que a elevação da temperatura causa um aumento da concentração de PEG na fase superior e diminui a concentração deste na fase inferior (CARVALHO, 2004). A redução da concentração de PEG na fase inferior está associada ao efeito *salting out*, que se torna mais forte quando se eleva a temperatura (GAUTAM, 2006), favorecendo a migração da proteína para a fase superior.

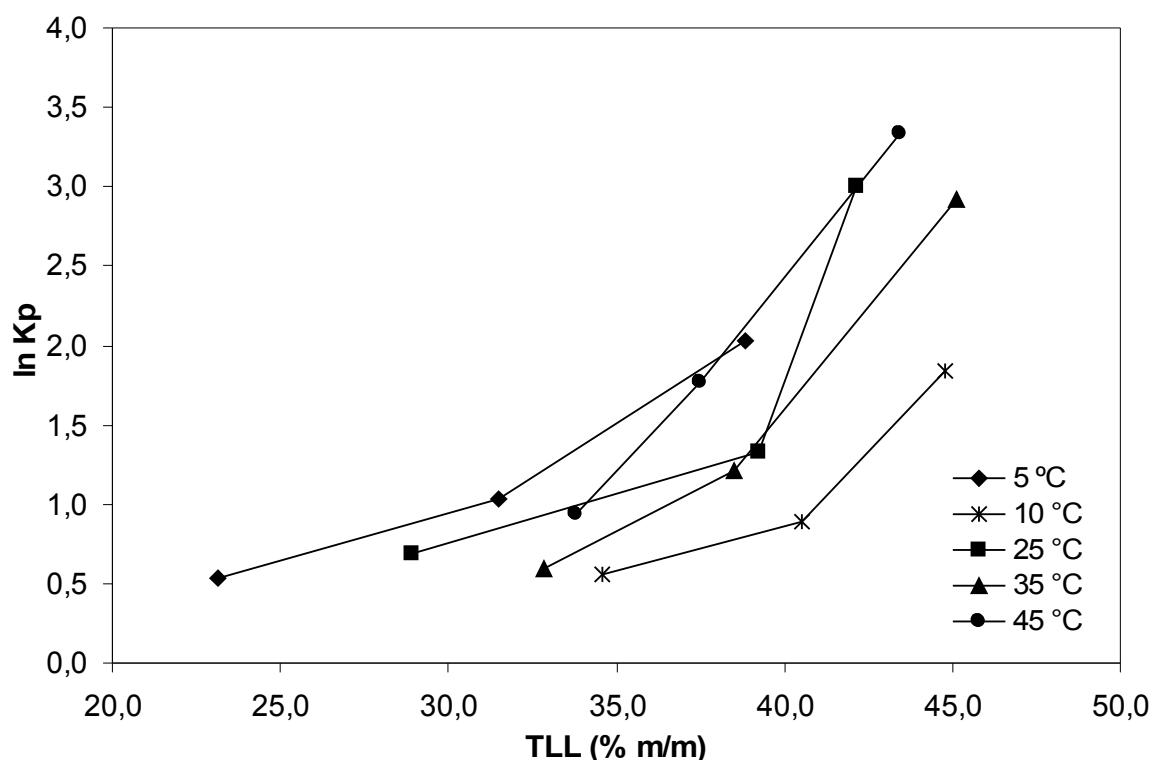


FIGURA 1. Influência do TLL e da temperatura sobre o coeficiente de partição da α -lactoalbumina.

CONCLUSÃO

Sistemas aquosos formados por PEG e Citrato de Sódio provaram ser um sistema eficiente e economicamente viável para a separação de alfa-lactoalbumina do soro de queijo, sendo mostrado que é possível concentrar a mesma na fase superior do sistema.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

BOAGLIO A., BASSANI G., PICO G., et al. Features of the milk whey protein partitioning in polyethyleneglycol-sodium citrate aqueous two-phase systems with the goal of isolating human alpha-1 antitrypsin expressed in bovine milk **Journal Of**

Chromatography B-Analytical Technologies In The Biomedical And Life Sciences. v. 837 n.1-2, p.18-23, jun 2006.

BRAMAUD, C., AIMAR, P., DAVEEE, G. Whey protein fractionation: Isoelectric precipitation of α -lactalbumin under gentle heat treatment. **Biotechnology and Bioengineering**, v.56, n.3, p.391-397, 1997.

CAPITANI C. D.et al. Recuperação de proteínas do soro de leite por meio de coacervação com polissacarídeo. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.40, n.11, p.1123-1128, nov. 2005

CARVALHO, C.P., **Estudo do Equilíbrio de fases para sistemas aquosos bifásicos compostos por polietileno glicol, sais e água.** 2004. Dissertação (Mestrado): Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

CHEN J. P. Partitioning and separation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in PEG/potassium phosphate ATPS. **J. Ferm. Bioeng.** v. 73, p.140, 1992.

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

DE OLIVEIRA, R. M. **Equilíbrio de fases de sistemas aquosos bifásicos compostos por polietilenoglicol, sulfato de zinco, sulfato de cobre e citrato de sódio sob diferentes temperaturas.** 2006. Dissertação (Mestrado): Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

FARAVASH, R. S.; MODARRES, H.; NASERNEJAD, B. Structural and Partitioning studies of Bovine Serum Albumin in mixture of (poly(ethylene glycol) + K_2HPO_4 + H_2O). **J. Chem. Eng. Data**, v. 52, n. 1, p.71 – 76, 2007.

FERREIRA, R. C. **Separação de α -lactoalbumina e β -lactoglobulina de Proteínas de Soro de Queijo por Adsorção em Colunas de leito Fixo.** 2001. Dissertação (Mestrado): Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

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

GRASSELLI, M., NAVARRO, A., FERNANDEZ, H. L., MIRANDA, M. V., CAMPERI, I., OSVALDO CASCONI. Que hacer com el suero de queso. **Ciencia Hoy**, v.43, n.1, p.27-35, 1997.

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

MACHADO, F. L. C. **Equilíbrio de Fases para Sistemas Aquosos Bifásicos (SAB) Compostos por Polietileno Glicol – Maltodextrina – Água**. 1999. Dissertação (Mestrado): Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

MICKE, P.; BEEH, K.M.; BUHL, R. Effects of long-term supplementation with whey proteins on plasma glutathione levels of HIV-infected patients. **European Journal of Nutrition**, v.41, p.12-18, 2002.

MONTEIRO, P. S. **Partição de α -lactoalbumina e β -lactoglobulina por extração no ponto de névoa em sistemas bifásicos contendo copolímeros triblocos**. 2005. Dissertação (Mestrado): Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

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

NELSON, C. A.; HUMMEL, J. P.; SWENSON, C. A.; FRIEDMANS, L. Stabilization of Pancreatic Ribonuclease against Urea Denaturation by Anion Binding. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 237, p.1575-1580, 1962.

RODRIGUES LR, VENANCIO A, TEIXEIRA JA Partitioning and separation of alpha-lactoalbumin and beta-lactoglobulin in polyethylene glycol/ammonium sulphate aqueous two-phase systems. **Biotechnology Letters**, v. 23, n. 22, p. 1893-1897, 2001

ROJAS E. E. G.; COIMBRA J. S. R., MINIM L. A.; et al. Size-exclusion chromatography applied to the purification of whey proteins from the polymeric and saline phases of aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**, v. 39, n.11, p. 1751-1759, julho 2004.

ROJAS, E. E. G. **Separação e Purificação de α -Lactoalbumina e β -Lactoglobulina pela Cromatografia por Exclusão Molecular após a Extração com Sistemas Aquosos Bifásicos**. 2001. Dissertação (Mestrado): Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

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

ROSANELI, C.F.; BIGHETTI, A.E.; ANTÔNIO, M.A.; et al.. Efficacy of a whey protein concentrate on the inhibition of stomach ulcerative lesions caused by ethanol ingestion. **Journal of Medicinal Food**, v.5, p.221-228, 2002.

SGARBIERI, V.C.; PACHECO, M.T.B. Alimentos funcionais fisiológicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.2, p.7-19, 1999.

SILVA, L. H. M.; MEIRELLES, A. J. A. Phase equilibrium and protein partitioning in aqueous mixtures of maltodextrin with poly (propylene glycol). **Carbohydrate Polymers**, v. 46, p. 267–274, 2001.

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

ZASLAVSKY, B. Y. **Aqueous two-phase system**. New York, 1995.

ZUNIGA, A. D. G. **Sistemas aquosos polietilenoglicol-sal: Separação de α -lactoalbumina e β -lactoglobulina do soro de queijo e hidrodinâmica em um extrator Graesser**. 2000. 78 f. Dissertação (Mestrado): Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

ZUNIGA, A. D. G. **Estratégia de purificação das proteínas alfa-Lactoalbumina e beta-lactoglobulina do soro de queijo**. 2003. Tese (Doutorado): Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.