



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

PAULA LUCIANA RODRIGUES DE SOUSA

**NOVAS ESTRATÉGIAS CROMATOGRÁFICAS VISANDO A RECUPERAÇÃO E
PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DO SORO DE SANGUE HUMANO E DO LEITE
BOVINO**

FORTALEZA

2019

PAULA LUCIANA RODRIGUES DE SOUSA

NOVAS ESTRATÉGIAS CROMATOGRÁFICAS VISANDO A RECUPERAÇÃO E
PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DO SORO DE SANGUE HUMANO E DO LEITE
BOVINO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientador: Prof. Dr. Ivanildo José da Silva Júnior

Coorientador: Prof. Dr. Diego Romão Gondim.

Coorientadora: Prof^a. Dra. Diana Cristina Silva de Azevedo.

FORTALEZA

2019

-
- S698n Sousa, Paula Luciana Rodrigues de.
Novas estratégias cromatográficas visando a recuperação e purificação de proteínas do soro de sangue humano e do leite bovino / Paula Luciana Rodrigues de Sousa. – 2019.
141 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2019.
Orientação: Prof. Dr. Ivanildo José da Silva Júnior.
Coorientação: Profª. Dra. Diana Cristina Silva de Azevedo.
1. Capto MMC. 2. Multimodal. 3. Leite expandido. 4. Proteínas do soro do leite. I. Título.
- CDD 660
-

PAULA LUCIANA RODRIGUES DE SOUSA

NOVAS ESTRATÉGIAS CROMATOGRÁFICAS VISANDO A RECUPERAÇÃO E
PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DO SORO DE SANGUE HUMANO E DO LEITE
BOVINO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada em: 12/03/2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ivanildo José da Silva Júnior (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Francisco Murilo Tavares de Luna
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Everaldo Silvino dos Santos
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

Dra. Jouciane de Sousa Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Micael de Andrade Lima
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais, José de Paula e Marta Maria.

AGRADECIMENTOS

À FUNCAP, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

À Fundação Núcleo de tecnologia Industrial do Ceará (NUTEC) por todo o suporte, disponibilidade e auxílio com minha pesquisa.

Ao Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, em especial ao Prof. Everaldo Silvino dos Santos, pela gentileza em abrir as portas do laboratório mais uma vez para mim. Obrigada por toda a contribuição em minha vida acadêmica.

Ao Prof. Dr. Ivanildo José da Silva Júnior, pela oportunidade, confiança e apoio ao longo do doutorado.

Aos Prof. Dr. Diego Romão Gondim pela disponibilidade e por todas as contribuições durante todo o doutorado.

Aos professores participantes da banca examinadora, Dra. Jouciane de Sousa Silva, Dr. Micael de Andrade Lima, Prof. Dr. Francisco Murilo Tavares de Luna e Prof. Dr. Everaldo Silvino dos Santos pelas valiosas colaborações e sugestões.

Aos amigos do LAPS&C (Luno, Larissa, Tiago, Bruna, Darlyson, Natália, Jéssica Cunha, Jéssica Martins, Érika Maria, Isabele), obrigado por todo o apoio, pelas risadas, por tornar tudo mais leve, obrigado pelo ombro amigo. Vocês moram no meu coração.

A todos meus IC's durante o doutorado (Pedro Augusto, Íkaro Gabriel, Jéssica Cunha e Érika Maria), muito obrigada pelo suporte nas pesquisas e por me ajudarem a ser uma pessoa mais humana na área profissional.

Aos amigos Rubens Carius, Damiclea, Sérgio Dantas, Chaguinha, Daniele Souza e Aline por toda ajuda com minha pesquisa, sem vocês não teria conseguido.

Ao Seu Luís, que na sua simplicidade, tanto me ensinou. Obrigada por todo apoio. Sua contribuição foi muito mais que limpar o laboratório. Pessoa de poucas palavras, mas que sempre as usa da maneira correta.

A todas (os) minhas amigas (os) Kekas (Telma, Tânia, Elma, Eciane, Germana e Camila); do, para sempre, cafofo cearense (Angelinne, Fran, Sérgio); da turma UFC (Luciana, Sanyelle, Lucélia, Fran e Karine); da Comunidade Católica Face de Cristo (Juliana, Marcela, Yane, Milena, Camila, Natalya, Filipe, Flávia, Cleiton, Diegão, Henrique, Luiza, Nathalie, Davi, Eugênia, Cabral, Mônica, Nágila, Aauto, Regina) por arrancarem sorrisos em momentos que não conseguia, pelo incentivo e por acreditarem em mim quando eu mesma

não acreditava. Obrigado pelo ombro amigo, por todas as orações e por serem instrumentos de Deus na minha vida.

A toda minha família, meus avós (Maria, Euzinda e João), tios e tias (Nazinha, Fátima, Manoel Neto, Antonia, Titoin), primos e primas (Emanuely, Ana Cláudia, Cláudio, Júnior, Vanklane), irmãos (Paulo Gleisson, Daiana, Glauciane, Paulo Ricardo, João Alfredo, Fernando e Fernanda), sobrinhos e sobrinhas (Layane, Ana Livia, Cecília Maria, Pedro Conrado e José Arthur).

Um agradecimento todo especial aos meus pais José de Paula e Marta Maria por todo amor, incentivo, conselhos, por compreenderem minha ausência, por tudo o que fizeram para que eu pudesse chegar até aqui. Todo o meu amor e minha eterna gratidão a vocês.

A Deus, por me mostrar que posso ser muito mais do que imagino. Por me manter de pé em todos os momentos, por todos os anjos que colocastes no meu caminho. Sem ti, Senhor, nada disso seria possível. Toda honra e toda glória sejam dadas a Ti.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

Moléculas abundantes na natureza, as proteínas podem ser utilizadas para diversas finalidades, como nas áreas da saúde, alimentícia, têxtil, cosmética, dentre outras. Com isso, a indústria destes setores tem buscado processos mais eficientes para obtenção de proteínas na forma purificada. Nesse contexto, o presente trabalho tem por finalidade investigar o uso das resinas multimodal Capto MMC, troca iônica *Streamline* SP, *Streamline* DEAE e hidrofóbica *Phenyl Sepharose* em processos de purificação das proteínas dos soros sanguíneo humano e do leite bovino. Para isso foram realizados Planejamentos composto central para obtenção das condições de adsorção e eluição com a proteína padrão de Imunoglobulina G (IgG), as quais foram reproduzidas com amostras de soro do sangue humano. Em paralelo, as condições de adsorção e eluição da BSA foram obtidas através de novos Planejamentos composto central. Para ambas as proteínas, IgG e BSA, foram avaliados os parâmetros pH, C_t (concentração do tampão) e C_{sal} (concentração de NaCl no tampão). Um pré-tratamento foi realizado nas amostras de soro do leite bovino para remoção das impurezas e concentração das proteínas, viabilizando sua análise em leito fixo. As amostras de soro do leite bovino foram avaliadas através de um Planejamento fatorial com repetição no ponto central, onde foram verificados os efeitos dos parâmetros pH_{ads} (pH de adsorção) pH_{elu} (pH de eluição) e t_{elu} (tempo de eluição). As condições obtidas foram aplicadas nas resinas de troca iônica *Streamline* SP e DEAE em leito expandido e a de interação hidrofóbica *Phenyl Sepharose* em leito fixo para verificar a eficiência destas interações quando utilizadas separadamente. As proteínas foram quantificadas por Bradford e sua separação analisadas por Eletroforese SDS-PAGE em condições não redutoras. Os ensaios com as proteínas IgG e BSA mostraram que a resina multimodal Capto MMC apresentou alta capacidade de adsorção, obtendo 549,2 e 380,16 mg/g, respectivamente. Os modelos do delineamento se mostraram significativos. Quanto a eluição, embora os modelos do delineamento não tenham sido significativos, as condições com melhor desempenho na eluição da IgG, quando reproduzidos em amostras de soro humano obteve excelente resultado, uma vez que conseguiu recuperar na etapa de eluição somente IgG e HSA, removendo os demais interferentes que se encontram no soro humano. No que se refere as amostras de soro do leite bovino, os resultados do delineamento apontam que, nas condições trabalhadas, a resina Capto MMC apresenta maior seletividade pelas proteínas BSA (66 kDa) e o dímero da β -lactoglobulina (30 kDa). Nos ensaios em leito expandido, verificou-se que nas condições trabalhadas, o uso combinado das resinas de troca iônica *Streamline* SP e DEAE mostraram seletividade para a proteína β -Lg (18 kDa). Todavia, a proteína β -Lg (18 kDa) só foi obtida isolada quando empregada a sequência das resinas *Streamline* SP e *Phenyl Sepharose*. Assim, verificou-se que as interações de troca iônica e hidrofóbica tornaram-se mais eficientes nos processos de purificação das proteínas do soro do leite bovino quando utilizadas separadamente. Porém, nas condições trabalhadas, o uso da resina Capto MMC mostrou seletividade pelas proteínas BSA e o dímero da β -Lg, sendo capaz de remover interferentes presentes nas matrizes estudadas.

Palavras-chave: Capto MMC. Multimodal. Leito expandido. Proteínas do soro do leite.

ABSTRACT

Proteins are abundant molecules in nature and can be used for several purposes, in fields such as health, food, textiles, cosmetics, among others. Thus, the industry of these sectors has sought more efficient processes to obtain proteins in the purified form. In this context, the present work aims to investigate the use of the Capto MMC multimodal resins, Streamline SP ion exchange, Streamline DEAE and hydrophobic Phenyl Sepharose in the purification processes of proteins from human blood and bovine milk serum. Therefore, experimental designs were carried out to obtain the conditions of adsorption and elution with IgG standard proteins, which were reproduced in human serum samples. In parallel, the BSA adsorption and elution conditions were obtained through new experimental designs. In the IgG and BSA delineations, the pH, C_t and C_{sal} parameters were evaluated. A pretreatment was carried out on bovine milk serum samples to remove impurities and protein concentration, making it possible to analyze them in fixed bed. Serum samples from bovine milk were evaluated through a new experimental design, where the effects of pH_{ads} , pH_{elu} and T_{elu} parameters were verified. The obtained experimental conditions were applied in the ion exchange resins Streamline SP and DEAE in expanded bed. The resin with hydrophobic interaction Phenyl Sepharose was studied in fixed bed to verify the efficiency of these interactions when used separately. Proteins were quantified by Bradford and their separation analyzed by SDS-PAGE electrophoresis under non-reducing conditions. Assays with IgG and BSA proteins showed that the Capto MMC multimodal resin presented high adsorption capacity, obtaining 549.2 and 380.16 $mg \cdot g^{-1}$, respectively. The design models were significant. As for the elution, although the design models were not significant, the conditions with better IgG elution performance when reproduced in human serum samples obtained excellent results, as it was able to recover only IgG and HSA in the elution step, removing other contaminants found in human serum. In the case of bovine milk serum samples, the results showed that, Capto MMC resin presented high selectivity for BSA proteins (66 kDa) and β -Lg (30 kDa) dimer. In the expanded bed assays, the combined use of the Streamline SP and DEAE ion exchange resins showed selectivity for the β -Lg (18 kDa) protein under the conditions worked. However, β -Lg protein (18 kDa) was only isolated when used in the Streamline SP and Phenyl Sepharose sequence. Thus, it was found that ion exchange and hydrophobic interactions became more efficient in the purification processes of bovine milk whey proteins when used separately. However, the use of Capto MMC resin showed selectivity for proteins BSA and β -Lg dimer, being able to remove contaminants in the studied matrixes.

Keywords: Capto MMC. Multimodal. Expanded bed. Bovine Milk serum.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Efeito dos íons da série de Hofmeister.....	30
Figura 2 – Estrutura do adsorvente Capto MMC.....	40
Figura 3 – Etapas de operação do sistema de leito expandido.....	44
Figura 4 – Estrutura espacial da Imunoglobulina G.....	47
Figura 5 – Estrutura espacial da HSA.....	48
Figura 6 – Estrutura tridimensional da α -lactoalbumina.....	54
Figura 7 – Estrutura tridimensional da β -lactoglobulina.....	55
Figura 8 – Fluxograma experimental para os ensaios de purificação da IgG.....	61
Figura 9 – Sistema de agitação rotatório empregado para os ensaios de adsorção em batelada.....	62
Figura 10 – Sistema operacional em leito fixo composto por: 01: Alimentação; 02: Bomba peristáltica; 03: Coluna; 04: Coletor de frações.....	65
Figura 11 – Fluxograma experimental para os ensaios de adsorção e eluição da BSA na resina Capto MMC.....	67
Figura 12 – Fluxograma experimental dos ensaios de purificação das proteínas do soro do leite bovino em leito fixo com na resina Capto MMC.....	70
Figura 13 – Sistema FPLC – Contichrom (do inglês <i>Fast Protein Liquid Chromatographic</i>).....	73
Figura 14 – Fluxograma experimental dos ensaios em leito expandido com amostras de soro do leite bovino.....	74
Figura 15 – Diagrama de Pareto para a etapa de adsorção da IgG.....	79
Figura 16 – Relação das variáveis na etapa de adsorção da IgG: A) pH x C_t com C_{sal} no ponto central (0.5 M); B) pH x C_{sal} com C_{sal} no ponto central (0.5); C) C_t x C_{sal} com pH no ponto central (6.75).....	81
Figura 17 – Perfis cinéticos de adsorção da IgG nas concentrações de A) 1 mg/mL, B) 2 mg/mL e C) 3 mg/mL preparada em tampão fosfato 60 mM, pH 6,75,	82

utilizando a Capto MMC como resina.....	
Figura 18 – Isoterma de adsorção com soluções de IgG partindo das concentrações iniciais de 0,5 a 6,0 mg/mL preparadas em tampão fosfato (60 mM, pH 6,75) à 23 °C e ajuste do modelo de Langmuir (linha vermelha).....	83
Figura 19 – Diagrama de Pareto para a etapa de eluição da IgG.....	86
Figura 20 – Relação das variáveis na etapa de eluição da IgG: A) pH x C_t com C_{sal} no ponto central (0.5 M); B) pH x C_{sal} com C_{sal} no ponto central (0.5); C) C_t x C_{sal} com pH no ponto central (6.75).....	87
Figura 21 – A) Perfil cromatográfico e B) eletroforese revelada com Comassie Blue da amostra de soro de sangue humano na concentração de 5 mg/mL a uma vazão de 0,8 mL/min. Condições operacionais: Adsorção: Tampão fosfato (60 mM pH 6,75); Eluição: Tampão acetato (56,4 mM, pH 5,2) + NaCl 0,2 M. Etapas cromatográficas: I: Alimentação; II: Lavagem; III: Eluição; IV: Regeneração; V: Reequilíbrio. Pontos coletados: 01: Adsorção; 02: Eluição; 03: Regeneração. Pontos do gel de eletroforese: HMW: Padrão de alta massa molecular; F: amostra de soro de sangue humano; 01: Adsorção; 02: Eluição; 03: Regeneração; HSA: Albumina do soro humano; IgG: Imunoglobulina do tipo G.....	89
Figura 22 – Diagrama de Pareto para o estudo de adsorção da BSA em Capto MMC.....	91
Figura 23 – Superfície de resposta para as variáveis: A) pH e C_t com C_{sal} (0,9 M) no ponto central; B) pH e C_{sal} com C_t no ponto central (60,00 mM); C) C_t e C_{sal} com pH no ponto central (5,00) para adsorção da BSA com fixa no ponto central.....	92
Figura 24 – Perfis cinéticos de adsorção da BSA nas concentrações de A) 1 mg/mL, B) 2 mg/mL e C) 3 mg/mL preparada em tampão Acetato (40 mM, pH 4,8) + NaCl 0,5 M, utilizando a Capto MMC como resina.....	93
Figura 25 – Isoterma de adsorção da BSA partindo das concentrações iniciais de 0,5 a 7,0 mg/mL, preparadas em tampão acetato de sódio 40 mM, pH 4,8 + NaCl 0,5 M e ajuste do modelo de Langmuir (linha vermelha).....	95
Figura 26 – Diagrama de Pareto para a etapa de eluição da BSA.....	97

Figura 27 – Relação das variáveis A) pH e C_t , com a C_{Sal} no ponto central (1 M); B) pH e C_{sal} , com a C_t no ponto central (35 mM); C) C_t e C_{Sal} , com o pH no ponto central (7,5), para o percentual de recuperação da BSA na etapa de eluição.....	98
Figura 28 – Precipitação de 500 mL da amostra de soro do leite bovino com sulfato de amônio a 50 (A) e 80% (B).....	100
Figura 29 – Eletroforese das amostras de soro do leite bovino precipitadas com sulfato de amônio A) 50% e B) 80% e dialisadas em membrana de diálise 10 kDa (25 mm X 30 cm). LMW: Padrão de baixa massa molecular; 01: 10:20; 02: 15:15; 03: 20:10; 04: 25:5; BSA: Albumina do Soro Bovino.....	100
Figura 30 – Diagrama de Pareto para o estudo de separação das proteínas do soro bovino em leito fixo utilizando a resina Cpto MMC.....	103
Figura 31 – Relação dos parâmetros: A) pH_{ads} e pH_{elu} com o T_{elu} fixo no ponto central (20 min); B) pH_{ads} e T_{elu} (min) com o pH_{elu} fixo no ponto central (6,75); C) pH_{elu} e T_{elu} (min) com o pH_{ads} fixo no ponto central (4,8) no percentual de recuperação de proteína na etapa de eluição.....	104
Figura 32 – A) Ensaio cromatográfico e B) eletroforese revelada com nitrato de prata da amostra de Soro do leite bovino precipitada com sulfato de amônio 80%, dialisada em membrana de 10 kDa (25 mm X 30 cm) e liofilizada na concentração de 0,45 mg/mL. Condições do ensaio 2: pH de adsorção 4,4; pH de eluição 6,0; tempo de eluição de 25 min. Etapas cromatográficas: I: Equilíbrio; II: Alimentação; III: Lavagem; IV: Eluição; V: Regeneração; VI: Reequilíbrio. Pontos dos géis de eletroforese: LMW: Padrão de baixa massa molecular; F: amostra de soro de soro do leite bovino após precipitação com sulfato de amônio 80%, diálise e liofilização; 01: Lavagem; 02: 1º ponto da Eluição; 03: 2º ponto Eluição; 04: 1º ponto da Regeneração; 05: 2º ponto da Regeneração; BSA: Padrão de Albumina do Soro Bovino.....	105
Figura 33 – A) Ensaio cromatográfico e B) eletroforese revelada com nitrato de prata da amostra de Soro do leite bovino precipitada com sulfato de amônio 80%, dialisada em membrana de 10 kDa (25 mm X 30 cm) e liofilizada na	107

concentração de 0,45 mg/mL. Condições ensaio 5: pH de adsorção 5,2; pH de eluição 6,0; tempo de eluição de 15 min. Etapas cromatográficas: **I**: Equilíbrio; **II**: Alimentação; **III**: Lavagem; **IV**: Eluição; **V**: Regeneração; **VI**: Reequilíbrio. Pontos dos géis de eletroforese: **LMW**: Padrão de baixa massa molecular; **F**: amostra de soro de soro do leite bovino após precipitação com sulfato de amônio 80%, diálise e liofilização; **01**: Lavagem; **02**: 1º ponto da Eluição; **03**: 2º ponto Eluição; **04**: Regeneração; **BSA**: Albumina do Soro Bovino.....

Figura 34 – **A)** Ensaio cromatográfico e **B)** eletroforese revelada com nitrato de prata da amostra de Soro do leite bovino precipitada com sulfato de amônio 80%, dialisada em membrana de 10 kDa (25 mm X 30 cm) e liofilizada na concentração de 0,45 mg/mL. Condições do ensaio 06: pH de adsorção 5,2; pH de eluição 6,0; tempo de eluição de 25 min. Etapas cromatográficas: **I**: Equilíbrio; **II**: Alimentação; **III**: Lavagem; **IV**: Eluição; **V**: Regeneração; **VI**: Reequilíbrio. Pontos dos géis de eletroforese: **LMW**: Padrão de baixa massa molecular; **F**: amostra de soro de soro do leite bovino após precipitação com sulfato de amônio 80%, diálise e liofilização; **01**: Lavagem; **02**: 1º ponto da Eluição; **03**: 2º ponto Eluição; **04**: Regeneração; **BSA**: Albumina do Soro Bovino..... 109

Figura 35 – **A)** Ensaio cromatográfico e **B)** eletroforese revelada com nitrato de prata da amostra de Soro do leite bovino precipitada com sulfato de amônio 80%, dialisada em membrana de 10 kDa (25 mm X 30 cm) e liofilizada na concentração de 0,45 mg/mL. Condições do ensaio 08: pH de adsorção 5,2; pH de eluição 7,5; tempo de eluição de 25 min. Etapas cromatográficas: **I**: Equilíbrio; **II**: Alimentação; **III**: Lavagem; **IV**: Eluição; **V**: Regeneração; **VI**: Reequilíbrio. Pontos dos géis de eletroforese: **LMW**: Padrão de baixa massa molecular; **F**: amostra de soro de soro do leite bovino após precipitação com sulfato de amônio 80%, diálise e liofilização; **01**: Lavagem; **02**: 1º ponto da Eluição; **03**: 2º ponto Eluição; **04**: 1º ponto da Regeneração; **05**: 2º ponto da Regeneração; **BSA**: Albumina do Soro Bovino..... 111

Figura 36 – **A)** Ensaio cromatográfico e **B)** eletroforese revelada com nitrato de prata 113

da amostra de Soro do leite bovino precipitada com sulfato de amônio 80%, dialisada em membrana de 10 kDa (25 mm X 30 cm) e liofilizada na concentração de 0,45 mg/mL. Condições do ensaio 09: pH de adsorção 4,8; pH de eluição 6,75; tempo de eluição de 20 min. Etapas cromatográficas: **I**: Equilíbrio; **II**: Alimentação; **III**: Lavagem; **IV**: Eluição; **V**: Regeneração; **VI**: Reequilíbrio. Pontos dos géis de eletroforese: **LMW**: Padrão de baixa massa molecular; **F**: amostra de soro de soro do leite bovino após precipitação com sulfato de amônio 80%, diálise e liofilização; **01**: Lavagem; **02**: 1º ponto da Eluição; **03**: 2º ponto Eluição; **04**: Regeneração; **BSA**: Albumina do Soro Bovino.....

- Figura 37 – Perfil da Capto MMC em sistema de fluidização..... 115
- Figura 38 – Perfil do Grau de Expansão para a resina *Streamline SP* em tampão fosfato 40 mM pH 7,5 em função da velocidade de fluxo. $H_0 = 5,2$ cm..... 116
- Figura 39 – **A)** Ensaio cromatográfico e **B)** eletroforese revelada com nitrato de prata da amostra de Soro do leite bovino na resina *Streamline SP*. Adsorção: tampão acetato 40 mM pH 5,2; Eluição: Tampão fosfato (40 mM, pH 7,5) com gradiente decrescente de NaCl (1 – 0 M). **LMW**: Padrão de baixa massa molecular; **F**: amostra de soro de soro do leite bovino *in natura*; **01**: Passante; **02**: 1º ponto da Eluição; **03**: 2º ponto Eluição; **04**: 1º ponto da Regeneração; **05**: 2º ponto da Regeneração..... 117
- Figura 40 – **A)** Ensaio cromatográfico e **B)** eletroforese revelada com nitrato de prata da amostra de Soro do leite bovino na resina *Streamline SP*. Adsorção: tampão Fosfato de Sódio (40 mM, pH 7,5); Eluição: tampão Fosfato de Sódio (40 mM, pH 7,5) + NaCl (1 M). **LMW**: Padrão de baixa massa molecular; **F**: amostra de soro de soro do leite bovino *in natura*; **01**: 1º ponto do Passante; **02**: 2º ponto do Passante; **03**: Eluição; **04**: Regeneração..... 119
- Figura 41 – **A)** Ensaio cromatográfico e **B)** eletroforese revelada com nitrato de prata da amostra de Soro do leite bovino na resina *Streamline SP*. Adsorção: tampão Fosfato de Sódio (40 mM, pH 7,5); Eluição: tampão Fosfato de Sódio (40 mM, pH com gradiente decrescente de 8,0 - 7,0) + NaCl (1 M). **LMW**: Padrão de baixa massa molecular; **F**: amostra de soro de soro do 120

leite bovino *in natura*; **01**: 1º ponto do Passante; **02**: 2º ponto do Passante;
03: 1º Ponto da Eluição; **04**: 2º Ponto da Eluição; **05**:
Regeneração.....

Figura 42 – **A)** Ensaio cromatográfico e **B)** eletroforese revelada com nitrato de prata do passante resultante do teste 2 na resina *Streamline* DEAE. Adsorção: tampão Fosfato de Sódio (40 mM, pH 7,5); Eluição: Tampão Fosfato de Sódio (40 mM, pH 7,5) + NaCl (1 M). **LMW**: Padrão de baixa massa molecular; **F**: fração da etapa passante coletada no teste 2; **01**: 1º ponto do Passante; **02**: 2º ponto do Passante; **03**: 3º Ponto do Passante; **04**: Eluição; **05**: 1º Ponto da Regeneração; **06**: 2º da Regeneração; **07**: 3º Ponto da Regeneração..... 122

Figura 43 – **A)** Ensaio cromatográfico e **B)** eletroforese revelada com nitrato de prata da fração eluída no teste 2 na resina *Phenyl Sepharose*. Adsorção: tampão Fosfato de Sódio (40 mM, pH 7,5) + NaCl (1 M); Eluição: tampão Fosfato de Sódio (40 mM, pH 7,5). **LMW**: Padrão de baixa massa molecular; **F**: fração da etapa de eluição coletada no teste 2; **01**: Passante; **02**: 1º ponto da Eluição; **03**: 2º Ponto da Eluição; **04**: 1º Ponto da Regeneração; **05**: 2º Ponto da Regeneração; **06**: 3º Ponto da Regeneração; **07**: 4º Ponto da Regeneração..... 124

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Grupos dos ligantes das resinas <i>Streamline</i>	45
Tabela 2	– Composição química do soro do leite dos tipos doce e ácido	50
Tabela 3	– Conteúdo protéico do soro do leite bovino	51
Tabela 4	– Aminoácidos presentes nas proteínas majoritárias do soro do leite	52
Tabela 5	– Parâmetros e níveis do planejamento composto central na etapa de adsorção da IgG na resina Capto MMC	62
Tabela 6	– Parâmetros e níveis do planejamento composto central na etapa de eluição da IgG na resina Capto MMC	65
Tabela 7	– Parâmetros e níveis do planejamento composto central na etapa de adsorção da BSA na resina Capto MMC	68
Tabela 8	– Parâmetros e níveis do planejamento composto central na etapa de eluição da BSA na resina Capto MMC	69
Tabela 9	– Parâmetros e níveis avaliados para os ensaios cromatográficos com soro do leite bovino na resina Capto MMC	72
Tabela 10	– Grupos funcionais das resinas <i>Streamline SP</i> , <i>Streamline DEAE</i> e <i>Phenyl Sepharose</i>	75
Tabela 11	– Condições cromatográficas avaliadas para as resinas <i>Streamline SP</i> , <i>Streamline DEAE</i> e <i>Phenyl Sepharose</i>	76
Tabela 12	– Caracterização físico-química do soro do leite bovino <i>in natura</i>	77
Tabela 13	– Quantidade adsorvida para os ensaios do planejamento experimental composto central na etapa de adsorção da IgG pura na resina Capto MMC.	78
Tabela 14	– Análise de variância (ANOVA) para o erro puro do planejamento composto central na etapa de adsorção da IgG na resina Capto MMC	80
Tabela 15	– Parâmetros matemáticos inseridos no modelo	82
Tabela 16	– Parâmetros de ajuste do modelo de Langmuir para a isoterma de adsorção da IgG na resina Capto MMC	84

Tabela 17 – Percentuais de recuperação na etapa de eluição da IgG na resina Capto MMC	85
Tabela 18 – Análise de variância (ANOVA) para o erro puro do planejamento composto central na etapa de eluição da IgG na resina Capto MMC	86
Tabela 19 – Quantidades adsorvidas das condições do delineamento experimental para a etapa de adsorção de BSA na resina Capto MMC	90
Tabela 20 – Análise de variância (ANOVA) para o erro puro do planejamento composto central na etapa de adsorção da BSA na resina Capto MMC	91
Tabela 21 – Parâmetros matemáticos inseridos no modelo	93
Tabela 22 – Parâmetros de ajuste do modelo de Langmuir para a isoterma de adsorção da BSA na resina Capto MMC	95
Tabela 23 – Percentuais de recuperação na etapa de eluição da IgG na resina Capto MMC	96
Tabela 24 – Análise de variância (ANOVA) para o erro puro do planejamento composto central na etapa de eluição da BSA na resina Capto MMC ...	97
Tabela 25 – Percentuais de recuperação das proteínas na etapa de eluição das amostras de soro do leite bovino na resina Capto MMC	102
Tabela 26 – Análise de variância (ANOVA) para o erro puro do planejamento composto central para os ensaios cromatográficos com soro de leite bovino na resina Capto MMC	103

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -La	α -lactoalbumina
β -Lg	β -lactoglobulina
BSA	Albumina do Soro Bovino
CMM	Cromatografia de Modo Misto
HSA	Albumina do Soro Humano
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IgG	Imunoglobulina G
Ig's	Imunoglobulinas
LFQA	Laboratório de Físico-Química dos Alimentos
NUTEC	Fundação Núcleo de Tecnologia Industrial do Ceará
pI	Ponto isoelétrico
PSM	Processo de Separação por Membranas
SAB	Sistema Aquoso Bifásico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	Objetivo Geral	25
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
2.1	Aplicação industrial das proteínas	27
2.2	Técnicas para recuperação de proteínas	28
2.2.1	<i>Precipitação</i>	29
2.2.2	<i>Diálise</i>	31
2.2.3	<i>Liofilização</i>	33
2.3	Técnicas para purificação de proteínas	35
2.3.1	Cromatografia	36
2.3.1.1	<i>Cromatografia de Troca Iônica</i>	36
2.3.1.2	<i>Cromatografia de Interação Hidrofóbica</i>	38
2.3.1.3	<i>Cromatografia de Modo Misto (CMM)</i>	39
2.4	Adsorção	42
2.4.1	<i>Adsorção em Leito Expandido (ALE)</i>	43
2.5	Soro de Sangue Humano	45
2.5.1	<i>Imunoglobulina G (IgG)</i>	46
2.5.2	<i>Albumina Sérica</i>	47
2.6	Soro do Leite Bovino	49
2.6.1	<i>α-Lactoalbumina</i>	53
2.6.2	<i>β-Lactoglobulina</i>	54
2.7	Planejamento Experimental	55
3	MATERIAIS E MÉTODOS	57
3.1	Amostras	57
3.1.1	Caracterização do Soro do Leite Bovino	57
3.1.1.1	<i>Umidade</i>	58
3.1.1.2	<i>Lactose</i>	58
3.1.1.3	<i>Cinzas</i>	59
3.1.1.4	<i>Proteínas</i>	59
3.1.1.5	<i>Gordura</i>	60
3.1.1.6	<i>Acidez</i>	60

3.2	Ensaio de purificação da IgG do soro do sangue humano	61
3.2.1	<i>Delimitação Experimental para estudos de adsorção da IgG</i>	61
3.2.1.1	<i>Cinética de Adsorção</i>	63
3.2.1.2	<i>Isoterma de Adsorção</i>	64
3.2.2	<i>Delimitação Experimental para estudos de Eluição da IgG</i>	64
3.2.3	<i>Soro de Sangue Humano</i>	66
3.3	Levantamento de dados fundamentais da BSA nos modos batelada e leito fixo	67
3.3.1	<i>Delimitação Experimental para estudos de Adsorção da BSA</i>	67
3.3.1.1	<i>Cinética de Adsorção</i>	68
3.3.1.2	<i>Isoterma de adsorção</i>	69
3.3.2	<i>Delimitação Experimental para estudos de Eluição da BSA</i>	69
3.4	Purificação das proteínas do soro do leite bovino em leito fixo	70
3.4.1	<i>Tratamento do Soro do Leite Bovino</i>	70
3.4.1.1	<i>Precipitação do Soro do Leite Bovino</i>	70
3.4.1.2	<i>Diálise</i>	71
3.4.1.3	<i>Liofilização</i>	71
3.4.2	<i>Ensaio Cromatográfico em leito fixo</i>	72
3.5	Purificação das proteínas do soro do leite bovino em leito expandido	73
3.5.1	<i>Coluna</i>	74
3.5.2	<i>Resinas</i>	74
3.5.3	<i>Grau de Expansão do leito</i>	75
3.5.4	<i>Condições Cromatográficas</i>	75
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
4.1	Caracterização do Soro do Leite Bovino	77
4.2	Ensaio de purificação da IgG do soro do sangue humano	77
4.2.1	<i>Delimitação Experimental para estudos de Adsorção da IgG</i>	78
4.2.1.1	<i>Cinética de Adsorção</i>	81
4.2.1.2	<i>Isoterma de Adsorção</i>	83
4.2.2	<i>Delimitação Experimental para estudos de Eluição da IgG</i>	84
4.2.3	<i>Soro de Sangue Humano</i>	88
4.3	Levantamento de dados fundamentais da BSA nos modos batelada e leito fixo	90

4.3.1	<i>Delineamento Experimental para estudos de Adsorção da BSA</i>	90
4.3.1.1	<i>Cinética de adsorção</i>	93
4.3.1.2	<i>Isoterma de adsorção</i>	94
4.3.2	<i>Delineamento Experimental para estudos de Eluição da BSA</i>	96
4.4	Purificação das proteínas do Soro do Leite Bovino em leite fixo	99
4.4.1	<i>Tratamento do Soro do Leite Bovino</i>	99
4.4.2	<i>Ensaio Cromatográfico</i>	102
4.5	Purificação das proteínas do soro do leite bovino em leite expandido	114
4.5.1	<i>Grau de Expansão do Leite</i>	115
4.5.2	<i>Condições Cromatográficas</i>	116
4.5.2.1	<i>Estratégia 1</i>	116
4.5.2.2	<i>Estratégia 2</i>	118
4.5.2.3	<i>Estratégia 3</i>	120
4.5.2.4	<i>Estratégia 4</i>	121
4.5.2.5	<i>Estratégia 5</i>	123
5	CONCLUSÕES	126
5.1	Conclusão Geral	127
	REFERÊNCIAS	128

1 INTRODUÇÃO

As proteínas são utilizadas em diversos setores, tais como na saúde: terapêutica (ação antibiótica ou anti-inflamatória, tratamento de câncer), farmacêutica (síntese de fármacos), médica (diagnósticos e prognósticos de doenças, acompanhamento de tratamentos); na indústria alimentícia: panificação (decomposição do amido, estabilidade à massa), laticínios (coagulação do leite, quebra a molécula de lactose); na indústria têxtil (algumas proteínas são utilizadas para alterar as propriedades da fibra). Para muitas dessas aplicações as proteínas precisam de alta pureza e especificidade e baixa antigenicidade, a fim de evitar reações imunológicas e estabilidade em condições fisiológicas (MUSSATTO *et al.*, 2007). Diante deste cenário, as indústrias alimentícia e farmacêutica têm buscado alternativas para suprir essa demanda.

De maneira geral, nas últimas décadas as legislações têm se tornado mais rígidas no que diz respeito ao descarte dos resíduos industriais, as quais exigem tratamentos para redução da carga orgânica antes de serem lançados em corpos hídricos ou outros pontos de descarte. Como exemplo típico, tem-se a indústria de queijos, a qual gera um grande volume de efluente, o soro do queijo. Estima-se que na produção de queijos, cerca de 90% do leite utilizado é convertido em soro. No que se refere à questão ambiental, embora a composição do soro seja, majoritariamente, constituída de água, este ainda apresenta alta Demanda Química Orgânica (DQO) e Demanda Bioquímica Orgânica (DBO), a qual está associada a presença de lactose e proteínas. Assim, realizar o tratamento de efluentes significa mais gastos, e, com isso, a indústria vem buscando alternativas para aproveitar o conteúdo orgânico ainda presente nesses efluentes. A alternativa mais usual tem sido a utilização do soro do leite bovino em iogurtes, produção de bebida láctea e na obtenção das proteínas do soro do leite bovino na forma de concentrados de proteínas, os conhecidos *whey protein* (OLIVEIRA, 2009; TSAKALI *et al.*, 2010).

Estima-se que 80% das proteínas do leite são as caseínas e 20% proteínas do soro, sendo que esse percentual pode variar em decorrência da raça, idade, alimentação do animal, dentre outros interferentes. Das proteínas contidas no soro, a β -lactoglobulina e α -lactoalbumina encontram-se em maiores quantidades, compreendendo cerca de 70% do total. Estas proteínas são utilizadas na regulação do sono e melhora do humor, como agente antimicrobiano, anti-hipertensivo e antioxidante (ALMEIDA *et al.*, 2015). O potencial de utilização do soro do leite bovino para a obtenção de *whey protein* deve-se ao seu elevado valor biológico, pois suas proteínas são consideradas proteínas completas, ou seja, apresentam

todos os aminoácidos essenciais ao homem. A forma mais utilizada para obtenção do *whey protein* tem sido a separação por membranas, porém, além de ser uma técnica cara, comumente apresenta dois problemas. O primeiro trata-se do acúmulo de partículas indesejáveis na superfície da membrana, propiciando uma redução do fluxo de água e aumento da passagem de sais. O segundo é a polarização por concentração, a qual ocorre quando o soluto se acumula próximo da superfície da membrana, ocasionando uma maior concentração deste nessa região, alterando o fluxo salino, desencadeando uma diferença da pressão osmótica, problematizando todo o processo (HABERT *et al.*, 2006).

Outra vertente que vem sendo bastante pesquisada consiste em processos para obtenção da Imunoglobulina G (IgG) proveniente do soro do sangue humano em sua forma purificada. Esta proteína faz parte do sistema imunológico do homem, sendo utilizada para tratamento de várias doenças, inclusive alguns casos de câncer. De acordo com o relatório do IBGE (IBGE, 2018), no trimestre de abril a junho de 2018 as importações de produtos farmacêuticos tiveram um aumento significativo. Este cenário vai ao encontro com as estimativas apresentadas por SALERMO *et al.* (2018), o qual prevê que gastos globais na área da saúde atinjam US\$ 8,7 trilhões até 2020, sendo os maiores custos voltados para doenças crônicas do tipo cardiovasculares, câncer e respiratórias (DELLOITTE, 2017). Atualmente, para obtenção da IgG são empregados o método de Cohn (Cohn *et al.*, 1946) e a cromatografia de afinidade. No entanto são técnicas que requerem tempo de operação que podem alterar a atividade protéica, em geral são dispendiosas e fazem uso de condições drásticas (DONG *et al.*, 2016).

Outra alternativa utilizada para purificação de proteínas tem sido o uso combinado de etapas cromatográficas de interação de troca iônica e hidrofóbica. Porém, geralmente os processos cromatográficos são caros, além do mais, quando se pensa em escala industrial o processo deve conter o mínimo de etapas. Assim, visando a obtenção de processos de purificação mais eficientes, novas fases estacionárias tem sido sintetizadas, sendo estas com características multimodais ou de modo misto. Nestas, a resina apresenta em seu ligante grupos funcionais que podem interagir com a molécula alvo por interações de troca iônica, hidrofóbica, pontes de hidrogênio, Forças de Van der Waals, dentre outras. A Capto MMC é uma resina que tem despertado grande interesse para aplicação em bioprocessos, principalmente para purificação de anticorpos mono e policlonais, sendo apontada como um material com elevada eficiência na purificação de proteínas provenientes do soro de sangue humano. Diante disso, o presente estudo aborda o uso de resinas de troca iônica, hidrofóbica e multimodal na captura das proteínas de interesse industrial IgG, BSA, β -lactoglobulina e α -

lactoalbumina.

A tese encontra-se dividida em 6 seções. Nesta primeira seção foi apresentada a introdução, na qual são apontadas alguns dos temas abordados na tese, assim também como os objetivos geral e específico. Na segunda seção é apresentada uma revisão bibliográfica pontuando os temas necessários para melhor compreensão do presente estudo. Na terceira seção serão descritas as metodologias empregadas para caracterização, extração, quantificação, separação e identificação das proteínas a partir das matrizes dos soros do sangue humano e do leite bovino. Na quarta seção serão apresentados os resultados obtidos no trabalho em questão, bem como uma discussão dos mesmos a cerca do disponível na literatura. A quinta seção contém as conclusões específicas adquiridas no trabalho, bem como uma conclusão geral dentro do cenário em que se encontra esse estudo. Na sexta seção são apresentadas as referências utilizadas no presente trabalho, seguido do Apêndice.

1.1 Objetivo Geral

Investigar o uso de diferentes resinas para separação e/ou purificação das proteínas dos soros de sangue humano e do leite bovino através de processos cromatográficos em leitos fixo e expandido. Os objetivos específicos foram:

- Determinar as condições de adsorção e eluição da proteína IgG comercial na resina multimodal Cpto MMC através de um delineamento experimental;
- Aplicar as condições de adsorção e eluição identificadas no delineamento experimental em amostras de soro de sangue humano para purificação da IgG;
- Determinar as condições de adsorção e eluição da proteína BSA comercial na resina multimodal Cpto MMC através de um delineamento experimental;
- Realizar um pré-tratamento nas amostras de soro do leite bovino, que viabilize sua utilização em etapas cromatográficas em leito fixo;
- Investigar a influência dos parâmetros pH de adsorção, pH de eluição e tempo de eluição, através de um delineamento experimental, no processo de purificação das proteínas do soro do leite bovino em leito fixo;
- Verificar a eficiência das condições identificadas em leito fixo (pH de adsorção, pH de eluição e tempo de eluição) no processo de purificação das proteínas do soro do leite bovino em leito expandido;

- Avaliar a eficiência de processos cromatográficos em leito expandido sequenciais com interações de troca catiônica e aniônica;
- Avaliar a eficiência de processos cromatográficos sequenciais com interações de troca catiônica no modo expandido e hidrofóbica no modo fixo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Esta sessão traz aspectos teóricos importantes sobre as principais técnicas de extração e purificação de proteínas de interesse industrial em matrizes de soro de sangue humano e do leite bovino.

2.1 Aplicação industrial das proteínas

No século XVIII, deu-se início a história das proteínas, ao observarem que a clara de ovo, o sangue e o leite, entre outros componentes, coagulam em altas temperaturas e em meio ácido. A estas substâncias denominaram de albuminóides (semelhantes ao albúmen). Proteínas e peptídeos são considerados fármacos ideais porque podem atuar em processos biológicos e reações. Isto é possível devido à elevada eficiência e potência, ou seja, apresentam especificidade e operam mesmo em baixas concentrações. Atualmente, várias proteínas são utilizadas para diversas finalidades, como ação terapêutica, incluindo anticorpos monoclonais, enzimas, agentes antimicrobianos, inibidores enzimáticos, vacinas, agentes imunomoduladores, fatores de crescimento, citocinas e hormônios (SILVA *et al.*, 2002; FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2012).

As proteínas apresentam diversas aplicações, tais como: ação antibiótica ou antiinflamatória (lisozima, bromelina, hialuronidase e outras); tratamento da leucemia (L-asparaginase). Para essas finalidades, elas necessitam de alta pureza e especificidade, baixa antigenicidade, para que não ocorram reações imunológicas, e estabilidade em condições fisiológicas. Ainda podem ser utilizadas na síntese de fármacos (penicilina, por exemplo). Alguns diagnósticos e prognósticos de doenças, bem como o acompanhamento de tratamento podem ser conduzidos pelo monitoramento de proteínas, através de exames clínicos. Como exemplos têm-se: amilase (pancreatite aguda), aspartato-aminotransferase e transaminase glutâmico-oxalacética (infarto, doenças hepáticas e musculares), aldolase (doenças musculares), creatinacinase e creatina-fosfotransferase (infarto e doenças musculares), fosfatase ácida (câncer da próstata e metástase) e fosfatase alcalina (doenças hepáticas e ósseas), dentre muitas outras. Outro setor industrial que emprega proteínas é o alimentício. Na panificação, a enzima alfa-amilase é utilizada para decomposição do amido, a amilase maltogênica e a xilanase conferem estabilidade à massa, a protease altera a elasticidade e a textura do glúten. As enzimas glicose isomerase, alfa-amilase, beta-amilase, pululanase e isoamilase são responsáveis pela conversão do amido em dextrose ou xaropes.

Na indústria de laticínios, a coagulação do leite pode ser realizada pela quimosina, a lactase quebra a molécula de lactose em açúcares glicose e galactose. As lípases, também utilizadas em outros setores, são responsáveis por decompor gorduras (MUSSATTO *et al.*, 2007).

A indústria farmacêutica abrange empresas nos ramos da pesquisa, desenvolvimento, manufatura e distribuição de medicamentos tanto para uso humano como animal. No ano de 2015, em meio à crise econômica e as buscas por redução de custos, as vendas globais de produtos farmacêuticos tiveram retração. No entanto, estima-se que em 2020 os gastos globais na área da saúde atinjam US\$ 8,7 trilhões, visto que os casos de doenças crônicas vêm aumentando a cada ano, conseqüentemente, tem-se aumento do consumo de medicamentos em geral. Grande parte desses problemas são associados ao aumento da urbanização, renda da população, assim também como ao sedentarismo, mudança em dietas, aumento da obesidade e ao rápido envelhecimento da população mundial (SALERMO *et al.*, 2018). Deloitte (2017) prevê que os maiores custos com a saúde até 2020 estarão associados às doenças crônicas do tipo cardiovasculares, câncer e respiratórias. O que está coerente com os dados obtidos no relatório do IBGE (IBGE, 2018), no trimestre de abril a junho de 2018, verificou-se uma redução explícita nas exportações de produtos alimentícios. No entanto, houve um aumento relevante nas importações de produtos farmacêuticos.

Os primeiros relatos da indústria farmacêutica no Brasil datam do período de 1890 e 1950. Neste período teve-se a expansão da cultura do café em direção ao oeste paulista, o que acarretou na vinda de muitos imigrantes para essa região. Com isso, foram necessárias medidas de combate a doenças e infecções, uma vez que as condições sanitárias dos portos, cortiços e hospedarias que os abrigavam eram insalubres (ORTIZ, 2003). Desde esse período, as constantes transformações que a indústria farmacêutica vem passando são pautadas no desenvolvimento da ciência, tecnologia, áreas de medicina e negócios (TEIXEIRA, 2014).

A ciência tem um papel fundamental nos avanços da industrialização das proteínas, atuando junto à indústria na descoberta de novos produtos, assim como no estudo de processos mais eficientes. Diante disso, a seguir serão apresentadas as principais técnicas de extração e purificação de proteínas do soro sangue humano e do soro do leite bovino.

2.2 Técnicas para recuperação de proteínas

Na maioria dos processos biotecnológicos que visam à purificação de proteínas, o conteúdo protéico encontra-se imerso no que chamamos de extrato bruto, ou seja, apresenta uma série de impurezas. Assim, tanto em escala laboratorial, como industrial, faz-se

necessário executar etapas de recuperação dessas proteínas, de maneira que as etapas seguintes não sejam comprometidas com os interferentes ainda presentes no extrato. Como exemplos, pode-se citar: precipitação, diálise e liofilização (PESSOA Jr. e KILIKIAN, 2005).

2.2.1 Precipitação

A precipitação é uma técnica bastante empregada no início da purificação de proteínas comerciais por ser barata, necessitar de equipamentos simples, poder ser usada em processos contínuos, além de normalmente garantir a estabilidade (HARRISON *et al.*, 2003). Consiste em uma etapa primordial em processos de recuperação de proteínas, pois auxilia na concentração das mesmas. Isso é possível devido à redução do volume de líquido e redução de interferentes, auxiliando ainda na redução de custos e equipamentos para as etapas posteriores (DORAN, 2012). Grossmann *et al.* (2018) reportam que a precipitação pode ser realizada de três maneiras: Precipitação isoelétrica, Precipitação por adição de solventes e Precipitação por adição de sais. Ambas estão fundamentadas nas características das proteínas em relação ao seu Ponto Isoelétrico (pI) e, também, na maneira como se comportam quando na presença de solventes orgânicos e sais.

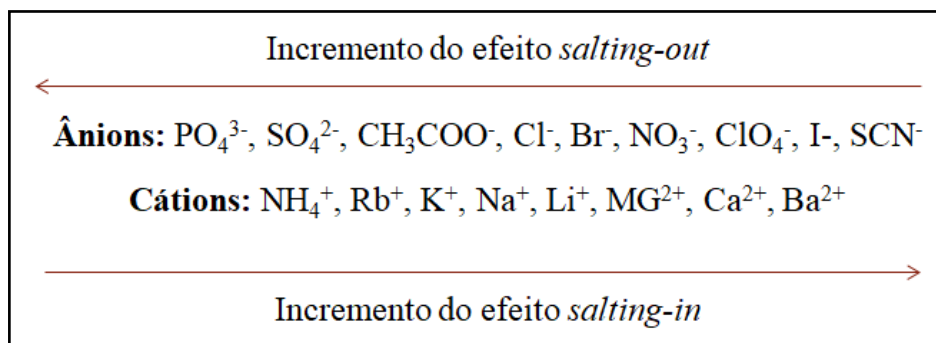
O princípio da precipitação isoelétrica está relacionado à solubilização das proteínas em meio aquoso de acordo com a carga líquida da molécula. Quando no pI, as proteínas são insolúveis em água, uma vez que as interações hidrofóbicas proteína-proteína são predominantes, desencadeando a precipitação das proteínas, sendo denominada precipitação isoelétrica. Quando o pH se afasta do pI de uma proteína, as repulsões eletrostáticas são favorecidas resultando na solubilização isoelétrica. A aplicação desta técnica vem sendo estudada para uso na extração de isolados de proteína a partir de subprodutos de processamento de alimentos musculares com baixo valor nutritivo (MATAK *et al.*, 2015; SHI *et al.*, 2017; SHI *et al.*, 2018). De acordo com Avelino (1997) esta técnica tem como principal desvantagem a possibilidade de ser agente desnaturante de proteína.

A precipitação por adição de solventes está fundamentada na redução da atividade de água na solução e, conseqüentemente, em sua constante dielétrica. A redução da constante dielétrica acarreta a “solubilização” das hidroxilas das moléculas de água e exposição dos grupos hidrofílicos das proteínas, acarretando na redução da densidade da camada de hidratação (SCHMIDELL, 2001). Podem ser utilizados solventes puros, como metanol, etanol, acetona e acetato de etila, assim também como misturas de etanol:acetona (1:1), por exemplo (GROSSMANN *et al.*, 2018; MOHAMMED *et al.*, 2018; YE *et al.*, 2018). No

entanto, o uso de solventes pode causar a desnaturação das proteínas, sendo necessário o controle rigoroso da temperatura em torno de 0 °C para reduzir esse risco (BOHÓRQUEZ, 2014).

A precipitação por adição de sais é a técnica mais empregada para precipitação de proteínas por vários motivos, dentre eles: não causa desnaturação, baixo custo dos sais e facilidade de escalonamento da bancada para escala industrial (MAHN e ISMAIL 2011; SHA *et al.*, 2014; MARIAM *et al.*, 2015; PURWANTO 2016; YANG *et al.*, 2017). Esta técnica fundamenta-se na Série de Hofmeister (Figura 1). Nesse caso, a precipitação das proteínas ocorre devido aos efeitos *salting-out* ou *salting-in*, os quais estão relacionados aos efeitos das concentrações de sais na solubilidade das proteínas. O efeito *salting-in* promove uma maior solubilidade das proteínas quando se tem o aumento da concentração do sal. Já no efeito *salting-out* ocasiona-se uma redução da solubilidade das proteínas com o aumento da concentração do sal. A redução da solubilidade das proteínas ocorre devido à competição com os íons salinos pelas moléculas de água (LADISCH, 2001; PRINGELS *et al.*, 2018). Esta técnica tem como principal desvantagem a necessidade de uma etapa subsequente para remoção dos sais presentes no precipitado (LIMA, 2006).

Figura 1 - Efeito dos íons da série de Hofmeister.



Fonte: Pessoa Jr. e Kilikian (2005).

As características desejáveis de um sal para ser empregado na etapa de precipitação são: elevada solubilidade, propiciar o aumento da tensão superficial do solvente em que se encontram as proteínas, reduzir a hidratação das zonas hidrófobas e aumentar a interação entre os grupos hidrofílicos das proteínas. Citrato de sódio, sulfato de sódio e sulfato de amônio são os sais mais utilizados. O sulfato de amônio é bastante utilizado devido à sua alta solubilidade em água (aproximadamente 4 M), a qual se mantém praticamente constante

na faixa de temperatura de 0 a 30 °C e ação estabilizante sobre as proteínas (SCHMIDELL, 2001; HARRISON *et al.*, 2003; PESSOA Jr. e KILIKIAN, 2005).

Mahn e Ismail (2011) utilizaram a precipitação com sulfato de amônio (40%) para melhorar a concentração de proteínas que se encontram em baixas concentrações no plasma sanguíneo e, posteriormente, detectá-las por 2D-PAGE. Mariam *et al.* (2015) utilizaram a mesma concentração de sulfato de amônio para concentrar a IgG policlonal e remover a Albumina presente no soro do coelho. Nesta etapa foi possível concentrar a IgG a 7,8 mg/mL e remover cerca de 72% da Albumina. Além disso, ao submeter amostras precipitadas a cromatografia em coluna SepFast™ MM AH-1 verificaram uma redução no número de proteínas agregadas.

Sha *et al.* (2014) empregaram a precipitação com sulfato de amônio para separar componentes presentes em amostras de gelatina de peixe. Para isso foram avaliadas as concentrações de 20, 25, 30, 35, e 40% de sulfato de amônio. Assim, verificaram que a gelatina de melhor força de gel foi obtida com a menor saturação de sulfato de amônio (20%). Este comportamento foi associado à relação da solubilidade das proteínas com sua massa molecular, uma vez que proteínas com maior quantidade de grupos polares formam pontes de hidrogênio com água, ou seja, moléculas com menor massa molecular apresenta maior solubilidade. Sendo assim, proteínas com maior massa molecular precipitam com uma menor saturação.

Yang *et al.* (2017) avaliaram a precipitação com sulfato de amônio nas concentrações de 10, 30, 50 e 90% como uma das etapas no processo de extração da Limonina a partir da casca de pomelo. Nestes ensaios, os melhores resultados foram obtidos ao utilizarem a concentração de 90%.

Pringels *et al.* (2018) verificaram que a combinação da precipitação com sulfato de amônio (40%) e cromatografia de afinidade com proteína A mostrou-se bastante eficiente, podendo ser comparado a kits comerciais empregados para diagnóstico de proteínas remanescentes na conformação nativa em amostras de plasma de rato. O uso dessa combinação permitiu a identificação de até 40 proteínas de baixa e média concentração no plasma.

2.2.2 Diálise

A diálise consiste em um processo de separação por membranas (PSM) que permite a partição de moléculas com tamanhos diferentes devido a uma força motriz, a qual

pode ser um potencial químico (diferença de pressão, concentração ou temperatura) ou potencial elétrico (membranas carregadas) (DORAN, 2012). Para isso, as membranas apresentam porosidades/malhas definidas, de maneira que qualquer molécula com massa molecular que lhe confira dimensão inferior ao da malha pode atravessar a membrana livremente (CASTRO *et al.*, 2008; COSTA, 2014; TANG *et al.*, 2015). A diálise é bastante utilizada para separação de moléculas com massa molar superior a 5000 Da, sendo aplicadas, por exemplo, para redução ou remoção da força iônica e impurezas (PUHL, 2008; WANG *et al.*, 2016; GAŠPERŠIČ *et al.*, 2016), como também para a separação de proteínas (TANG *et al.*, 2015).

As membranas utilizadas nos PSM são obtidas a partir de materiais poliméricos ou inorgânicos, sendo que as últimas apresentam custo bem mais elevado devido à maior vida útil e facilidade de limpeza. Morfologicamente, as membranas podem ser classificadas em isotrópicas (simétricas) ou anisotrópicas (assimétricas). As membranas isotrópicas apresentam a mesma morfologia em toda sua espessura, enquanto as membranas anisotrópicas são compostas por duas estruturas, a pele, região fina e fechada (porosa ou não) e o suporte (camada porosa) que auxilia na resistência mecânica à pele. Se o material utilizado para obtenção da pele for o mesmo do suporte essa membrana é dita como integral, e quando diferem chama-se composta. Além disso, as membranas ainda podem ser densas ou porosas, diferindo nas características morfológicas ao longo de sua espessura (HABERT *et al.*, 2006).

Doran (2012) relata a importância do coeficiente de retenção (R), parâmetro que avalia a eficiência de uma membrana. Quando moléculas de tamanho e massa molecular superiores ao da malha são totalmente retidos temos uma membrana ideal. Porém, sabe-se que pode haver moléculas alvo tanto no retentado como no permeado, pois os poros das membranas não apresentam o mesmo diâmetro, ou seja, o *cut-off* é imperfeito. Assim, calcula-se o coeficiente de retenção (R) através da Equação 01:

$$R = \frac{C_R - C_P}{C_R} = 1 - \frac{C_P}{C_R} \quad (01)$$

em que: C_R é a concentração do soluto no retentado e C_P é a concentração no permeado.

O fenômeno de separação das espécies através de membranas só ocorre na presença de um gradiente, que pode ser de pressão, concentração, potencial químico ou elétrico. No processo da diálise, onde são empregadas membranas porosas, a separação ocorre por diferença de concentração das espécies, as quais se difundem no meio (HABERT *et al.*, 2006).

Geralmente, em soluções contendo células ou proteínas, ocorre o fenômeno de

concentração por polarização. Este fenômeno corresponde ao acúmulo do retentado próximo a superfície da membrana em forma de camada. Como consequência desse acúmulo tem-se o entupimento dos poros, acarretando no decréscimo do fluxo, o que influencia na eficiência da membrana na separação do soluto. A turbulência induzida, aumento do fluxo e o fluxo cruzado são ferramentas empregadas para solucionar esse problema, no entanto o mais indicado é que o material seja pré-filtrado antes do PSM (LADISCH, 2001; DORAN, 2012).

Processos com diálise apresentam várias vantagens como, praticidade, uso de temperaturas moderadas, redução do estresse físico e químico da amostra, facilidade no *scale-up*, e dependendo da amostra e das condições trabalhadas, a purificação da amostra pode ser obtida em uma única etapa. A membrana de diálise é o elemento principal desse processo, pois ela deve garantir boa difusão entre os compostos de baixa massa molecular e sua estrutura, permitindo a eficiência da separação (ZUÑIGA, 2003; LIMA, 2014).

Em 2008, Castro *et al.* (2008) apontavam a diálise como uma técnica a se manter em uso, uma vez que é facilmente adaptável a estrutura e rotina dos laboratórios, contribuindo na obtenção de respostas em pesquisas científicas. Wang *et al.* (2016) utilizaram tubos de diálise para remoção do sal e outras pequenas impurezas moleculares no processo de desproteinização do polissacarídeo *Lycium Barbarum* (LBP – do inglês “*lycium barbarum polysaccharide*”). Gabrielczyk e Jördening (2017) empregaram tubos de diálise, em conjunto com resinas de troca iônica, como etapa no processo de redobragem da enzima frutossiltransferase (FTF, EC 2.4.1.162) produzida por *Bacillus subtilis* (NCIMB 11871).

2.2.3. Liofilização

A liofilização consiste em um processo de secagem que ocorre a temperatura e pressão controladas. Inicialmente o material é congelado e reduz-se a pressão da câmara abaixo da pressão de vapor. Dessa maneira, ocorre a sublimação da água presente no produto e, no final do processo, têm-se as propriedades químicas e organolépticas do substrato liofilizado praticamente inalteradas. Com isso, garante-se a estabilidade no armazenamento do produto, o qual pode ser reconstituído posteriormente. Processos de concentração ou desidratação de substratos que apresentem sensibilidade térmica podem ser realizados mediante liofilização, como produtos farmacêuticos, materiais biológicos e produtos químicos (HARRISON *et al.*, 2003; RIBEIRO, 2012; CORRÊA, 2013; BEZERRA, 2014; PAULA, 2015).

Doran (2012) descreve a liofilização como um processo dividido em três etapas.

São elas:

I. Congelamento: etapa em que o material deve ser totalmente congelado empregando temperatura de -40 à -80 °C por cerca de 2 h. Esta etapa é extremamente importante, pois determina a microestrutura do material, conseqüentemente, a qualidade do produto final;

II. Secagem primária: neste estágio a pressão é reduzida até ficar abaixo do ponto triplo da água (ponto em que a água se encontra nas formas sólida, líquida e vapor) e calor é fornecido ao material, ocorrendo assim a sublimação. Em sistemas cristalinos, durante a secagem primária ocorre remoção de cerca de 95% do conteúdo de água no sólido;

III. Secagem secundária: esta etapa inicia-se após todos os cristais de gelo terem sido removidos por sublimação. Assim, o calor fornecido ao material remove toda água residual ainda presente no sólido. Esta etapa é mais importante para sistemas amorfos onde a água não é totalmente removida na secagem primária.

A liofilização é comumente empregada na secagem de produtos que devem manter a viabilidade biológica mesmo no estado sólido. Um exemplo básico são as proteínas, as quais são facilmente desnaturadas quando submetidas à agitação e aquecimento. Alguns aditivos, açúcares, aminoácidos e tensoativos podem ser utilizados para evitar a inativação das mesmas (PESSOA Jr. e KILIKIAN, 2005).

Pessoa Jr. e Kilikian (2005) também ponderam alguns parâmetros que devem ser controlados durante a liofilização. São eles: temperatura das placas de transferência de calor, pressão na câmara e no condensador, tempos de resfriamento e congelamento e ciclos de secagem. Dessa maneira, apesar de cada material a ser liofilizado apresentar suas peculiaridades, alguns procedimentos são regras gerais, como:

- O material deve permanecer em sólido durante todo o processo;
- A pressão da câmara de secagem deve permanecer reduzida em todo o processo;
- Evitar aumento de temperatura para não cessar a sublimação;
- Manter a temperatura do condensador de maneira que a pressão de sublimação do gelo esteja bem inferior à da pressão total na câmara de secagem.

Harrison *et al.* (2003) relata sobre a importância do controle da temperatura durante o processo, indicando que a temperatura do material não pode ultrapassar suas temperaturas eutética e de transição vítrea. A temperatura eutética consiste na temperatura abaixo da qual todo o material se encontra no estado sólido. A temperatura de transição vítrea, existente apenas em sistemas amorfos, é aquela em que há mudança na viscosidade do sistema, ou seja, tem presença de líquido.

Tattini Jr. (2004) avaliou o efeito da taxa de congelamento nos comportamentos físico-químico e estrutural da BSA e BSA:Metoxi-Polietilenoglicol durante a liofilização. Neste trabalho foi observado que o congelamento rápido manteve a estrutura conformacional da BSA, porém, aumentou o tempo de secagem primária quando comparado o tempo de congelamento lento. Nos ensaios com a BSA modificada com Metoxi-Polietilenoglicol, foi verificada menores alterações estruturais e das características físico-químicas, assim também como um aumento na temperatura de transição vítrea.

2.3 Técnicas para purificação de proteínas

As proteínas podem apresentar muitas funções em nosso organismo. Porém, aqui serão pontuadas duas delas. São elas: atividade nutritiva devido ao seu conteúdo de aminoácidos; e atividade funcional, sendo esta responsável por várias reações metabólicas. Com isso, tem-se a necessidade de obtê-las na forma ativa, pois quando a proteína é desnaturada perde sua atividade funcional. Assim, indústrias como a farmacêutica, alimentícia e têxtil, vêm buscando processos cada vez mais eficientes para purificação de proteínas, pois elas podem ter diversas aplicações, como emulsificante na indústria alimentícia, para tratamento de doenças como câncer, dentre outras funções.

Os processos mais utilizados para separação e recuperação de proteínas de matrizes como soro do leite bovino, são: PSM, Sistemas Aquosos Bifásicos (SAB) e Cromatografia. Em matrizes como as proteínas do soro de sangue humano são empregados métodos como o de Cohn e Cromatografia de afinidade.

Os PSM são classificados em Micro (MF), Ultra (UF) e Nanofiltração (NF). Estes processos baseiam-se na utilização das membranas atuando como barreira que separa a lactose, gordura e componentes indesejados, das proteínas. Esse processo ocorre por diferença da forma e tamanho das partículas. Esta técnica é bastante utilizada pelo fato de não alterar a proteína, pois ocorre à temperatura ambiente, sem que ocorra mudança de fase (SAUFI e FEE, 2013).

Porém, além de ser uma técnica cara, apresenta dois principais problemas. Primeiramente têm-se o *fouling*, o qual consiste no acúmulo de partículas indesejáveis na superfície da membrana, propiciando uma redução do fluxo de água e aumento da passagem de sais. A segunda problemática se trata da polarização por concentração, a qual ocorre quando o soluto se acumula próximo da superfície da membrana, ocasionando uma maior concentração deste nessa região, alterando o fluxo salino, desencadeando uma diferença da

pressão osmótica, problematizando todo o processo. Relatos destes problemas podem ser encontrados em trabalhos realizados por REZAEI *et al.* (2011) e GALANAKIS *et al.* (2014).

O SAB consiste em um processo de purificação das proteínas baseado na partição desses compostos em dois solventes imiscíveis. Geralmente utilizam-se dois polímeros ou um polímero e um sal. Kalaivani e Regupathi (2015) obtiveram ótimos percentuais (em torno de 90%) de recuperação ao utilizarem o SAB para purificação das proteínas β -Lactoglobulina (β -Lg) e α -Lactoalbumina (α -La). Verificaram o comportamento de distribuição das proteínas no sistema, observando uma maior afinidade da α -La com o polímero (Polietilenoglicol) e da β -Lactoglobulina com o sal (citrato de trisódio). Outros trabalhos para purificação da lactoferrina (Costa *et al.*, 2015), Albumina do Soro Bovino (BSA), lisozima e mioglobina (Bezold *et al.*, 2015) ressaltam o potencial de purificação ao utilizar o SAB. Bezold *et al.* (2015) também relatam outra técnica recentemente aplicada para purificação de proteínas, a qual utiliza líquidos iônicos em SAB. Estes líquidos consistem em sais que permanecem na forma líquida a temperaturas inferiores a 100 °C. Apresentam características particulares, além de ter alta capacidade de solvatação. Sua aplicação em SAB deve-se muito a sua capacidade de manter ou até mesmo aumentar a estabilidade das proteínas (SANTOS *et al.*, 2015; TAHA *et al.*, 2015). No entanto, esta técnica apresenta algumas desvantagens como elevados custos para sua obtenção, complexidade na síntese, uma vez que é obtido através de várias etapas e do uso de reagentes químicos, podendo ser tóxico, em alguns casos (CARVALHO, 2017).

2.3.1 Cromatografia

A Cromatografia consiste em uma técnica bastante difundida em processos de separação e purificação de biomoléculas. Sua utilização parte do princípio de que uma ou mais moléculas alvo presentes em uma fase móvel (líquido ou gás) são adsorvidas por uma fase estacionária (sólida ou líquida) e, posteriormente, eluídas. A natureza das fases móvel e estacionária são fatores determinantes para a classificação da cromatografia, segundo o mecanismo de retenção do soluto na fase estacionária. A que mais tem se destacado ao longo dos anos no cenário de purificação das proteínas são as Cromatografias de Troca Iônica, de Interação Hidrofóbica e de Afinidade (NASCIMENTO *et al.*, 2014).

2.3.1.1 Cromatografia de Troca Iônica

A interação de troca iônica é uma das mais utilizadas em cromatografia, pois oferece alta resolução e separação de grupos com elevada capacidade de carga. Esta técnica baseia-se na captura da molécula alvo por diferença de cargas, utilizando como principais ferramentas: pI da molécula, pH e força iônica do meio e tipo de ligante do adsorvente. Para isso, ocorre troca reversível dos íons da molécula alvo presente na fase móvel com os íons ativos da superfície sólida. O adsorvente pode ser de caráter aniônico ou catiônico, e o composto em estudo é o fator que determina qual a natureza do adsorvente. O trocador iônico ligado à matriz ainda pode ser classificado em forte, médio ou fraco. Esta classificação refere-se à influência do pH no grau de dissociação e capacidade, e não à interação adsorvente-proteína. Ou seja, um trocador forte encontra-se completamente ionizado em uma ampla faixa de pH. Os trocadores médio e fraco são influenciados pelo pH (SCHMIDELL, 2001; PESSOA Jr. e KILIKIAN, 2005).

Geralmente, os parâmetros força iônica, pH de adsorção e eluição são avaliados individualmente no intuito de se obter as melhores condições de retenção, resolução e recuperação dos compostos em análise. Em processos industriais de purificação e separação de moléculas é muito comum utilizar múltiplas colunas, em que cada uma delas apresenta um adsorvente diferente. A interação de troca iônica, na maioria das vezes, é utilizada na etapa inicial dos processos por promover maior separação (PESSOA Jr. e KILIKIAN, 2005).

As resinas de troca iônica mais utilizadas resultam da polimerização do poliestireno ou copolimerização estireno-divinilbenzeno, uma vez que estes compostos conferem maior durabilidade, alta capacidade e estabilidade ao material. Assim, a classificação dessas resinas está relacionada aos grupos funcionais fixados na matriz polimérica, os quais podem estar carregados positivamente ou negativamente, levando a resinas aniônicas ou catiônicas, respectivamente (FERREIRA, 2017).

Há uma grande variedade de adsorventes de troca iônica altamente porosos disponíveis no mercado, muitos deles voltados para a separação e purificação de biomoléculas. Como exemplos, podem ser citadas as resinas *Fastline SP*, *Streamline Q XL*, *Streamline DEAE*, *SP Sepharose*, *Sepharose 4B*, aplicadas para captura de moléculas como a lactoferrina do soro do leite, imunoglobulina G (IgG), C- ficocianina, dentre outras (SAUFI e FEE, 2013; DU *et al.*, 2014; MORAES *et al.*, 2015).

Kumar e Rathore (2014) propuseram o uso resina de uma resina de troca iônica *Capto Impress SP* em conjunto com a de interação hidrofóbica *Sartobind Phenyl membrane* para remoção de agregados de anticorpos monoclonais (mAb). Através dessa combinação foi possível a remoção completa das espécies de mAb e recuperação do produto proposto maior

que 95%. Além disso, os autores ainda sugerem que esse processo possa ser aplicado para remoção de todos os fragmentos de anticorpos.

Mao *et al.* (2017) utilizaram a precipitação com sulfato de amônio e a resina de troca iônica, *DEAE-Sepharose Fast Flow*, para isolar e verificar a capacidade antigênica das proteínas α -La e β -Lg a partir do soro do leite. Verificaram que a metodologia utilizada apresenta boa reprodutibilidade, baixo custo e fácil operação, uma vez que as antigenicidades das proteínas isoladas foram semelhantes as das proteínas padrões.

2.3.1.2 Cromatografia de Interação Hidrofóbica

A utilização da interação hidrofóbica consiste em uma técnica simples, a qual se baseia na associação de grupos alifáticos ou de outras estruturas apolares quando presentes em meio aquoso. A presença de sais no meio aquoso favorece a interação hidrofóbica (IH), promovendo o efeito *salting-out*, em que o sal interage com a molécula de água, aumentando a hidrofobicidade da molécula, facilitando assim a interação da molécula com a fase estacionária. Alguns fatores como tipo de ligante, grau de substituição, pH, temperatura, tipo e concentração do sal, exercem grande influência no desempenho do processo cromatográfico baseado na interação hidrofóbica, podendo aumentar ou não a capacidade de adsorção da resina utilizada no processo. Em processos industriais de purificação e separação de moléculas a interação hidrofóbica é na maioria das vezes utilizada como etapa complementar, ou seja, após outra etapa cromatográfica, como a de troca iônica, por exemplo (PESSOA Jr. e KILIKIAN, 2005).

Quanto aos tipos de ligantes, tem-se que os de cadeia alquila são tidos como hidrofóbicos “puros”, enquanto os de cadeia arila são considerados hidrofóbicos “mistos”, podendo interagir pelas interações hidrofóbicas e aromáticas. Quanto maior a cadeia de hidrocarboneto do ligante, maior será sua hidrofobicidade, conseqüentemente, menor será a concentração de sal utilizada na etapa de adsorção. No que diz respeito ao tipo de sal, tem-se que sua utilização está fundamentada na Série de Hofmeister, já apresentada no item 2.2.1 (PESSOA Jr. e KILIKIAN 2005).

Adsorventes como *Butyl Sepharose*, *Octyl Sepharose* e *Phenyl Sepharose* são exemplos de materiais utilizados para purificação de enzimas lipolíticas, antibióticos monoclonais, nisina, lipases, dentre outros (KUMAR e RATHORE, 2014; JOZALA *et al.*, 2015; CHOI *et al.*, 2016; MANOEL *et al.*, 2015).

Santos *et al.* (2011) utilizaram a resina *HiPrep Octyl Sepharose FF* para

recuperação e fracionamento de proteínas a partir de um concentrado protéico de soro do leite (80% p/p). Ao aplicarem um gradiente salino decrescente na etapa de eluição foi possível recuperar 42,5% da β -Lg com 99,6% de pureza. Além disso, os resultados apontaram como proteína mais hidrofóbica a α -La e a Lactoferrina como menos hidrofóbica.

Desde o início dos anos 2010, pesquisadores têm se utilizado de outra modalidade cromatográfica já conhecida, porém ainda pouco utilizada, denominada Cromatografia de Modo Misto (CMM).

2.3.1.3 Cromatografia de Modo Misto (CMM)

A CMM consiste em combinar em uma mesma matriz pontes de hidrogênio, forças de Van Der Waals, interações de troca iônica, hidrofóbica e de afinidade entre a fase estacionária e o soluto na matéria-prima, visando à separação e/ ou purificação mais eficiente de moléculas (GAO *et al.*, 2013). Hanke e Ottens (2014) relatam o grande interesse obtido pela CMM, o qual está associado ao seu bom desempenho na adsorção e purificação de proteínas. Um dos fatores determinantes para a utilização da CMM é o ligante funcional. Recentemente, têm-se desenvolvido diversos ligantes CMM com composição de baixa massa molecular. Uma classe de ligantes que têm chamado bastante atenção é a de compostos poliméricos, pois oferecem sítios de ligação tridimensionais de proteínas, aumentando eficazmente a capacidade de adsorção. Comparando a CMM com a Cromatografia de Interação Hidrofóbica (CIH) tradicional, a CMM proporciona melhor seletividade, assim também como apresenta recuperação do eluente com eluição por ajuste do pH e concentração de sal (LIU *et al.*, 2014).

Estudos utilizando a CMM com moléculas de peptídeos, IgG, BSA, DNA de plasmídeo têm sido reportados, porém, a maioria deles são voltados para ensaios de separação e purificação de anticorpos mono e policlonais (BERNARDI *et al.*, 2013; DU *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2014; MATOS *et al.*, 2014; SHEN *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2015).

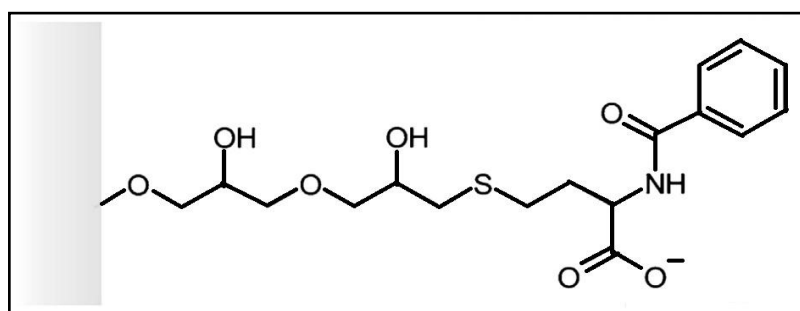
Yu *et al.* (2015) atentam para a importância da compreensão de características da proteína como orientação e ligação sobre as superfícies a um nível molecular. Para que essas interações ocorram, é necessário conhecer a natureza da molécula a ser purificada, para fazer a escolha correta do adsorvente. Muitos processos promovem a separação de proteínas utilizando apenas um tipo de interação ou combinações deles, como troca iônica, hidrofóbica ou de afinidade. Na cromatografia de modo misto um único adsorvente pode separar as moléculas através do conjunto dessas interações. Geralmente, para isso, faz-se necessário o

uso de gradientes na etapa de eluição, seja salino ou pH, por exemplo, onde a variação das condições favorece a todas as interações presentes na resina.

Relatos mostram que, ao comparar resinas de troca iônica com as de modo misto, a última desempenha uma forte afinidade sobre as proteínas, apresentando diferentes perfis de eluição, permitindo assim a possibilidade de separar os oligômeros de proteínas solúveis. A eficiência das resinas de modo misto é influenciada pelo pH e concentração de sal. O aumento do pH reduz significativamente a capacidade de adsorção devido ao enfraquecimento das interações eletrostáticas entre a proteína e a resina (DU *et al.*, 2014; HIRANO *et al.*, 2014). No entanto, o efeito do pH é contraposto com o efeito *salting-out*, uma vez que a presença de sais no meio aumenta a exposição dos grupos hidrofóbicos das proteínas (PESSOA Jr. e KILIKIAN, 2005).

Resinas como HEA HyperCel™, PPA HyperCel™, Capto MMC foram inseridas no mercado a partir de 2010 e tem despertado grande interesse na aplicação em bioprocessos, principalmente para purificação de proteínas e anticorpos mono e policlonais, pois apresenta elevada capacidade de adsorção. Até então, os trabalhos que têm sido relatados utilizando essas resinas são em amostras padrões. A Figura 2 mostra a estrutura da resina Capto MMC, a qual é composta por um grupo carboxila que confere as características de troca iônica e um grupo fenil caracterizando as interações hidrofóbicas. Além disso, as hidroxilas contribuem com as pontes de hidrogênio e o enxofre com as ligações tiofílicas. Vale ressaltar que estas interações podem atuar de maneira independente ou não, porém as condições do processo, bem como as características da molécula alvo, são os fatores que determinam a importância relativa das interações (KALEAS *et al.*, 2010; BALASUNDARAM *et al.*, 2013; JOUCLA *et al.*, 2013; GE HEALTHCARE, 2013; BHAMBURE *et al.*, 2014; GOSPODAREK *et al.*, 2014; HIRANO *et al.*, 2014; WOLFE *et al.*, 2014; PEZZINI *et al.*, 2015).

Figura 2 - Estrutura do adsorvente Capto MMC.



Fonte: GE Healthcare, 2013.

Ao analisarem as interações das proteínas BSA, lisozima e IgG em resinas multimodais com ligantes catiônicos e aniônicos pelo método PCA (do inglês, *Principal Components Analysis*), Johansson *et al.* (2003) puderam entender quais propriedades dos ligantes são similares ou se correlacionam e quais resultam em maiores quantidades adsorvidas. Assim, verificou-se que os ligantes contendo aminas primárias e secundárias apresentaram maiores quantidades adsorvidas que as aminas terciárias ou quaternárias. Isto pode estar associado à disponibilidade de ligações de hidrogênio em sistemas com aminas primárias ou secundárias. Quando analisadas as características de hidrofobicidade, verificou-se que os ligantes aromáticos resultaram em recuperações significativamente menores do que os ligantes alifáticos, possivelmente devido a uma maior hidrofobicidade.

Ao se trabalhar com resinas multimodais, as etapas de adsorção e eluição de proteínas se dão de maneira muito mais complexa que nas resinas unicamente de troca iônica ou de interação hidrofóbica. Muitas vezes faz-se necessário alterar o pH do meio para se ter a eluição da proteína, ocasionada pela repulsão eletrostática entre a proteína e o ligante. Quando em altas concentrações salinas, as interações entre proteína e ligante se dão majoritariamente por interações hidrofóbicas e por interações eletrostáticas quando em baixa força iônica (KALLBERG *et al.*, 2012).

Ao estudarem a retenção de proteínas na coluna WAX por interações de modo misto, Liu *et al.* (2009) verificaram que quando a concentração de sal aumenta gradualmente, a orientação das moléculas de proteína em direção à fase estacionária e a natureza das forças de interação mudam simultaneamente, o que pode estar associado à teoria de deslocamento estequiométrico. Além disso, identificou-se a existência de uma curva de eluição em forma de “U” na separação de proteínas, a qual está relacionada com a concentração de sal. Quando a eluição ocorre no modo gradiente linear, o sal é o deslocador em baixas concentrações salinas e nesse caso, o processo de separação é realizado pelas interações eletrostáticas. Porém, em altas concentrações salinas, a água é o deslocador e a separação ocorre através das interações hidrofóbicas.

Chung *et al.* (2010) estudaram a interação de variantes de proteínas expressas pela *E. coli* nas resinas de troca iônica (*Sulfopropyl Sepharose Fast Flow*) e multimodal (*Capto MMC*). Puderam ver que as proteínas apresentaram maior retenção na resina multimodal, quando comparada a de troca iônica convencional. Além disso, a ordem de saída das proteínas na etapa de eluição foi diferente para as duas resinas.

Lima *et al.* (2016) avaliaram o uso da resina *Capto MMC* para recuperação e purificação da β -galactosidase a partir da fermentação do *Kluyvermyces lactis* cultivado em

soro do leite bovino. O processo utilizado (Fermentação, Rompimento das células, Precipitação, Diálise e Cromatografia) levou à recuperação de 41% da concentração total e 48,2% da atividade enzimática da β -galactosidase.

Chu *et al.* (2018) utilizaram a resina multimodal *HEA Hypercel* para remoção seletiva das formas de Metionina oxidada, reduzida e fMet provenientes de fator de estimulação de colônias de granulócitos humanos recombinantes (GCSF – do inglês: *Granulocyte Colony Stimulating Factor*). Os resultados apontaram potencial aplicação desse processo para remoção das variantes mencionadas, bem como a depuração de impurezas relacionadas a células hospedeiras.

2.4 Adsorção

Na maioria dos modos cromatográficos, o fenômeno que rege a separação e/ou purificação das moléculas alvo é a adsorção, a qual se baseia na transferência de massa dos compostos presentes em uma fase fluída (líquida ou gasosa) para a superfície de um sólido. Essa transferência é viabilizada através das interações entre o adsorbato (soluto) e o adsorvente. A intensidade dessas interações determina a natureza da adsorção: A fisissorção ou adsorção física ocorre quando as interações existentes são associadas às forças de Van der Waals; A quimissorção ou adsorção química ocorre quando existe troca ou partilha de elétrons entre as moléculas de adsorbato e adsorvente (NASCIMENTO *et al.*, 2014).

Curbelo (2002) aponta vários fatores que influenciam a eficiência da adsorção, tais como: naturezas do adsorbato e do adsorvente, tamanho da partícula, pH, concentração salina, temperatura, dentre outros. Com isso, o conhecimento sobre a matriz a ser separada é de fundamental importância para poder alcançar um processo de adsorção eficiente.

Modelos matemáticos têm sido amplamente utilizados pela comunidade científica no intuito de facilitar a interpretação dos dados obtidos na adsorção, sendo capazes de prever o comportamento dos dados experimentais a partir de isotermas de adsorção. O modelo de isoterma de adsorção não-linear mais difundido é o proposto por Langmuir, visto que são capazes de prever a capacidade máxima de adsorção, bem como descrever o comportamento dos dados experimentais.

Para a utilização da Isoterma de Langmuir são realizadas algumas considerações (LANGMUIR, 1916):

- As moléculas de adsorbato são adsorvidas em um número fixo e finito de sítios ativos do adsorvente;

- Cada sítio é ocupado unicamente por uma molécula;
- A energia de adsorção dos sítios ativos é a mesma;
- Não existem interações entre uma molécula adsorvida em determinado sítio ativo com as adsorvidas nos sítios vizinhos.

Partindo destas considerações, a equação que descreve a concentração adsorvida (q^*) em equilíbrio com a concentração desta mesma espécie na fase fluida (C_{eq}) é descrita pela Equação 02:

$$q^* = \frac{q_{max} \cdot k \cdot C_{eq}}{1 + k \cdot C_{eq}} \quad (02)$$

sendo: q a concentração de soluto na fase adsorvida (mg/g ou mg/mL); q_m a concentração máxima de soluto adsorvida na fase sólida (mg/g); c_{eq} a concentração de equilíbrio na fase líquida (mg/mL); k a constante de dissociação de Langmuir (mL/g).

As colunas cromatográficas podem ser operadas em dois modos: leito fixo e leito expandido. O processo de Adsorção em Leito Fixo consiste basicamente no escoamento de um fluido, previamente clarificado, através de uma coluna, em que as partículas do adsorvente encontram-se empacotadas de forma fixa e compacta. A etapa de clarificação prévia é imprescindível, caso contrário poderá ocorrer o entupimento do leito impedindo o escoamento do fluido pela coluna. Na maioria das vezes, opta-se por utilizar a centrifugação para sedimentação das partículas sólidas, no caso do soro do leite, ou células em suspensão, em casos de caldos fermentados (PESSOA Jr. e KILIKIAN, 2005).

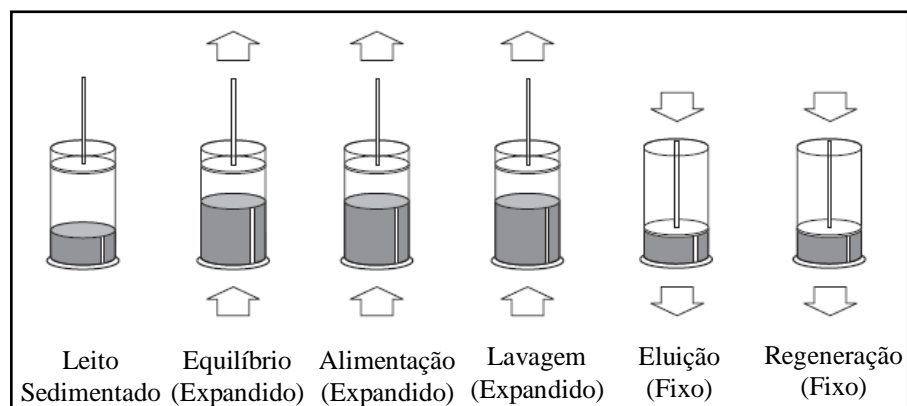
O empacotamento da coluna em leito fixo é um passo muito importante, pois o leito não deve ficar muito compacto, para que não bloqueie a passagem do fluido, nem tão frouxo, pois seria uma fonte de dispersão axial. Geralmente, colunas com diâmetro maiores que 20 mm podem apresentar esse último problema (LIMA, 2014).

2.4.1 Adsorção em Leito Expandido (ALE)

A adsorção em leito expandido consiste em um processo de biosseparação em coluna, que se distingue das demais técnicas quando se considera a robustez do processo, flexibilidade e economia, pois é capaz de condensar operações como clarificação, concentração e purificação inicial da matéria-prima em uma única etapa, reduzindo o tempo e

os custos para tratamentos em larga escala nas indústrias de alimentos e produtos lácteos, por exemplo, como também para separação e purificação de moléculas em caldos fermentados com células em suspensão. Isto é possível porque o processo em leito expandido é operado com as partículas adsorventes suspensas, ou fluidizadas, com maiores porosidade do leito e velocidade do fluido de alimentação, evitando assim o bloqueio do leito (Figura 3). Porém, a complexidade das interações dos adsorventes com as moléculas adsorvidas dificultam o processo de eluição (ASGARI *et al.*, 2014; KALEAS *et al.*, 2010; DU *et al.*, 2014; PAUL *et al.*, 2014; SOUSA Jr *et al.*, 2015).

Figura 3 – Etapas de operação do sistema de leito expandido.



Fonte: Amersham Biosciences (2001).

Assim, visando a operação em leito expandido, o grupo *Pharmacia Biotech*, lançou em 1993 as resinas *Streamline*. Estas apresentam maior estabilidade na expansão do leito quando empregadas altas velocidades (McCormick, 1993; Padilha, 2013). As resinas *Streamline* são constituídas por agarose reticulada, quartzo cristalino no seu núcleo e dextrana ligada. Isso permite que elas apresentem tamanhos médios de partículas de 200 μm , densidades de 1,2 g/L e Grau de Expansão (GE) de 2 – 3 em velocidade de 400 cm/h (GE HEALTHCARE, 2006). A Tabela 1 ilustra variedades destas resinas e seus respectivos grupos ligantes.

Tabela 1 - Grupos dos ligantes das resinas *Streamline*.

Aniônicas	Ligantes
Amônio Quaternário (Q)	$-O-CH_2-CHOH-CH_2-O-CH_2-CHOH-CH_2-N + (CH_3)_3$
Aminoetil Quaternário (QAE)	$-O-CH_2-CH_2-N + (C_2H_5)_2-CH_2-CHOH-CH_3$
Dietilaminoetil (DEAE)	$-O-CH_2-CH_2-N + H(CH_2CH_3)_2$
Catiônicas	Ligantes
Metil Sulfonado (S)	$-O-CH_2-CHOH-CH_2-O-CH_2-CHOH-CH_2SO_3$
Sulfopropil (SP)	$-O-CH_2-CHOH-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2SO_3$
Carboximetil (CM)	$-O-CH_2-COO^-$

Fonte: Autoria própria.

Du *et al.* (2014) realizaram um processo combinado com duas etapas de leite expandido para purificação da Lactoferrina e da IgG a partir de soro do leite doce cru. Para isso, foram utilizadas resinas de troca catiônica (*Fastline SP*) e de modo misto (*Streamline Direct CST-1*), em sequência. Por meio dessa sequência foi possível obter a Lactoferrina na primeira etapa utilizando a *Fastline SP* e a IgG na segunda etapa com a *Streamline Direct CST-1*.

Fernandes *et al.* (2014) estudaram a eficiência das resinas de troca iônica *StreamlineTM DEAE*, *StreamlineTM Q XL*, *StreamlineTM SP* e *StreamlineTM SP XL* na captura da enzima peroxidase a partir do farelo do arroz. Entre as resinas avaliadas, a que apresentou melhores resultados foi a *StreamlineTM SP* ao se trabalhar no pH 5,0 com os tampões fosfato de sódio e citrato de sódio e no pH 4,5 com o tampão acetato de sódio, todos na concentração de 25 mM. Além disso, pode-se constatar que processos mais ácidos, mais demorados, induzem à desnaturação da peroxidase.

Elpídio (2016) sintetizou um material com núcleo composto de esferas de zircônia estabilizadas com ítria e recobertas por uma matriz insolúvel de agarose visando sua aplicação em processos de adsorção em leite expandido. A BSA foi utilizada para avaliar sua capacidade de adsorção. Os ensaios apontaram que o material sintetizado apresenta potencial de aplicação em leite expandido e apresentou uma capacidade dinâmica 7,83 mg de BSA/mL de adsorvente.

2.5 Soro de sangue humano

O soro e plasma humano são obtidos a partir do sangue após a centrifugação.

Quando essa etapa se dá na ausência de anticoagulante e se tem o consumo do fibrinogênio é obtido o soro. Todavia, quando a centrifugação ocorre na presença de anticoagulante obtêm-se o plasma. Dessa maneira, a presença de fibrinogênio é o fator determinante na diferenciação entre o soro e o plasma do sangue humano (BURNOUF e RADOSEVICH, 2001; BURNOUF, 2007; GONDIM, 2017).

No que diz respeito à composição do soro de sangue humano, Wright *et al*, (2018) relatam que pode variar, mas normalmente consiste em Albumina do Soro Humano (HSA - do inglês, *Human Serum Albumin*) (34 – 70 mg/mL), Imunoglobulinas (Ig's) (5 – 20 mg/mL), Transferrina (3 – 7 mg/mL), Anti- α -1 tripsina (2 – 4 mg/mL) e Lipoproteínas séricas (1 – 10 mg/mL).

A grande importância da purificação das proteínas do soro de sangue humano deve-se ao fato de que elas são responsáveis pelo transporte de várias substâncias no organismo do homem, regulação da pressão oncótica, coagulação do sangue e são utilizadas para diagnósticos e tratamentos de várias doenças. Oliveira (2016) relata que cerca de 40-50% do mercado mundial de proteínas plasmáticas é compreendido pelas IG's. A seguir são abordadas as principais proteínas do soro de sangue humano. São elas: Imunoglobulina G e HSA.

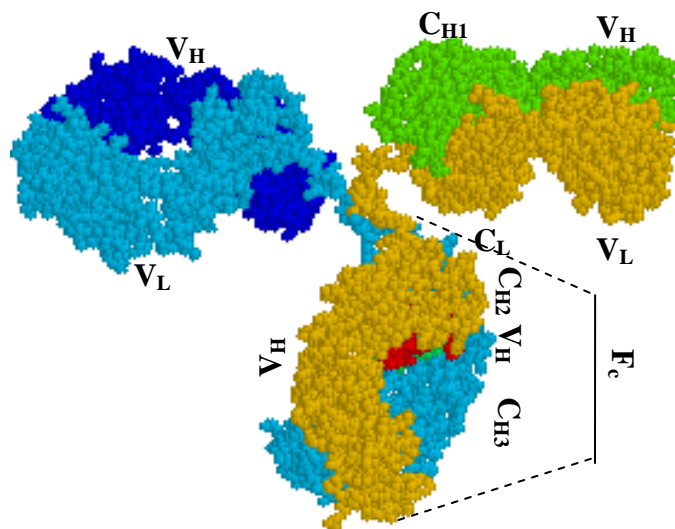
2.5.1. Imunoglobulina G (IgG)

As Ig's (IgA, IgD, IgE, IgG e IgM) compreendem cerca de 12% do total das proteínas presentes no soro de sangue humano. Destas, 75% corresponde a IgG, as quais são divididas nas subclasses I, II, III e IV. As IgG's são as principais responsáveis pelo sistema imunológico, sendo comumente chamadas de anticorpos e utilizadas em tratamento de doenças infecciosas e imunodeficientes, assim como o câncer (BURNOUF e RADOSEVICH, 2001; BURNOUF, 2007; GONDIM, 2017).

As IgG's são constituídas por cerca de 82 a 96% de proteínas e 4 a 18% de carboidratos. Encontram-se dispostos na molécula de IgG em um formato semelhante a um “Y” formando 4 cadeias polipeptídicas ligadas por ligações covalentes de dissulfeto e interações não covalentes. A Figura 4 ilustra o perfil apresentado pelas moléculas das Ig's, onde pode ser observado cadeias polipeptídicas compostas por duas cadeias leves (L) de massa molar 25 kDa e duas pesadas de massa molar 50 à 70 kDa (H). Os domínios V_H e V_L , sítios de ligação do antígeno, correspondem aos domínios variáveis das cadeias pesadas e leves,

respectivamente. Os domínios CL e CH correspondem as regiões constantes nas moléculas de Ig's (ABBAS e LICHTMAN, 1994; GONDIM, 2017).

Figura 4 - Estrutura espacial da Imunoglobulina G.



Fonte: Adaptado de Padlan (1994).

O método comumente empregado para purificação das frações do plasma humano é método de Cohn (Cohn *et al.*, 1946), o qual fundamenta-se na precipitação das proteínas através de multi estágios de centrifugação do plasma com diferentes concentrações de etanol a frio. Este método tem como vantagens a facilidade para ampliação de escala e modo de operação relativamente simples. Porém, o fato do fracionamento ocorrer em várias etapas requer mais tempo de operação, e as etapas de centrifugação ocasionam perda da atividade protéica (DONG *et al.*, 2016).

2.5.2 Albumina Sérica

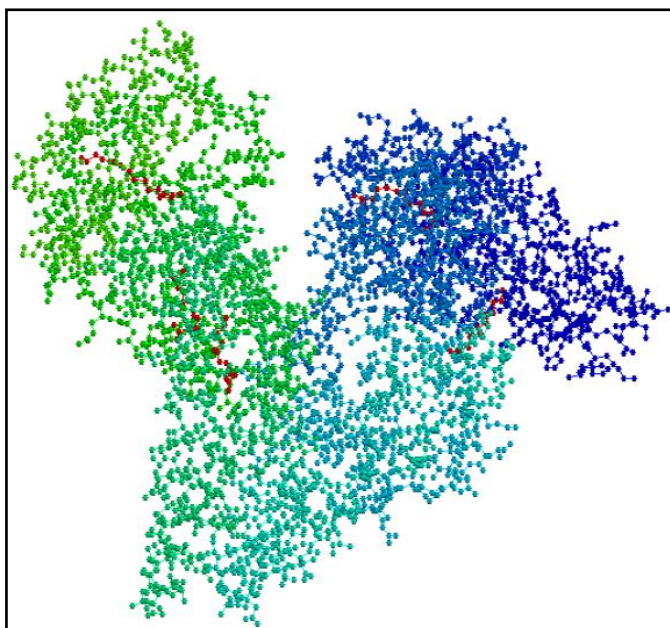
A Albumina sérica é a proteína mais abundante no plasma do homem, coelho, assim também como no soro do leite bovino. Sua síntese ocorre no fígado, inicialmente na forma de prealbumina. Com a remoção do peptídeo sinal tem-se a proalbumina, sendo esta também modificada através da remoção de seis resíduos de propeptídeos no novo terminal N. Por fim, a Albumina é lançada na circulação sanguínea. Uma vez que são sintetizadas no fígado, sua redução no plasma pode ser indicativa de algum problema hepático ou renal, sendo este sinalizado quando a albumina passa para a urina. A Albumina desempenha importantes funções no organismo do homem, tais como manutenção da pressão osmótica e do pH do sangue, transporte de ácidos graxos, sequestro de radicais livres de oxigênio, sendo

ainda responsável por inativar metabólitos lipofílicos tóxicos, como a bilirrubina (GÓES Filho, 2005; GUIZADO, 2008).

As Albuminas são conhecidas por apresentarem poucos resíduos de triptofano e metionina e um grande número de cistina e aminoácidos carregados, ácido aspártico e glutâmico, lisina e arginina. Enquanto a HSA apresenta um resíduo de triptofano, a Albumina do Soro Bovino (BSA - do inglês *Bovine Serum Albumin*) contém dois resíduos. Ambas contêm um resíduo de cisteína em sua estrutura (GÓES Filho, 2005; GUIZADO, 2008). Partindo desse princípio, no presente trabalho foi utilizada como proteína modelo das albuminas a BSA.

De acordo com Schweitzer (2006), a estrutura primária da Albumina é formada por uma única cadeia de aminoácidos. A sua estrutura secundária é composta, em cerca de 67%, por α -hélice de 6 voltas e 17 pontes de dissulfeto. A estrutura terciária é composta por três domínios (Figura 5), formando uma estrutura globular. São eles:

Figura 5 - Estrutura espacial da HSA.



Fonte: Schweitzer (2006).

- Domínio I (azul escuro) – compreende aos resíduos de aminoácidos de 1 à 191 e consiste na região onde ocorrem maiores interações com Hg^{2+} , Au^+ , ácidos graxos, triptofano, warfarina, corantes e compostos com anéis alicíclicos;

- Domínio II (azul claro) - compreende aos resíduos de aminoácidos de 192 à 379 e consiste na região onde ocorrem maiores interações com a bilirrubina, digitoxina, ácidos graxos de cadeias curtas, corantes e outras drogas;
- Domínio III (verde) – compreende aos resíduos de aminoácidos de 380 à 580 e consiste na região onde ocorrem maiores interações com ácidos graxos de cadeias curtas e constitui o maior sítio de ligação de drogas.

Silva (2015) relata sobre os diferentes isômeros conformacionais da BSA formados em diferentes valores de pH. A forma “N” denominada como normal é encontrada em pH neutro; A forma “B” ocorre em pH básico acima de 8,0; A forma “F” ocorre quando submetido a uma mudança brusca para pH inferior a 4,0; A forma “E” compreende sua versão expandida com pH inferior a 3,5. Durante a transição N-F, tem-se um acréscimo significativo na viscosidade intrínseca, menor solubilidade e uma redução significativa no teor helicoidal, caracterizados pela forma F. Com o auxílio da microscopia eletrônica, é possível observar a molécula de BSA como uma série de bolas e cordas quando em faixas de pH inferior a 4,0, em que ocorre a transição F-E. Quando a BSA se encontra na forma “N”, sua estrutura é mais compacta, diferente da forma “F”, na qual se encontra parcialmente aberta (MICHNIK *et al.*, 2005; GAO *et al.*, 2007; BABCOCK e BRANCALEON, 2013).

2.6 Soro do Leite Bovino

O soro do leite consiste em uma porção aquosa de cor amarela esverdeada, decorrente da produção de queijos, composta em sua grande parte por água e, em menores quantidades, por lactose, proteínas, minerais, vitaminas e gorduras. A Tabela 2 apresenta a composição química média dos dois tipos de soro do leite, porém vale ressaltar que essa composição pode variar de acordo com a procedência, raça, alimentação do animal, idade, dentre outros fatores. O soro doce é proveniente da coagulação da caseína utilizando a enzima renina resultante da produção de queijos duros (Reino e Provolone), semi-duros (comté e Emmental) ou macios (Brie e Camembert). Sua aplicação na indústria alimentícia está voltada para encorpar produtos da panificação, sorvetes e sobremesas lácteas. Outra variedade é o soro ácido, decorrente da precipitação da caseína com ácidos clorídrico ou lático, resultante de queijos frescos como ricota e requeijão. Pode ser aplicado na indústria de alimentos como emulsificante, para realçar o sabor de molhos e reter água (BALDASSO *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2012; CARDOSO, 2014; ZHAO *et al.*, 2014; GANJU e GOGATE, 2017).

Tabela 2 - Composição química do soro do leite dos tipos doce e ácido.

Componentes	Tipo de soro	
	Soro doce	Soro Ácido
Água (%)	93,0 – 94,0	94,0 – 95,0
Matéria seca (%)	5,0 – 6,0	5,0 – 6,0
Lactose (%)	4,5 – 5,0	3,8 – 4,3
Lipídeos (%)	0,3	0,1
Ácido láctico (%)	Traços	≥ 0,8
Proteínas totais (%)	0,8 – 1,0	0,8 – 1,0
Proteínas do soro (%)	0,6 – 0,65	0,6 – 0,65
Ácido cítrico (%)	0,1	0,1
Minerais (%)	0,5 – 0,7	0,5 – 0,7
pH	6,2 – 6,4	4,6 – 5,0
Acidez Titulável (°D)	11,5	-

Fonte: Oliveira (2009) e Tsakali *et al* (2010).

A indústria tem buscado maneiras de aproveitar o potencial nutritivo ainda presente no soro do leite, devido ao grande volume gerado na produção de queijos e, também, ao impacto ambiental que pode gerar, caso seja descartado sem tratamento prévio. Na indústria alimentícia, seu potencial em reter água, bem como o seu poder emulsificante, tem sido aproveitado através da sua inserção em produtos da panificação, iogurtes, sorvetes, sobremesas lácteas. Uma vertente que ganhou destaque nos últimos anos foi a utilização das proteínas do soro do leite como suplementos alimentares, pois estas são tidas como proteínas completas, ou seja, apresentam todos os aminoácidos essenciais ao homem (BALDASSO *et al.*, 2011; ALVES *et al.*, 2014).

Cerca de 20 a 30% das proteínas presentes no leite bovino correspondem às proteínas do soro do leite, predominando a β -Lg, α -La e BSA, as quais compreendem em torno de 70% das proteínas do soro do leite (ALMEIDA *et al.*, 2015). O conteúdo de proteínas presentes no soro do leite bovino e seus aminoácidos são apresentados nas Tabelas 3 e 4, a seguir.

Tabela 3 - Conteúdo protéico do soro do leite bovino.

Proteínas	Concentração (g/ L)
I. Lactosoro	
	5 – 7
β -lactoglobulinas	2 – 4
α -lactalbuminas	0,6 - 1,7
Albumina sérica	0,2 - 0,4
Imunoglobulinas	0,5 - 1,8
II. Proteínas da membrana do glóbulo de gordura	
Proteínas da zona A	Proteínas da zona C
Proteínas da zona B	Proteínas da zona D
III. Proteínas em menores quantidades	
Transferrina sérica	Ceruloplasmina
Lactoferrina	Inibidor de tripsina
Microglobulina - β 2	Cininogêneo
Glicoproteínas - M1	Proteína de ligação ao folato
Glicoproteínas - M2	Glicoproteína ácida - α 1 ou oxosonuróide
Proteína de ligação à vitamina B12	

Fonte: Aditivos e Ingredientes (2013).

Tabela 4 - Aminoácidos presentes nas proteínas majoritárias do soro do leite.

Aminoácidos	BSA	β-Lg	α-La
Aspartato/ Asparagina	41	11/ 5	9/ 12
Treonina	34	8	7
Serina	28	7	7
Glutamato/ Glutamina	59/20	16/ 9	8/ 5
Prolina	28	8	2
Glicina	16	3	6
Alanina	46	14	3
L/ Cys SH	0	1	0
Cisteína	35	4	8
Valina	36	10	6
Metionina	4	4	1
Isoleucina	14	10	8
Leucina	61	22	13
Tirosina	19	4	4
Fenilalanina	27	4	4
Lisina	59	15	12
Histidina	17	2	3
Arginina	23	3	1
Triptofano	2	2	4
Asx	13	0	0
Total	582	162	123

Fonte: Schweitzer (2006); Oliveira (2009).

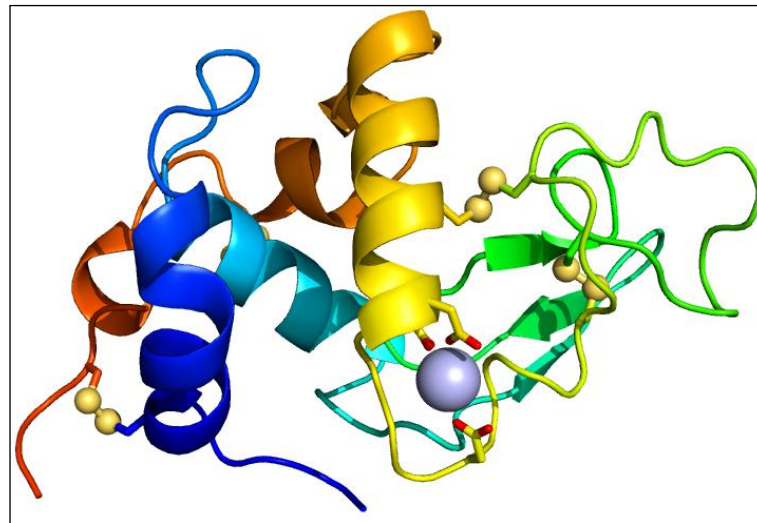
Atualmente, o *whey protein* encontra-se disponível no mercado em três formas: *Whey Protein Concentrado* (WPC) – como o próprio nome sugere, o soro é apenas concentrado, apresentando cerca de 80% de proteínas e percentuais de lactose e gordura;

Whey Protein Isolado (WPI) – para obtenção deste produto o soro passa por etapas de purificação e isolamento das proteínas; *Whey Protein* Hidrolisado (WPH) – neste, as proteínas isoladas sofrem uma etapa de hidrólise para a liberação dos aminoácidos, consistindo em uma forma mais fácil de obtenção dos aminoácidos. As demandas pelos produtos apresentados são em grande parte por atletas, os quais buscam suplementos proteicos para melhorar o rendimento em suas atividades, bem como para compor alimentos voltados para crianças e adultos que apresenta problemas de intolerância a lactose (SANTOS *et al.*, 2012; ADITIVOS e INGREDIENTES, 2013; PA’EE *et al.*, 2015).

2.6.1 α -Lactoalbumina

A α -La e a β -Lg são moléculas globulares, porém a primeira é um pouco menor, sendo constituída por 123 aminoácidos, perfazendo uma massa molecular de 14,2 kDa e seu ponto isoelétrico encontra-se na faixa de 4,2 – 5,1. Dentre suas funcionalidades, podem ser citadas sua atuação na biossíntese da lactose na glândula mamária lactante, bem como a capacidade de ligação de sítios da sua molécula a minerais como o cálcio e o zinco, o que contribui positivamente para sua absorção e para que a proteína não desnature em baixas temperaturas. Algumas pesquisas têm apontado benefícios, como regulação do sono e melhora do humor, bem como sua ação antimicrobiana contra as bactérias patogênicas *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*. A Figura 6 ilustra a estrutura da α -La, a qual é composta basicamente por 2 domínios. O maior composto por 4 α -hélices: hélice A na cor azul escuro; hélice B na cor azul claro; hélice C na cor amarelo; hélice C na cor laranja. O segundo domínio apresenta folha β (na cor verde), os quais encontram-se ligados ao cálcio (bolas na cor roxa). As bolas amarelas indicam os átomos de enxofre das ligações de dissulfeto (JØHNKE e PETERSEN (2012); ADITIVOS e INGREDIENTES, 2013; GENG *et al.*, 2015; LAM e NICKERSON, 2015; ZHAO *et al.*, 2015).

Figura 6 - Estrutura tridimensional da α -lactoalbumina.

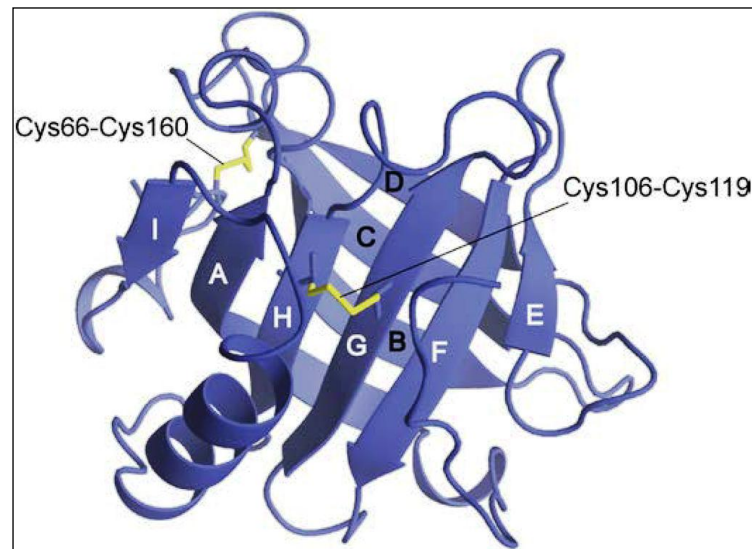


Fonte: Jøhnke & Petersen (2012).

2.6.2 β -Lactoglobulina

Apresentando uma massa molecular de 18,4 kDa, a β -Lg (Figura 7) é uma proteína globular constituída por 162 aminoácidos, sendo a maioria aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA), com ponto isoelétrico de 5,2. Pertencente à família lipocalina, a qual tem como característica a disposição de folhas β antiparalelas de frações da sua molécula. Estas disposições se arranjam assemelhando-se a um cálice ou barril achatado, os quais podem se ligar e transportar outras moléculas, como vitaminas e sais minerais, no seu interior. Responsável por algumas propriedades bioativas e funcionais, a β -Lg vem a ser encontrada no leite de várias espécies mamíferas, exceto no homem. Ainda é associada por desencadear reações alérgicas em alguns indivíduos, promovendo uma demanda por *whey protein* sem β -Lg. Porém, atua como agente anti-hipertensivo, antioxidante, antimicrobiano, além de ser responsável por atividades hipoglicêmicas. Além disso, sua forma hidrolisada pode ter aplicação na indústria alimentícia (CHEISON, *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2014; KALAIVANI e REGUPATHI, 2015; LEEB *et al.*, 2015; LOCH *et al.*, 2015).

Figura 7 - Estrutura tridimensional da β -lactoglobulina.



Fonte: Ikeguchi (2014).

A β -Lg, assim como a maioria das proteínas, é termolábil, porém sabe-se que as proteínas BSA, lactoferrina e IgG apresentam maior sensibilidade ao emprego de temperatura elevadas. Quando o soro do leite é submetido a algum tratamento térmico na ausência de caseínas, as proteínas tendem a se aglomerar. Adicionalmente, quando o leite é aquecido acima de 80 °C, prontamente a β -Lg e a κ -caseína formam ligações covalentes. Assim, no processamento de alimentos com base protéica empregando uso de temperaturas é importante ter conhecimento sobre a solubilidade e estabilidade ao calor das proteínas (McSWEENEY *et al.*, 2004; OUTINEN *et al.*, 2010).

2.7 Planejamento Experimental

Ao dar-se início a uma pesquisa, alguns questionamentos devem ser realizados para melhor condução dos experimentos: “Quais variáveis são importantes neste estudo?”, “Quais os níveis das variáveis serão trabalhados?”, “Qual a sequência de estudo?”, “O que será o fator resposta?”, “Como otimizar o experimento com o mínimo de análises possíveis?” (ZAMORA *et al.*, 2005).

Barros Neto *et al* (2001) exemplificam a problemática de muitas pesquisas, onde é necessário investigar muitos parâmetros ao mesmo tempo o que acarreta em uma grande quantidade de experimentos. Como ferramenta para auxiliar nessa questão é apresentado o uso do Delineamento experimental, o qual é fundamentado em princípios estatísticos,

permitindo assim, que o pesquisador possa extrair o máximo de dados possíveis realizando o mínimo de experimentos.

Sousa (2015) relata a importância de se estudar a influência dos parâmetros e suas interações na obtenção dos melhores resultados em pesquisas científicas, uma vez que ao investigar a variação de apenas um parâmetro o pesquisador pode ser induzido ao erro. Assim, algumas ferramentas estatísticas são bastante empregadas para melhor organização, otimização dos gastos e tempo, e também para melhor análise dos resultados.

Os delineamentos mais comuns são os fatoriais, podendo ser representados por b^k , onde “ b ” corresponde aos níveis avaliados e “ k ” ao número de variáveis independentes. O Delineamento Composto Central (DCC) foi introduzido por Box e Wilson (1951) como evolução do delineamento 3^k . Compõem-se por três partes: cúbica (fatorial), axial (α) e central (MENDONÇA, 2012). A parte fatorial compreende a análise simultânea de todos os parâmetros em estudo, $n_{fat} = b^k$. A parte axial é definida por $n_{ax} = 2k$, onde todos os níveis são nulos, exceto em α (ou $-\alpha$), sendo $\alpha = \sqrt[4]{n_{fat}}$. Os pontos centrais são utilizados para medir o erro puro e estabilizar a variância da resposta. Para isso são realizados 3 a 5 repetições quando α estiver próximo de \sqrt{k} (BARROS NETO *et al.*, 2001).

A Metodologia de Superfície de Resposta (MSR), uma das ferramentas mais difundidas nas pesquisas, constitui-se de duas etapas: modelagem e deslocamento, as quais são realizadas inúmeras vezes até encontrar uma região ótima onde se encontra os melhores resultados para a variável resposta. A MSR tem como principal vantagem o fato de seus resultados serem resistentes aos impactos quando em condições não ideais, simplicidade analítica, redução de custos e tempo e a aquisição de curvas “iso-resposta”, permitindo a obtenção do mesmo resultado em combinações diferentes entre os níveis das variáveis independentes (BARROS Neto *et al.*, 2001; PERÁZIO, 2012; MENDONÇA, 2012).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste tópico serão apresentadas as amostras e metodologias empregadas nos processos de separação e/ou purificação de proteínas de interesse industrial nas matrizes de soro do sangue humano e soro do leite bovino. Todas elas encontram-se pontuadas nas seguintes seções:

- 3.1 Amostras;
- 3.2 Ensaio de purificação da IgG do soro do sangue humano;
- 3.3 Levantamento de dados fundamentais da BSA nos modos batelada e leite fixo;
- 3.4 Purificação das proteínas do soro do leite bovino em leite fixo;
- 3.5 Purificação das proteínas do soro do leite bovino em leite expandido.

3.1 Amostras

No presente estudo foram utilizadas como amostras as proteínas puras IgG humana, adquirida da Sigma Aldrich (USA), BSA, obtida da INLAB (BRASIL) e amostras de soro do sangue humano, também da Sigma Aldrich (USA).

O soro do leite bovino do tipo doce utilizado para esse trabalho, proveniente da produção de queijo coalho, foi adquirido em uma fazenda agrícola localizada no município de Pentecoste a 89 Km de Fortaleza. As amostras foram coletadas em frascos plásticos, devidamente higienizados, transportadas sob refrigeração (4 – 8 °C) e armazenadas em freezer à -18 °C. Antes de serem utilizadas em experimentos, essas amostras foram caracterizadas para conhecimento de sua composição e assim identificar quais técnicas a serem empregadas para pré-tratamento.

3.1.1 Caracterização do Soro do Leite Bovino

A caracterização físico-química do soro do leite bovino foi realizada no Laboratório de Físico-Química dos Alimentos (LFQA) da Fundação Núcleo de Tecnologia do Estado do Ceará (NUTEC). Os parâmetros avaliados foram: Umidade, Lactose, Cinzas, Proteínas, Gordura e Acidez. A metodologia utilizada foi a descrita pelo Instituto Adolf Lutz (IAL, 2005) para leite e derivados.

3.1.1.1 Umidade

As cápsulas de porcelana foram secas em estufa a 105 °C durante 1 h, esfriadas em dessecador e pesadas. Pesaram-se 5 g da amostra homogeneizada, que foram acondicionadas nas cápsulas e levadas a estufa durante 2 horas, a temperatura de 85 °C. Em seguida foram resfriadas em dessecador até a temperatura ambiente e pesadas. Repetiram-se as operações de aquecimento (30 minutos na estufa) e resfriamento até peso constante. Por fim, o teor de umidade foi calculado pela Equação 03:

$$\frac{100 \cdot N}{P} = \frac{g}{100 \text{ g}} \quad (03)$$

sendo: N a massa de umidade em gramas (perda de massa em g); P a massa da amostra em gramas.

3.1.1.2 Lactose

Em um balão de 100 mL foram adicionados 10 mL da amostra de soro do leite bovino, 50 mL de água destilada, 2 mL de solução de sulfato de zinco 30% e 2 mL de solução de ferrocianeto de potássio 15%. Agitou-se a mistura e deixou-a sedimentando por 5 min. Na sequência, o volume de 100 mL foi completado com água destilada e, novamente, agitado para ser filtrado em papel de filtro. Em outro recipiente foi preparada uma mistura com 10 mL de cada uma das soluções de Fehling e 40 mL de água destilada, aquecendo-as em chapa aquecedora até ebulição. Com o auxílio de uma bureta o filtrado foi adicionado gota a gota à solução em ebulição, agitando sempre, utilizando garra de madeira, até a mudança de coloração de azul para incolor. O teor de glicídios redutores expressos em lactose foi obtido pela Equação 04:

$$\text{Glicídeos redutores em lactose} = \frac{V \cdot 0,068 \cdot 100}{L \cdot v} \quad (04)$$

sendo: V corresponde ao volume de diluição da amostra (100 mL); 0,068 é a massa em gramas de lactose que corresponde a 10 mL da solução de Fehling; L é o volume de amostra; v é o volume de filtrado gasto na titulação.

3.1.1.3 Cinzas

A análise do teor de cinzas consiste em um método gravimétrico da amostra antes e depois de aquecimento em mufla. Para isso, 20 mL da amostra de soro do leite bovino foram transferidos para um cadinho, previamente aquecido em mufla a 550 ± 10 °C por 2 h, resfriado em dessecador e pesado. Após evaporação da amostra em banho-maria até secagem, a amostra foi carbonizada em chapa aquecedora e incinerada em mufla a 550 ± 10 °C por 4 h, sendo em seguida resfriada em dessecador e pesada. Por fim, o teor de cinzas foi calculado pela Equação 05:

$$\text{Teor de cinzas (\%)} = \frac{100 \cdot P}{A} \quad (05)$$

Sendo: *P* correspondente ao peso em gramas de resíduo após incineração; *A* compreende ao volume de amostra utilizado.

3.1.1.4 Proteínas

Para determinação de proteínas foi empregado o método de Kjeldahl (AOAC, 1995), o qual se divide em três etapas: digestão, destilação e titulação. Para a digestão foi pesado 0,2 g da amostra em papel filtro livre de nitrogênio (N), o qual foi transferido para o tubo de Kjeldahl seguido de 10 g de uma mistura catalítica e 30 mL de ácido sulfúrico. Em uma capela essa mistura foi agitada e levada para uma chapa aquecedora a 450 °C até o conteúdo do balão adquirir uma coloração transparente esverdeada.

Para a etapa de destilação foram adicionados 200 mL de água destilada ao tubo de Kjeldahl para dissolver a amostra sendo, em seguida, resfriada em banho de gelo. Após esfriar, foi acrescentado aproximadamente 1,0 g de zinco em pó e, imediatamente, após o zinco, adicionaram-se 100 mL de NaOH 40%. No bico do condensador, foi colocado um Erlenmeyer de 500 mL contendo 50 mL de solução de ácido sulfúrico (0,1 N) com 05 gotas do indicador vermelho de metila. Esperou-se a destilação até obter um volume em torno de 250 mL com uma cor vermelha, de forma a garantir que toda a amônia da amostra seja condensada. Por fim, a solução de ácido sulfúrico foi titulada com solução de Hidróxido de Sódio (0,1 N). A Equação 06 expressa o cálculo para obtenção do percentual de proteínas totais.

$$\text{Proteínas totais (\%)} = \frac{V \cdot f \cdot 0,0014 \cdot 6,38 \cdot 100}{P} \quad (06)$$

sendo: V o volume gasto de hidróxido de sódio (0,1 N); f o fator da solução de ácido sulfúrico (0,1 N); 0,0014 o miliequivalente grama de Nitrogênio; 6,38 o fator de conversão para produtos lácteos de Nitrogênio em proteína; P o peso da amostra.

3.1.1.5 Gordura

O método empregado para determinar o teor de gordura foi de Gerber (BRASIL, 2006), o qual fundamenta-se na adição de ácido sulfúrico e álcool isoamílico para quebra da emulsão do leite, promovendo a separação da gordura da parte aquosa.

Para isso, 10 mL de ácido sulfúrico foram adicionados ao butirômetro. Em seguida, lentamente foram acrescentados 11 mL da amostra do soro do leite bovino e, posteriormente, 1 mL de álcool isoamílico. Depois de limpar o gargalo do butirômetro, o mesmo foi arrolhado e, com o auxílio de luvas, agitou-se a mistura. Por fim, as amostras foram centrifugadas à 1200 ± 100 rpm por 15 minutos. Após esse período, a camada de gordura foi manuseada para a escala do lactobutirômetro, em que o valor obtido na escala corresponde ao porcentual de gordura na amostra.

3.1.1.6 Acidez

A acidez consiste em um parâmetro mais qualitativo, indicando a “idade” do soro e seu estado de conservação. Quanto mais velho o soro, a tendência é que se torne mais ácido, pois os microrganismos presentes tendem a utilizar a lactose como alimento, acidificando o meio.

Assim, foram adicionadas 5 gotas de Fenolftaleína ao volume de 10 mL do soro do leite bovino, sendo titulado com solução de Hidróxido de Sódio (0,1 M) em seguida, até o aparecimento da cor rósea. Para o cálculo da acidez, expressa em ácido láctico, foi utilizada a Equação 07:

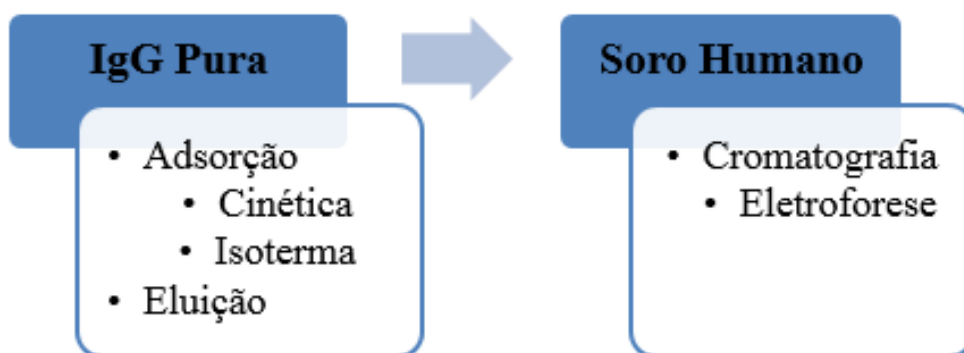
$$\text{Ácido Láctico (\% (m/v))} = \frac{V \cdot f \cdot 0,9}{A} \quad (07)$$

sendo: V o volume utilizado da solução de Hidróxido de Sódio; f o fator de correção da solução de Hidróxido de Sódio; A o volume de amostra utilizado; 0,9 o fator de conversão para ácido láctico.

3.2 Ensaios de purificação da IgG do soro do sangue humano

Nesta seção encontram-se descritos o levantamento das condições de adsorção e eluição da proteína pura IgG e aplicação destas condições em amostra de soro do sangue humano na sequência ilustrada no fluxograma da Figura 8, a seguir.

Figura 8 - Fluxograma experimental para os ensaios de purificação da IgG.



Fonte: Autoria própria.

3.2.1 Delineamento Experimental para estudos de adsorção da IgG

Para os ensaios de adsorção da IgG em batelada foi empregada a resina de modo misto Cpto MMC da GE Healthcare. Como reagentes foram utilizados Fosfato de Sódio Monobásico Monohidratado, Fosfato de Sódio Dibásico Heptahidratado e Cloreto de Sódio, os quais foram adquiridos da Vetec. Acetato de Sódio Anidro e Ácido Acético Glacial foram adquiridos da Dinâmica e Synth, respectivamente.

Para obtenção da condição ótima de adsorção foi realizado um planejamento experimental composto central onde se utilizou como solução tampão o Fosfato de Sódio nas concentrações definidas pelo planejamento experimental. As variáveis estudadas foram: pH, concentração do tampão (C_1) e concentração de NaCl (C_{Sal}). Na Tabela 5 são apresentados os parâmetros e os níveis estudados para a etapa de adsorção. Todos os níveis avaliados foram definidos de acordo com as faixas recomendadas pelo fabricante para a resina Cpto MMC, assim também como o pI da IgG.

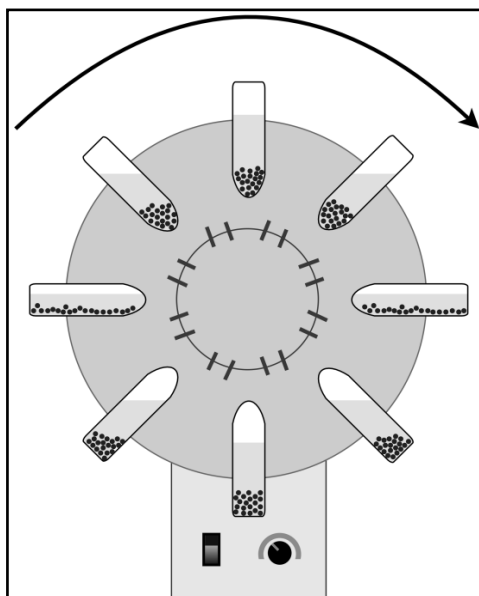
Tabela 5 – Parâmetros e níveis do planejamento composto central na etapa de adsorção da IgG na resina Capto MMC.

Parâmetros	Níveis				
	- α	-1	0	+1	+ α
pH	6,00	6,20	6,75	7,20	7,50
C_t (mM)	20,00	36,00	60,00	84,00	100,00
C_{sal} (M)	0,00	0,20	0,50	0,80	1,00

Fonte: Autoria própria.

Os ensaios de adsorção da proteína IgG foram realizados em um sistema com agitador rotativo com movimento em 360° de tubos (TECNAL, modelo TE-165), ilustrado na Figura 9, a 30 rpm e temperatura de 23 °C.

Figura 9 - Sistema de agitação rotatório empregado para os ensaios de adsorção em batelada.



Fonte: Adaptado de Gondim (2012).

Nos ensaios de adsorção foram utilizados um volume de 3 mL da solução da IgG, na concentração de 1 mg/ml, o qual foi mantido em contato com 10 mg do adsorvente por 1,5 h, período este, determinado preliminarmente através de uma cinética de adsorção. Após esse tempo, uma alíquota de 2 mL foi coletada em tubos cônicos para microcentrifugação a 10000 rpm por 10 min. Na sequência foi realizada leitura em espectrofotômetro da absorbância no

comprimento de onda de 280 nm. Como resposta obteve-se a quantidade adsorvida da IgG através da Equação 08:

$$q^* = \frac{V_{sol}(C_0 - C_{eq})}{m_{ads}} \quad (08)$$

sendo: q^* a quantidade adsorvida do soluto por grama de adsorvente (mg/g); C_{eq} a concentração de proteína na fase líquida (mg/mL) no equilíbrio; C_0 a concentração inicial de proteína na fase líquida (mg/mL); m_{ads} a massa de adsorvente (g); V_{sol} o volume da solução (mL) de proteína em contato com o adsorvente.

3.2.1.1 Cinética de Adsorção

Encontrada a condição ótima de adsorção dentre as condições do delineamento experimental fizeram-se testes em batelada para verificar o tempo de equilíbrio na cinética de adsorção da IgG. Para isso, mediram-se curvas de adsorção em três concentrações iniciais de IgG (1,0; 2,0 e 3,0 mg/mL) durante o tempo de 1 a 240 min.

Os dados cinéticos foram modelados pelo modelo de difusão paralelo ilustrado na Equação 09 (Liu *et al.*, 2006), onde considera-se que as difusões no poro e na superfície ocorrem de modo paralelo:

$$\varepsilon_p \left(\frac{\partial c_i}{\partial t} \right) + D_{ap} \frac{\partial q_i}{\partial t} = \varepsilon_p D_p \left(\frac{\partial^2 c_i}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial c_i}{\partial r} \right) + D_s D_{ap} \left(\frac{\partial^2 q_i}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial q_i}{\partial r} \right) \quad (09)$$

Sendo D_p e D_s os coeficientes de difusão no poro e na superfície no modelo de difusão paralelo, respectivamente.

As condições de contorno encontram-se ilustradas nas Equações 10 e 11:

$$r = 0; \frac{\partial c_i}{\partial r} = 0 \quad (10)$$

$$r = R; \varepsilon_p D_p \frac{\partial c_i}{\partial r} + D_{ap} D_s \frac{\partial q_i}{\partial r} = k_f (c_b - c_i) \quad (11)$$

A Equação 12 descreve o balanço de massa na fase líquida:

$$\frac{\partial c_b}{\partial t} = - \left(\frac{3vk_f}{RV} \right) (c_b - c_i) |_{r=R} \quad (12)$$

A condição inicial encontra-se ilustrada na Equação 13:

$$t = 0; c_b = c_0 \quad (13)$$

sendo: C_b a concentração global de proteínas na fase líquida, k_f o coeficiente de transferência de massa através do filme líquido, R o raio da partícula, v o volume do adsorvente e V o volume de líquido.

O k_f e a D_{AB} foram estimados de acordo com Geankoplis (2003) (Equações 14 e 15) e usados como valores de entrada no modelo:

$$k_f = \frac{2D_{AB}}{d} + 0.31 \left(\frac{\mu}{\rho D_{AB}} \right)^{-\frac{2}{3}} \left(\frac{\Delta\rho\mu g}{\rho^2} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (14)$$

Sendo D_{AB} é a difusividade molecular, d é o diâmetro da partícula, μ é a viscosidade da solução, ρ é a densidade da partícula, $\Delta\rho$ é a diferença entre a densidade da partícula e da solução e g é a gravidade.

$$D_{AB} = 9.4 \cdot 10^{-15} \frac{T}{\mu(M_A)^{\frac{1}{3}}} \quad (15)$$

Em que M_A é a massa molecular da proteína e T é a temperatura absoluta.

Para resolução do modelo foi utilizado o simulador comercial gPROMS (versão 3.2). Os sistemas matemáticos foram compostos por sistemas de equações diferenciais e algébricas parciais. Quanto ao domínio radial, este foi discretizado através de um método de colocação ortogonal de terceira ordem em elementos finitos. Os parâmetros de transferência de massa do sistema de batelada (D_p e D_s) foram estimados por meio de um pacote de otimização utilizando o método heterocedástico.

3.2.1.2 Isoterma de Adsorção

O estudo do efeito da concentração inicial da proteína IgG também foi realizado na melhor condição de adsorção por 3 h de contato a uma temperatura de 23 °C. Para realização dos ensaios foram avaliadas as concentrações iniciais 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0 mg/mL. O ajuste da isoterma foi conduzido pelo modelo da equação de Langmuir descrita pela Equação 02 descrita na seção 2.4.

3.2.2 Delineamento Experimental para estudos de Eluição da IgG

Um novo planejamento experimental composto central foi realizado no intuito de obter a melhor condição de eluição em coluna de leito fixo, uma vez que ao se realizar eluição em batelada as interações entre proteína e adsorvente tornam o processo mais lento (Almeida,

2003) podendo levar o processo ao equilíbrio e não atingir a recuperação total da proteína. Na Tabela 6 são apresentados os parâmetros e os níveis estudados para cada parâmetro, onde os mesmos foram definidos de acordo com as características da resina Capto MMC e da proteína IgG. Como tampão, utilizou-se tampão Acetato de Sódio com faixas de pH mais ácidas para favorecer a eluição da IgG.

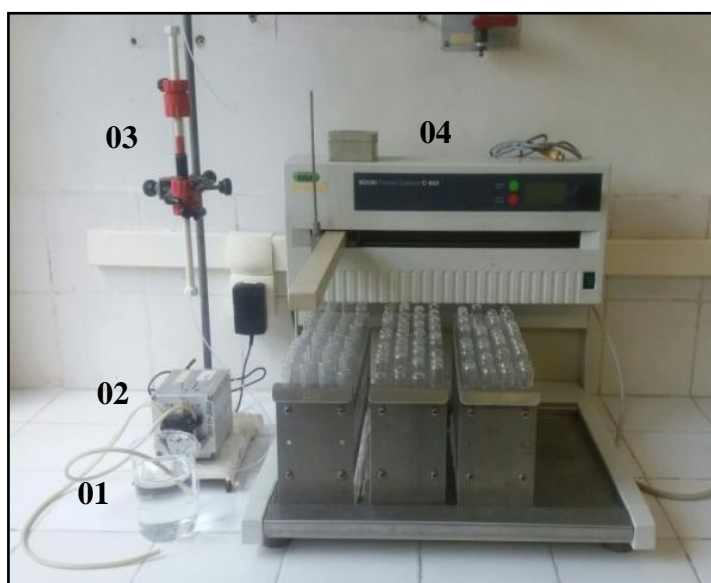
Tabela 6 – Parâmetros e níveis do planejamento composto central na etapa de eluição da IgG na resina Capto MMC.

Parâmetros	Níveis				
	- α	-1	0	+1	+ α
pH	3,60	4,10	4,60	5,20	5,60
C_t (mM)	20,00	56,40	110,00	163,60	200,00
C_{sal} (M)	0,00	0,20	0,50	0,80	1,00

Fonte: Autoria própria.

Os ensaios para a eluição se deram em um sistema cromatográfico (Figura 10) composto por uma bomba peristáltica (WATSON MARLOW), uma coluna de vidro (GE - 10 cm x 10mm) e um coletor de frações (BUCHI C-660).

Figura 10 - Sistema operacional em leito fixo composto por: **01**: Alimentação; **02**: Bomba peristáltica; **03**: Coluna; **04**: Coletor de frações.



Fonte: Autoria própria.

Assim, um volume de 10 mL da IgG, preparada na melhor condição de adsorção obtida no planejamento anterior, na concentração de 1,0 mg/mL foi percolada na coluna contendo 1,0 g de adsorvente na vazão determinada previamente de 0,8 mL/min. As etapas cromatográficas foram constituídas por: Alimentação; Lavagem; Eluição, onde foram testadas as condições do delineamento experimental; Regeneração com NaOH (1,0 M); Reequilíbrio. Amostras foram coletadas em todos os experimentos e analisadas quanto a concentração de IgG por espectrofotometria com leitura de absorbância no comprimento de onda de 280 nm.

Após a obtenção dos dados, utilizou-se o *software* OringinPro 8 (OriginLab Corporation) para tratamento dos dados. Para os dados referentes aos planejamentos experimentais fez-se uso do *software* Statistica 7 (Statsoft). Como resposta foi obtida o percentual de recuperação da IgG, onde relaciona as concentrações inicial e final de IgG, como mostra a Equação 16:

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{C_i - C_f}{C_i} \right) \cdot 100 \quad (16)$$

onde: C_i corresponde a concentração inicial e C_f a concentração final.

3.2.3 Soro de Sangue Humano

Uma vez definidas as condições de adsorção e eluição com a proteína comercial modelo, estas foram utilizadas para o estudo com amostras de soro de sangue humano na concentração total de proteínas de 5 mg/mL. Foi utilizado o mesmo sistema cromatográfico ilustrado na seção anterior (3.2.2). As frações foram coletadas na saída da coluna e o teor de proteínas totais foi quantificado pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

Inicialmente, foi preparado o reagente de Bradford diluindo-se 0,1 g de Coomassie Brilliant Blue em 50 mL de etanol sob agitação. Posteriormente, foram adicionados 100 mL de ácido fosfórico 85%, deixando-o em agitação por 2 h. No final desse período o volume da solução foi aferido para 1,0 L com água ultrapura. Na sequência, a solução ficou sob agitação *overnight* (mínimo de 6 h), filtrando-se o reagente no final e conservando-o em geladeira. Vale ressaltar que todos os frascos utilizados para preparo do reagente de Bradford foram cobertos com papel alumínio. Após preparo do reagente, foi realizada a curva de calibração com a proteína BSA para quantificação das amostras dos ensaios de adsorção. Para quantificação foram realizadas leituras das amostras iniciais (utilizada como alimentação) e finais (amostras coletadas nas etapas da corrida cromatográfica). Assim, para cada 20 µL de amostra utilizou-se 1,0 mL do reagente de Bradford, o qual foi mantido em contato por 10 min em cubetas de poliestireno na ausência de

luz. Por fim, foram realizadas as leituras das amostras em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm.

Ensaio de eletroforese SDS-PAGE em condições desnaturantes e não redutoras com géis de poliacrilamida 7,5% foram utilizados para verificar a separação e/ou purificação da IgG, de acordo com a metodologia proposta por Laemmli (1970). As amostras analisadas foram aquecidas a 100 °C por 10 min e uma alíquota de 10 µL de cada fração foram aplicadas aos géis. A corrida eletroforética ocorreu a uma voltagem de 150 V em cubas verticais e a revelação dos géis se deu com o corante comassie brilhante *blue*.

3.3 Levantamento de dados fundamentais da BSA nos modos batelada e leito fixo

Nesta seção encontram-se descritas as metodologias utilizadas para obtenção das condições de adsorção e eluição para a proteína BSA pura, na sequência experimental ilustrada na Figura 11.

Figura 11 - Fluxograma experimental para os ensaios de adsorção e eluição da BSA na resina Capto MMC.



Fonte: Autoria própria.

3.3.1 Delineamento Experimental para estudos de Adsorção da BSA

Para composição dos tampões foram utilizados Fosfato de Sódio Monobásico Monohidratado, Fosfato de Sódio Dibásico Heptahidratado e Cloreto de Sódio provenientes da Vetec. Acetato de Sódio Anidro e Ácido Acético Glacial foram adquiridos da Dinâmica e Synth, respectivamente. A resina foi empregada nesse estudo foi a Capto MMC adquirida da GE Healthcare.

Para obtenção das condições ótimas de adsorção para BSA utilizando a Capto MMC como adsorvente foi realizado um Delineamento Experimental Composto Central, onde foi verificada a influência dos parâmetros: pH, C_t e C_{sal} . As faixas e os níveis para cada parâmetro encontram-se descritas na Tabela 7. Os níveis avaliados foram determinados, assim como para a IgG, de acordo com as especificações do fabricante para a resina Capto MMC e pI da BSA. Esta etapa foi conduzida em um sistema com agitador rotativo com movimento em 360 ° de tubos (TECNAL, modelo TE-165) a 30 rpm e temperatura de 23 °C. A metodologia empregada nesta etapa encontra-se descrita na seção 3.2.1.

Tabela 7 – Parâmetros e níveis do planejamento composto central na etapa de adsorção da BSA na resina Capto MMC.

Parâmetros	Níveis				
	- α	-1	0	+1	+ α
pH	4,60	4,80	5,00	5,20	5,40
C_t (mM)	26,40	40,00	60,00	80,00	93,60
C_{sal} (M)	0,20	0,50	0,90	1,30	1,60

Fonte: Autoria própria.

3.3.1.1 Cinética de Adsorção

Uma vez obtida às condições ótimas de adsorção da BSA na resina Capto MMC, estas foram aplicadas nos ensaios de cinética, as quais foram realizadas nas concentrações de 1,0; 2,0 e 3,0 mg/mL. Para a realização destes ensaios seguiu-se a mesma metodologia descrita na seção 3.2.1.1, diferindo apenas no tempo de contato de 3 h, o qual foi determinado previamente.

Assim como nos ensaios com a proteína IgG, os dados cinéticos obtidos para a BSA foram modelados pelo modelo de difusão paralelo. A descrição do modelo adotado encontra-se também descrita na seção 3.2.1.1, bem como as equações dos parâmetros estimados, D_{AB} e k_f .

3.2.1.2 Isoterma de adsorção

Os dados referentes à isoterma de adsorção da BSA foram realizados através de ensaios em batelada nas melhores condições de adsorção encontradas. A metodologia que se seguiu encontra-se descrita na seção 3.2.1.2. As concentrações iniciais de BSA variaram de 0,5 a 7,0 mg/mL. 3 mL de cada solução foram mantidas em contato em 10 mg do adsorvente por 2 h a uma temperatura de 23 °C. O ajuste da isoterma de adsorção se deu pelo modelo da equação de Langmuir (Equação 02) descrita na seção 2.4.

3.3.2 Delineamento Experimental para estudos de Eluição da BSA

Para a obtenção da condição ótima de eluição foi elaborado um novo Delineamento Experimental Composto Central tendo como variáveis: pH, C_t e C_{sal} . Na Tabela 8 encontram-se os níveis e as faixas avaliadas para cada parâmetro. Os ensaios para a etapa de eluição foram conduzidos em um sistema cromatográfico composto por uma bomba peristáltica (Watson Marlow, Reino Unido), uma coluna de vidro C 10/10 (10 cm x 10 mm), adquirida junto a GE Healthcare (USA), empacotada com 250 mg do adsorvente Capto MMC seco e um coletor de frações (Buchi, Brasil). A metodologia empregada nesta etapa é semelhante à descrita na seção 3.2.2.

Tabela 8 – Parâmetros e níveis do planejamento composto central na etapa de eluição da BSA na resina Capto MMC.

Parâmetros	Níveis				
	- α	-1	0	+ 1	+ α
pH	6,00	6,60	7,50	8,40	9,00
C_t (mM)	20,00	26,00	35,00	44,00	50,00
C_{sal} (M)	0,50	0,70	1,00	1,30	1,50

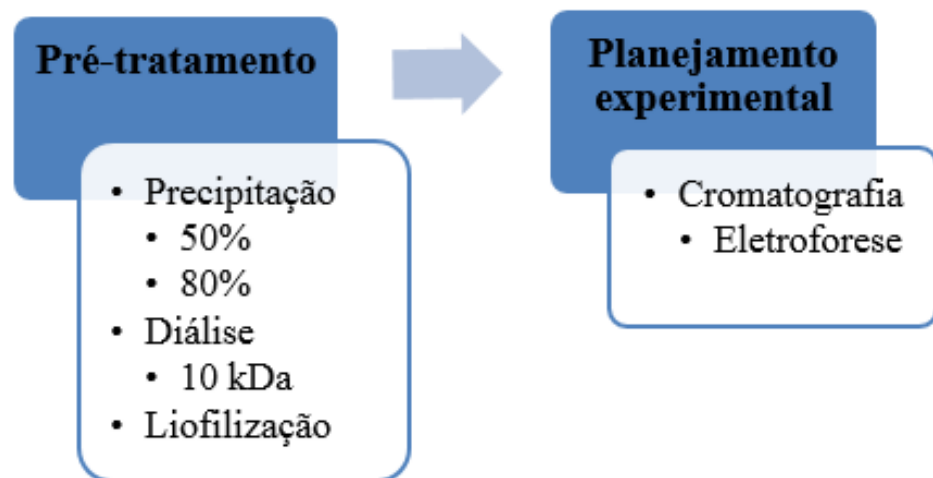
Fonte: Autoria própria.

Como resposta foi obtida o percentual de recuperação da BSA, onde relaciona as concentrações inicial e final de BSA, como mostra a Equação 16 descrita na seção 3.2.2.

3.4 Purificação das proteínas do soro do leite bovino em leito fixo

Nesta seção serão descritas as técnicas de extração e purificação de proteínas utilizadas nas amostras de soro do leite bovino na sequência experimental ilustrada na Figura 12.

Figura 12 - Fluxograma experimental dos ensaios de purificação das proteínas do soro do leite bovino em leito fixo com na resina Capto MMC.



Fonte: Autoria própria.

3.4.1 Tratamento do Soro do Leite Bovino

Para purificação das proteínas, ou de qualquer outro constituinte do soro do leite bovino, por métodos cromatográficos em leito fixo têm-se a necessidade de tratamentos prévios. Caso contrário, o material particulado presente na amostra poderá causar entupimento do leito empacotado, inviabilizando o processo. A seguir encontra-se descrito a metodologia adotada para tratamento do soro do leite bovino, a qual viabilizou seu uso em processos cromatográficos em leito fixo.

3.4.1.1 Precipitação do Soro do Leite Bovino

Na literatura pode-se verificar que a maioria dos estudos emprega sulfato de amônio 80% para precipitação de proteínas. Porém, em um estudo realizado por Mao *et al.*, (2017) foi avaliada a concentração de sulfato de amônio para precipitação das proteínas α -La

e β -Lg. Neste estudo pode-se verificar que a concentração de 50% apresenta ótimas concentrações das proteínas α -La e β -Lg, no entanto, têm a presença de interferentes. Com o aumento da concentração de sulfato de amônio para 60%, os interferentes foram eliminados, todavia, as concentrações das proteínas α -La e β -Lg foram reduziram a níveis que não seria vantajoso. Dessa maneira, realizou-se a precipitação das proteínas com sulfato de amônio 50 e 80% a fim de verificar o que melhor se aplica ao nosso estudo.

3.4.1.2 Diálise

Após a precipitação com sulfato de amônio faz-se necessário a dessalinização da amostra. Para isso, foi realizada a etapa de diálise utilizando sacos de diálise (10 kDa, 21 mm x 30 cm) adquiridos da Sigma-Aldrich (USA).

Assim, foram adicionados 30 mL da amostra precipitada com sulfato de amônio em cada saco de diálise, os quais permaneceram imersos em 4 L de água deionizada por 2 h sob refrigeração. Após esse período, a água foi substituída mais uma vez, ficando *overnight* sob refrigeração. A condutividade da água foi monitorada através de um condutivímetro portátil da PHtek (Brasil), de maneira que as amostras só foram retiradas dos sacos quando a condutividade encontrava-se nula.

3.4.1.3 Liofilização

Durante a etapa de diálise ocorre o processo de osmose, ou seja, a transferência do sal e da água deionizada através da membrana. Com isso, tem-se o aumento do volume de amostra dentro do saco de diálise o que acarreta na diluição da amostra. Assim, faz-se necessário a concentração da amostra. Ao se trabalhar com proteínas não é apropriado o emprego de altas temperaturas, pois acarretaria na desnaturação da mesma. Assim, as amostras foram concentradas através da liofilização. As amostras foram congeladas em freezer a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ e submetidas à baixa pressão, condições que acarretam na sublimação da água presente na amostra.

A liofilização das amostras foi realizada no Laboratório de Físico-Química dos Alimentos (LFQA) da Fundação Núcleo de Tecnologia do Estado do Ceará (NUTEC) no liofilizador adquirido junto a Liobras (Brasil).

3.4.2 Ensaios Cromatográficos em leito fixo

As condições operacionais utilizadas nos ensaios cromatográficos foram determinadas através de um delineamento experimental 2^3 mais 3 pontos centrais. Os parâmetros avaliados foram: pH de adsorção (pH_{ads}), pH de eluição (pH_{elu}) e tempo de eluição (t_{elu}). As faixas de pH das etapas de adsorção e eluição foram determinadas de acordo com o pI das principais proteínas presentes no soro do leite bovino (α -La, β -Lg e BSA). Quanto ao tempo, tomou-se como base o tempo de eluição utilizado nos ensaios de eluição com BSA pura. As faixas e os níveis avaliados para cada parâmetro encontram-se ilustradas na Tabela 9.

Tabela 9 – Parâmetros e níveis avaliados para os ensaios cromatográficos com soro do leite bovino na resina Capto MMC.

Parâmetros	Níveis		
	-1	0	+1
pH_{ads}	4,40	4,80	5,20
pH_{elu}	6,00	6,75	7,50
t_{elu} (min)	15,00	20,00	25,00

Fonte: Autoria própria.

Os ensaios cromatográficos foram realizados no equipamento para cromatografia Contichrom adquirido da Knauer (Alemanha), ilustrado na Figura 13. Este equipamento é composto por um conjunto de bombas peristálticas que transportam as soluções até a coluna, a qual está conectada a um detector UV-VIS. A resposta do detector é transformada em um cromatograma. Este sistema difere do utilizado nos ensaios com proteínas puras (ilustrado na Figura 10), por ser um sistema automático, permite o monitoramento da condutividade, assim também como a realização de gradientes na etapa de eluição, ferramenta muito importante em ensaios de purificação de proteínas. O sistema de coleta de frações também se dá de maneira automática.

Figura 13 - Sistema FPLC – Contichrom (do inglês *Fast Protein Liquid Chromatographic*).



Fonte: Autoria própria.

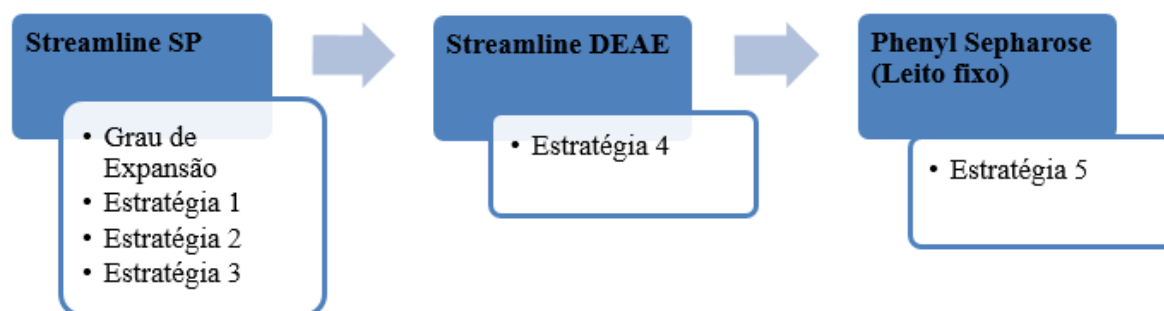
A coluna C10/10 obtida da GE Healthcare (USA) empacotada com 250 mg de Capto MMC adquirida também da GE Healthcare (USA) foi equilibrada por 40 min com tampão Acetato de Sódio 40 mM, no pH de adsorção respectivo de cada ensaio. Posteriormente, foram realizadas as etapas de alimentação, lavagem, eluição, regeneração e re-equilíbrio. Vale ressaltar que na etapa de eluição foi realizado um gradiente linear decrescente salino de 1 – 0,2 M com NaCl. Em todos os ensaios foram aplicados com 1 mL de soro do leite bovino em fase móvel com vazão constante de 0,8 mL/min e comprimento de onda de 280 nm.

Nos ensaios que apresentaram separação de picos na etapa de eluição, os pontos referentes aos picos foram analisados por Eletroforese SDS-PAGE em condições não redutoras com géis de poliacrilamida para verificar a separação e/ou purificação das proteínas. Dessa maneira, foram preparados géis de separação 12% e concentração 5%, os quais foram revelados com nitrato de prata de acordo com a metodologia descrita por MORRISSEY (1981).

3.5 Purificação das proteínas do soro do leite bovino em leite expandido

Os ensaios em leite expandido foram conduzidos no Laboratório de Engenharia Bioquímica do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. A Figura 14 ilustra o fluxograma experimental dos ensaios em leite expandido.

Figura 14 - Fluxograma experimental dos ensaios em leito expandido com amostras de soro do leite bovino.



Fonte: Autoria própria.

3.5.1 Coluna

Para os ensaios em leito expandido foi utilizada uma coluna de vidro com diâmetro de 2,64 cm e altura de 30,00 cm, a qual foi projetada e confeccionada na Universidade Federal do Rio Grande do Norte especificamente para ensaios em leito expandido. Na base da coluna encontra-se um distribuidor de vazão e a expansão do leito pôde ser ajustável através do pistão móvel que passa pelo interior da coluna.

3.5.2 Resinas

As resinas do grupo *Streamline* compõem um grupo de resinas confeccionadas para uso em leito expandido. Estas são compostas por uma matriz de agarose acrescida de quartzo cristalino em seu núcleo, conferindo-lhe condições de fluidização. A *Phenyl Sepharose* apresenta matriz a base somente de agarose reticulada.

Para os ensaios em leito expandido foram utilizadas as resinas de troca iônica *Streamline SP* (catiônica) e *Streamline DEAE* (aniônica) em condições de leito expandido e a *Phenyl Sepharose* (hidrofóbica) em condições de leito fixo. Para isso, foi mantida a mesma proporção dos volumes de alimentação e leito empacotado empregados nos ensaios em leito fixo. Os grupos funcionais das resinas avaliadas encontram-se destacados na Tabela 10.

Tabela 10 - Grupos funcionais das resinas *Streamline SP*, *Streamline DEAE* e *Phenyl Sepharose*.

Trocador	Grupo Funcional
Sulfopropil (SP)	-O-CH ₂ -CHOH-CH ₂ -O-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ SO ₃
DEAE	-O-CH ₂ -CH ₂ -N + H(CH ₂ CH ₃) ₂
<i>Phenyl Sepharose</i>	-O-CH ₂ -CH(OH)-CH ₂ -O-C ₆ H ₅

Fonte: Autoria própria.

3.5.3 Grau de Expansão do leito

O Grau de Expansão (GE) do leito consiste em um importante parâmetro para estudo da hidrodinâmica dos processos em leito expandido, uma vez que ele define a expansão, bem como a estabilidade do leito. É um parâmetro que expressa a razão entre a altura do leito expandido (H) e a altura inicial (H_0) para uma determinada velocidade, como expressa a Equação 17.

$$GE = \frac{H}{H_0} \quad (17)$$

Para determinação do GE foi utilizado tampão fosfato 40 mM pH 7,5 e como resina modelo, a *Streamline SP*, visto que as resinas *Streamline SP* e DEAE apresentam densidades semelhantes. Com H_0 de 5,2 cm, avaliou-se os perfis de expansão e a estabilidade da resina em três velocidades superficiais (252; 296 e 362 cm/h).

3.5.4 Condições Cromatográficas

Para os ensaios em leito expandido utilizando as resinas *Streamline SP* foram testadas as condições operacionais de adsorção e eluição obtidas nos ensaios em leito fixo com a resina Capto MMC. As condições de adsorção e eluição obtidas nos ensaios em leito fixo com a resina Capto MMC foram reproduzidas nos ensaios em leito expandido com a resina *Streamline SP* (primeira estratégia). Na segunda estratégia, foram avaliadas as condições reportadas por Cavalcanti (2010). Além delas, em uma terceira condição realizou-se um gradiente linear decrescente de pH na etapa de eluição. Estes compreendem os três primeiros testes descritos na Tabela 11. Uma vez realizados os três testes iniciais, a melhor condição foi empregada para testes sequenciais, em que as frações de passante (alimentação e lavagem) e de eluição foram coletadas para serem alimentadas em novos processos em leito

expandido utilizando a *Streamline* DEAE e em leito fixo com a *Phenyl Sepharose*, respectivamente. As condições utilizadas para estes ensaios (4° e 5°, respectivamente) encontram-se descritas na Tabela 11.

Tabela 11 - Condições cromatográficas avaliadas para as resinas *Streamline SP*, *Streamline* DEAE e *Phenyl Sepharose*.

Resina	Estratégia	Etapa	Condição
SP	1	Adsorção	Tampão Acetato (40 mM pH 5,2)
		Eluição	Tampão Fosfato (40 mM pH 7,5) + NaCl 1 M
	2	Adsorção	Tampão Fosfato (40 mM pH 7,5)
		Eluição	Tampão Fosfato (40 mM pH 7,5) + NaCl 1 M
	3	Adsorção	Tampão Fosfato (40 mM pH 7,5)
		Eluição	Tampão Fosfato (40 mM pH 8,0) + NaCl 1 M Tampão Fosfato (40 mM pH 7,5) + NaCl 1 M Tampão Fosfato (40 mM pH 7,0) + NaCl 1 M
DEAE	4	Adsorção	Tampão Fosfato (40 mM pH 7,5)
		Eluição	Tampão Fosfato (40 mM pH 7,5) + NaCl 1 M
Phenyl	5	Adsorção	Tampão Fosfato (40 mM pH 7,5) + NaCl 1 M
		Eluição	Tampão Fosfato (40 mM pH 7,5)

Fonte: Autoria própria.

Os volumes de soluções, utilizadas nas etapas de alimentação, lavagem e regeneração nos ensaios em leito expandido, foram proporcionais à quantidades utilizadas em leito fixo realizados com a resina Cpto MMC. Para todos os ensaios, as frações de cada etapa foram coletadas em tempos de 1 min e o teor de proteínas quantificados pelo método de Bradford (Bradford, 1976). A recuperação das proteínas foi estimada através de balanço de massa. Por fim, para verificar a separação das proteínas nos ensaios foram realizadas eletroforeses SDS-PAGE em condições não redutoras com géis de poliacrilamida na concentração de 12%, os quais foram revelados com nitrato de prata (MORRISSEY, 1981).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção serão apresentados os resultados obtidos no presente estudo, bem como uma análise crítica a cerca do conteúdo disponível na literatura.

4.1 Caracterização do Soro do Leite Bovino

Inicialmente foi realizada a caracterização das amostras de soro do leite bovino de acordo com os parâmetros sugeridos para produtos derivados lácteos. Essa etapa tem sua grande importância devido ao fato que a composição do soro do leite pode ser influenciada por uma série de fatores intrínseca ao animal, tais como idade e sua alimentação, assim também como ao processo de obtenção do soro e armazenamento, como tipo de coagulação da caseína, temperatura de armazenamento. A Tabela 12 mostra os resultados referentes as análises físico-químicas realizadas nas amostras de soro do leite bovino.

Tabela 12 - Caracterização físico-química do soro do leite bovino *in natura*.

Parâmetros	Valores
Umidade (%)	92,68 ± 0,04
Lactose (%)	4,59 ± 0,00
Cinzas (%)	0,88 ± 0,04
Proteínas (%)	0,70 ± 0,03
Gordura (%)	0,60 ± 0,00
Acidez * (%)	0,11 ± 0,00

*Expressa em ácido láctico.

Fonte: Autoria própria.

De acordo com os valores obtidos pode-se verificar que todos os parâmetros estão de acordo com os encontrados na literatura (PELEGRINE & CARRASQUEIRA, 2008; ALMEIDA *et al.*, 2013). No que se refere ao teor de proteínas, embora possa ser influenciado pela idade e alimentação do animal, dentre outros fatores, o valor presente na amostra a ser utilizada nos experimentos que se seguem foi bem próximo de 0,9% de proteínas, como obtido na literatura (VENTUROSOSO *et al.*, 2007). Além disso, pode-se verificar os principais interferentes a serem considerados no processo de extração e purificação das proteínas do soro do leite.

4.2 Ensaio de purificação da IgG do soro do sangue humano

Nesta seção encontram-se as metodologias empregadas nos ensaios de purificação da IgG humana. Inicialmente foram realizados delineamentos experimentais para obtenção

das condições de adsorção e eluição. Posteriormente, as condições experimentais encontradas foram aplicadas em amostras de soro do sangue humano.

4.2.1 Delineamento Experimental para estudos de Adsorção da IgG

A Tabela 13 apresenta os valores de quantidade de proteína adsorvida para cada condição do planejamento experimental composto central na etapa de adsorção da IgG pura. Os ensaios de 1 a 8 compreendem ao delineamento fatorial, 9 a 14 são os pontos axiais e os ensaios de 15 a 17 são os pontos centrais.

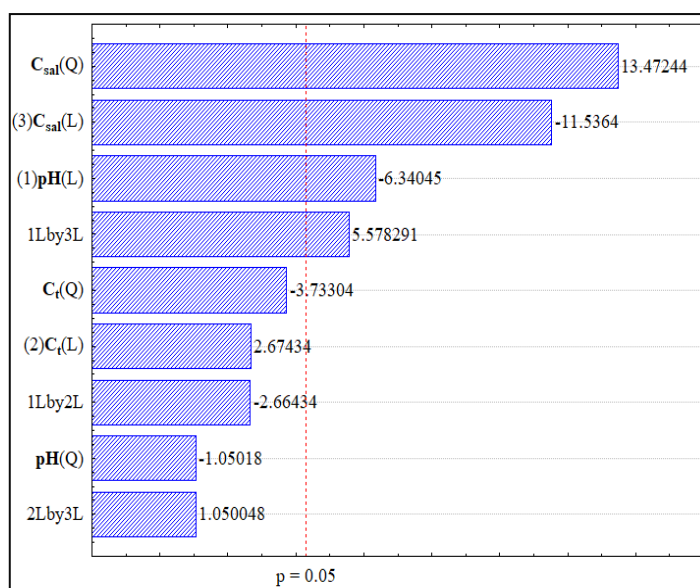
Tabela 13 - Quantidade adsorvida para os ensaios do planejamento experimental composto central na etapa de adsorção da IgG pura na resina Capto MMC.

Ensaios	pH	C_t (mM)	C_{sal} (M)	q (mg/g)
1	-1,00	-1,00	-1,00	116,91
2	-1,00	-1,00	+1,00	58,67
3	-1,00	+1,00	-1,00	116,06
4	-1,00	+1,00	+1,00	102,06
5	+1,00	-1,00	-1,00	67,20
6	+1,00	-1,00	+1,00	96,14
7	+1,00	+1,00	-1,00	80,97
8	+1,00	+1,00	+1,00	82,49
9	-1,68	0,00	0,00	122,27
10	+1,68	0,00	0,00	73,53
11	0,00	-1,68	0,00	77,13
12	0,00	+1,68	0,00	83,89
13	0,00	0,00	-1,68	223,28
14	0,00	0,00	+1,68	103,20
15	0,00	0,00	0,00	80,05
16	0,00	0,00	0,00	73,11
17	0,00	0,00	0,00	84,68

Fonte: Autoria própria.

De acordo com a Tabela 13 o ensaio 13 (6,75; 60,00 mM; 0,00 M) foi o que apresentou maior quantidade de IgG adsorvida, a qual obteve 223,281 mg/g. Dos ensaios 11 ao 17 o pH manteve-se constante, variando somente a C_t e C_{sal} . Ao observar somente a variação de C_t percebe-se que o valor de q manteve-se entre 73 a 85 mg/g de IgG adsorvida. No entanto, a variação de C_{sal} o valor de q aumentou para 223,28 mg/g na ausência de sal para 103,20 mg/g a 1 M de NaCl. Após obtenção destes dados fez-se os tratamentos estatísticos para verificar a influência das variáveis no estudo, ilustrado na Figura 15, a qual apresenta o Diagrama de Pareto obtido no *software* Statistica.

Figura 15 - Diagrama de Pareto para a etapa de adsorção da IgG.



Fonte: Autoria própria.

De acordo com o Diagrama de Pareto, verificou-se que a C_{sal} e o pH foram as variáveis que exerceram maior influência no modelo ao atuarem sozinhas, assim também quando avaliadas em conjunto (1Lby3L). Visto que a resina utilizada é de caráter multimodal, este comportamento pode estar relacionado a predominância das interações de troca iônica na captura da IgG pela Capto MMC, uma vez que a melhor condição foi obtida sem a presença de NaCl (0 M). A captura de proteínas por troca iônica é favorecida pelo pH de estudo, o qual indica a carga predominante nas moléculas (+ ou -) que irão interagir com os sítios ativos da resina. Além disso, quando se tem a presença de sais no meio, os íons de sais dissociados tendem a competir com as proteínas pelos sítios ativos da resina, ou seja, a interação por troca iônica é favorecida na ausência de NaCl.

Dessa maneira, foi realizada a análise de variância (ANOVA) para confirmar a

significância do modelo empregado. A Tabela 14 ilustra os dados da ANOVA obtida para os ensaios de adsorção da IgG na resina Capto MMC, os quais serão utilizados para verificar se o modelo é significativo e/ou preditivo.

Tabela 14 - Análise de variância (ANOVA) para o erro puro do planejamento composto central na etapa de adsorção da IgG na resina Capto MMC.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	$F_{v1/v2}$	F_{tab} (95%)
Regressão	13098,59	4	3274,65	4,24	3,26
Resíduo	9266,01	12	772,17		
Falta de ajuste	6562,09	5	1312,42	38,67	19,30
Erro puro	67,88	2	33,94		
Total SS	22364,60	16			

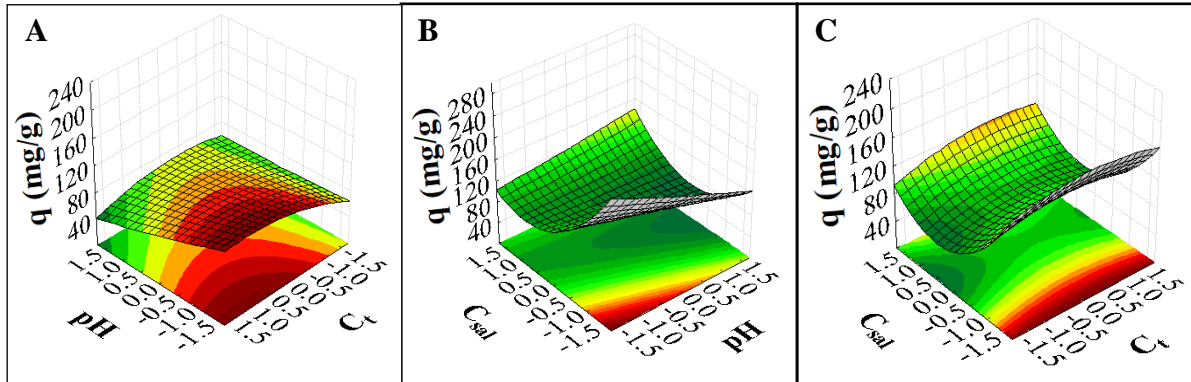
Fonte: Autoria própria.

De acordo com a Tabela 14 verificou-se que o modelo quadrático foi significativo para o valor de q , uma vez que $F_{v1/v2} = 4,24$ é maior que $F_{tab} (95\%) = 3,26$. Coeficiente de correlação obtido foi o valor de 0,70, ou seja, o modelo só consegue explicar a variação de 70% dos dados. No entanto, o modelo não é preditivo, visto que $F_{v1/v2} = 38,67$ é maior que $F_{tab} (95\%) = 19,30$. Um modelo é considerado significativo quando ele é capaz de descrever o processo e preditivo quando o modelo prediz o resultado a partir dos valores dos parâmetros sem precisar realizar o experimento (MAGALHÃES, 2014). O modelo obtido, representado pela Equação 18 mostrou um coeficiente de correlação (R^2) de 0,704 para um nível de confiança de 95%, ou seja, esse modelo consegue explicar cerca de 70% dos dados em torno da média.

$$q = 6160,65c_{sal}^2 - 4517,26c_{sal} - 1364,5p_H + 1056,18p_H \times c_{sal} \quad (18)$$

As Figuras 16 A, B e C ilustram as Superfícies de Resposta do modelo apresentado.

Figura 16- Relação das variáveis na etapa de adsorção da IgG: **A)** pH x C_t com C_{sal} no ponto central (0,5 M); **B)** pH x C_{sal} com C_t no ponto central (0,5); **C)** C_t x C_{sal} com pH no ponto central (6,75).



Fonte: Autoria própria.

Avaliando-se as Superfícies de Resposta pode-se verificar que os melhores resultados foram obtidos ao se trabalhar nas menores faixas de pH e C_{sal} . A variável independente C_t foi a que teve menor influência, como pode ser visto na Figura 16 A (pH x C_t). Uma maneira de ver sua influência com maior definição é aumentando a faixa de estudo desta variável.

Estes resultados encontram-se coerentes com os propostos na literatura, visto que para a maioria das biomoléculas, a melhor condição de adsorção é próxima ao seu respectivo pI, sendo que o pI da IgG encontra-se na faixa de 6,3 a 9,0 (Tan *et al.*, 2008). Joucla *et al.*, (2013) ao realizarem a etapa de adsorção para IgG em tampão Citrato na concentração de 0,1 M diluído para 2 mS/cm, pH 5,0 conseguiram reter cerca de 70% de IgG na resina de troca iônica Capto S.

4.2.1.1 Cinética de Adsorção

Os ensaios de cinética foram realizados na condição de máxima adsorção fornecida pelo delineamento experimental (6,75; 60 mM; 0 M) nas concentrações de 1, 2 e 3 mg/mL de IgG pura. Para estudo da difusividade a partir destes dados foi empregado o modelo de difusão paralelo. A Tabela 15 ilustra os dados de entrada do modelo.

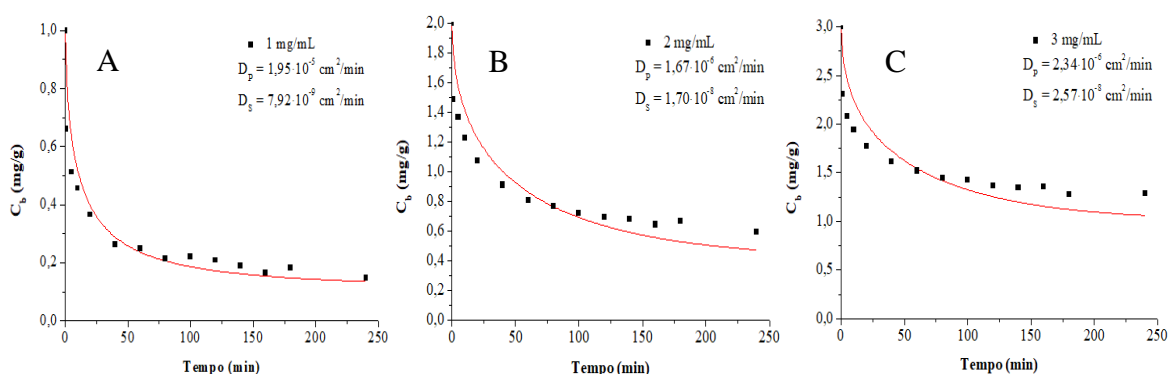
Tabela 15 – Parâmetros matemáticos inseridos no modelo.

Parâmetros	Capto MMC
Porosidade da partícula, ε_p	*0,55
Densidade da partícula, D_{ap} (g/cm ³)	1,5
Diâmetro de partícula, d (μ m)	$3,75 \cdot 10^{-3}$
Coefficiente de difusão molecular, D_{AB} (cm ² /min) – IgG	$3,39 \cdot 10^{-5}$
Coefficiente de transferência de massa no filme, k_f (cm/min) – IgG	0,19

*Fonte: Lima (2014).

As curvas e os ajustes do modelo de difusão paralelo para os ensaios estão explicitadas nas Figuras 17 A, B e C. Pode-se verificar que, para as três concentrações estudadas, o tempo de equilíbrio foi atingido em 180 minutos e que este não foi afetado pela concentração inicial.

Figura 17 - Perfis cinéticos de adsorção da IgG nas concentrações de **A)** 1 mg/mL, **B)** 2 mg/mL e **C)** 3 mg/mL preparada em tampão fosfato 60 mM, pH 6,75, utilizando a Capto MMC como resina.



Fonte: Autoria própria.

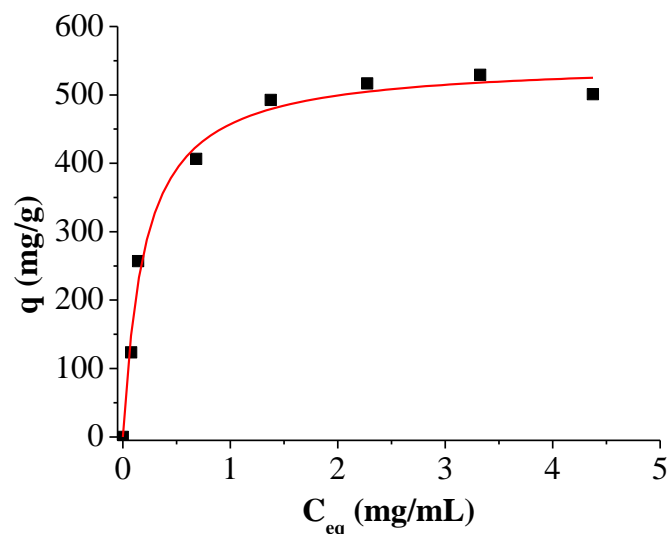
De acordo com os valores de D_p e D_s estimados verifica-se a predominância da difusividade no poro, uma vez que os valores de D_p variaram de $1,95 \cdot 10^{-5}$ a $1,67 \cdot 10^{-6}$ cm²·min⁻¹, enquanto os valores de D_s variaram de $7,92 \cdot 10^{-9}$ a $1,7 \cdot 10^{-8}$ cm²·min⁻¹. Com o aumento da concentração a difusividade tende a diminuir, o que pode estar relacionado ao tamanho dos poros da resina Capto MMC. Zhu e Carta (2016) encontraram comportamento semelhante ao investigarem cinéticas de adsorção de Lisozima e mAb nas resinas Nuvia cPrime e Capto MMC. Ensaios de Microscopia eletrônica indicaram poros com raios que variaram de 10 a 400 nm para a Nuvia cPrime. A Capto MMC possui raio médio de 32 nm. Constataram a presença do que chamaram de impedimento difusional, que foi relacionado ao tamanho da molécula do mAb. Quanto maior a concentração de mAb menor foi a difusividade

na resina Capto MMC e vice-versa. Além disso, puderam observar uma taxa de transferência de massa mais lenta quando comparada a Nuvia cPrime.

4.2.1.2 Isoterma de Adsorção

Uma vez definido o tempo de equilíbrio de 180 min, a isoterma de adsorção foi construída com soluções de IgG nas concentrações de 0,5 a 6,0 mg/mL, preparadas em tampão fosfato (60 mM, pH 6,75). A Figura 18 ilustra o perfil da isoterma e o ajuste do modelo de Langmuir.

Figura 18 - Isoterma de adsorção com soluções de IgG partindo das concentrações iniciais de 0,5 a 6,0 mg/mL preparadas em tampão fosfato (60 mM, pH 6,75) à 23 °C e ajuste do modelo de Langmuir (linha vermelha).



Fonte: Autoria própria.

O perfil da isoterma revela que o material possui alta capacidade de adsorção, o que pode estar relacionado ao fato de as interações entre o material e a proteína serem de diferentes naturezas (troca iônica, interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio). O perfil obtido apresentou comportamento favorável, indicando que grandes quantidades adsorvidas podem ser obtidas com baixas concentrações de IgG na solução. Registra-se a alta capacidade máxima de adsorção, $q_m = 549,24$ mg/g. Yan *et al.* (2016) avaliando a capacidade de adsorção da IgG na resina multimodal Nuvia cPrime obteve q_m 193,29 mg/g. Zhu e Carta (2016) ao verificarem a capacidade da capto MMC para a lisozima obteve q_m 130 mg/g. Com relação a resina

multimodal W-ABI (combinação de triptofano e 5-amino-benzimidazole), Tong *et al.* (2016) obtiveram q_m 70,4 mg/g da IgG, confirmando a alta capacidade de adsorção de IgG da resina Capto MMC. Os parâmetros relativos ao ajuste dos dados experimentais com o modelo de Langmuir estão descritos na Tabela 16.

Tabela 16 - Parâmetros de ajuste do modelo de Langmuir para a isoterma de adsorção da IgG na resina Capto MMC à 23 °C.

q_m (mg/g)	K (mL/mg)	R^2	X^2
549,20	4,97	0,99	529,01

Fonte: Autoria própria.

A constante de dissociação, K , indica a força de ligação entre a proteína e o adsorvente. Assim, quanto menor o valor de K , mais facilmente a proteína será recuperada na etapa de eluição. Assim, verificou-se uma alta força de ligação entre a IgG e a Capto MMC, $K = 4,97$ mL/mg. Wongchuphan *et al.* (2009) ao avaliarem a adsorção de IgG do coelho na resina *Streamline* imobilizada com corantes reativos (Reativos Marrom 10, Vermelho 120 e Verde 5, além do Cibacron Blue F3GA) obtiveram $K = 0,9$ mL/mg associado a uma alta afinidade do reativo verde pela IgG. Quanto ao coeficiente de determinação, R^2 , obteve-se bons resultados, uma vez que ficou bem próximo da unidade, indicando bom ajuste do modelo aos dados experimentais. No que se refere ao parâmetro Qui-quadrado (X^2), sabe-se que quanto menor o seu valor maior o ajuste do modelo aos dados experimentais (HO, 2004).

4.2.2 Delineamento Experimental para estudos de Eluição da IgG

A Tabela 17 apresenta os percentuais de recuperação da IgG na etapa de eluição obtidos no estudo em leito fixo utilizando a resina Capto MMC.

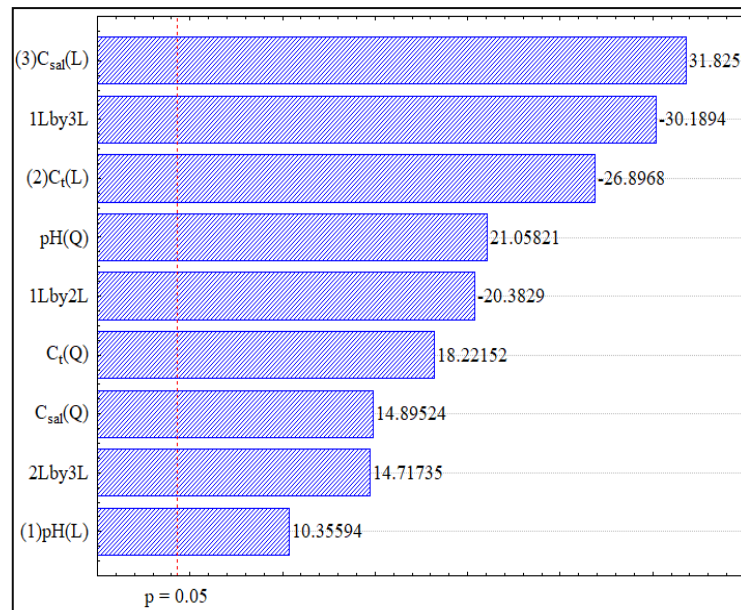
Tabela 17 - Percentuais de recuperação na etapa de eluição da IgG na resina Capto MMC.

Ensaios	pH	C_t (mM)	C_{sal} (M)	Recuperação IgG (%)
1	-1,00	-1,00	-1,00	10,20
2	-1,00	-1,00	+1,00	44,96
3	-1,00	+1,00	-1,00	7,51
4	-1,00	+1,00	+1,00	40,25
5	+1,00	-1,00	-1,00	46,96
6	+1,00	-1,00	+1,00	30,97
7	+1,00	+1,00	-1,00	5,34
8	+1,00	+1,00	+1,00	22,85
9	-1,68	0,00	0,00	8,79
10	+1,68	0,00	0,00	18,08
11	0,00	-1,68	0,00	14,24
12	0,00	+1,68	0,00	5,14
13	0,00	0,00	-1,68	0,26
14	0,00	0,00	+1,68	14,52
15	0,00	0,00	0,00	8,28
16	0,00	0,00	0,00	6,80
17	0,00	0,00	0,00	7,81

Fonte: Autoria própria.

Os dados supracitados foram tratados estatisticamente gerando o Diagrama de Pareto ilustrado na Figura 19. Nele pode-se observar que todas as variáveis e suas interações foram significativas ao nível de 95% de significância. Além disso, verificou-se, assim como na etapa de eluição, a C_{sal} foi a variável mais significativa. Este comportamento pode ser um indicativo de que a IgG interage com a Capto MMC, preferencialmente, por troca iônica através do grupo carboxílico presente em seu ligante.

Figura 19 - Diagrama de Pareto para a etapa de eluição da IgG.



Fonte: Autoria própria.

A partir das variáveis significativas, foi realizada a análise de variância, apresentada na Tabela 18, a seguir.

Tabela 18 - Análise de variância (ANOVA) para o erro puro do planejamento composto central na etapa de eluição da IgG na resina Capto MMC.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{v1/v2}	F _{tab} (95%)	F _{tab} (90%)	F _{tab} (75%)
Regressão	2507,42	9	278,60				
Resíduo	980,98	7	140,14	1,99	3,68	2,72	1,69
Falta de ajuste	1178,58	5	235,72				
Erro puro	1,14	2	0,57	412,16	19,30	9,29	3,28
Total SS	3488,40	16					

Fonte: Autoria própria.

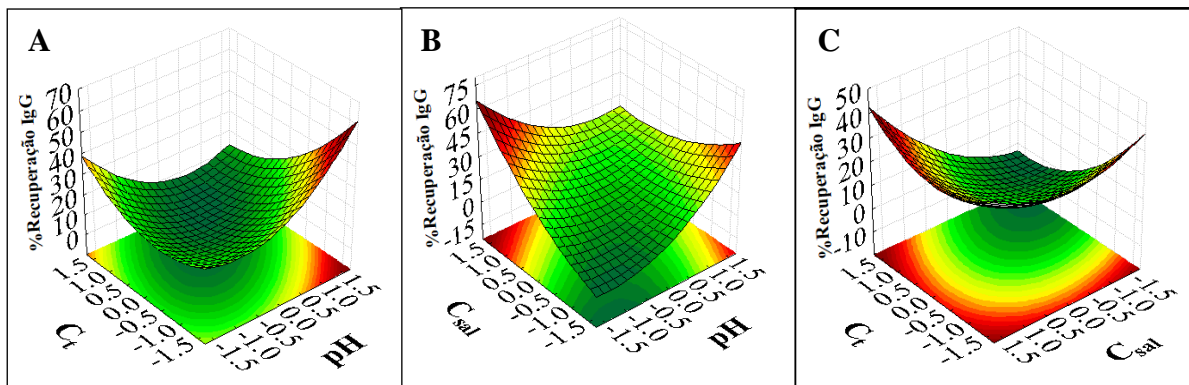
O valor obtido para o R^2 foi de 0,66, indicando que o modelo consegue explicar somente 66% da variabilidade na resposta. De acordo com o teste de F, verificou-se que o modelo foi significativo ao nível de 75% de significância, gerando a equação do modelo descrita na Equação 19

$$\text{Recuperação IgG (\%)} = pH^2 + C_t^2 + C_{sal}^2 + pH - C_t + C_{sal} - pH \times C_{sal} + C_t \times C_{sal} \quad (19)$$

Com o R^2 obtido, o modelo não pode ser usado para fins preditivos. No entanto, apesar de não conseguir gerar um ajustado modelo matemático, os gráficos de superfície de

respostas foram plotados no intuito de verificar se há uma tendência nos dados. As Figuras 20 A, B e C apresentam os gráficos de Superfícies de Respostas para os ensaios de eluição da IgG.

Figura 20 - Relação das variáveis na etapa de eluição da IgG: **A)** pH x C_t com C_{sal} no ponto central (0,5 M); **B)** pH x C_{sal} com C_{sal} no ponto central (0,5); **C)** C_t x C_{sal} com pH no ponto central (6,75).



Fonte: Autoria própria.

As superfícies de respostas indicam que as melhores condições foram obtidas nas extremidades das faixas avaliadas, indicando que para encontrar a melhor condição seja necessário expandir mais os níveis. No entanto, verifica-se que se aumentar o pH da etapa de eluição, estará se aproximando do pI da IgG, o que favorecerá a adsorção. Quanto as C_t e C_{sal} , vale ressaltar que as faixas avaliadas foram às indicadas pelo fabricante da resina. Extrapolar essa faixa pode comprometer a capacidade da Capto MMC e a faixa tamponante do tampão. Como ilustrado no Diagrama de Pareto, todas as variáveis estudadas foram significativas, sendo a C_{sal} a mais significativa, seguida pela interação entre o pH com a C_{sal} .

De acordo com as figuras supracitadas e os valores mostrados na tabela anterior verifica-se que o ensaio 5 foi o que obteve maior percentual de recuperação da IgG (46,96%), o qual foi operado com pH 5,2, C_t 56,4 mM e C_{sal} 0,2 M. Esta condição se aproxima, razoavelmente, da encontrada por Zhang *et al.* (2015), os quais realizaram a eluição da IgG usando tampão MES no pH 5,0 a 25 mM e 0,6 M de Citrato de Sódio.

Os tratamentos estatísticos mostraram que das variáveis estudadas nas etapas de adsorção e eluição da IgG a C_{sal} foi a mais significativa, onde a melhor condição de adsorção se deu na ausência de sal e a de eluição ocorreu nas maiores concentrações de sal, fato este que pode estar associado à predominância das interações de troca iônica entre a IgG e a Capto

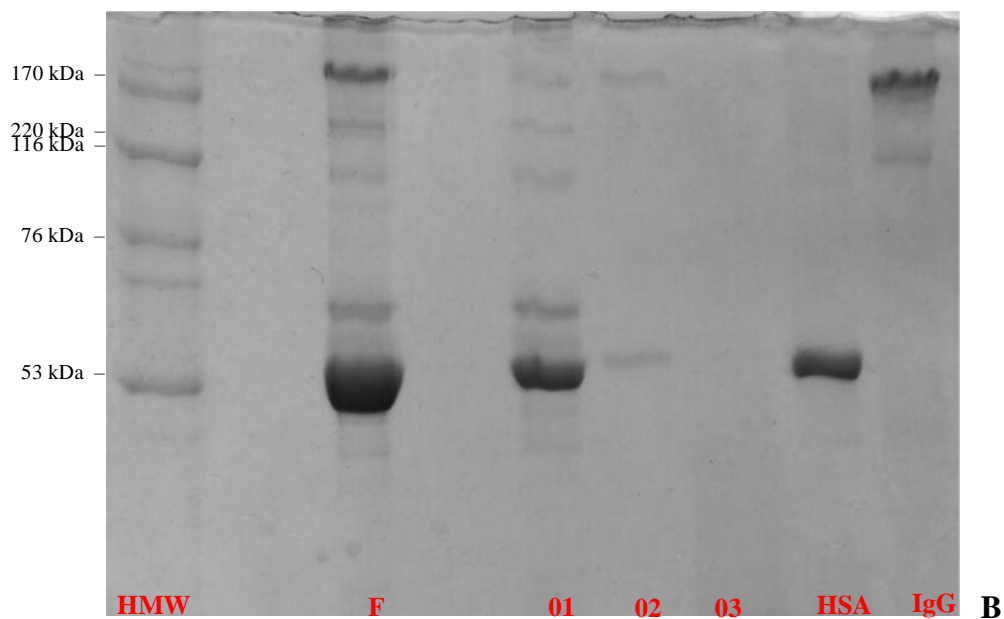
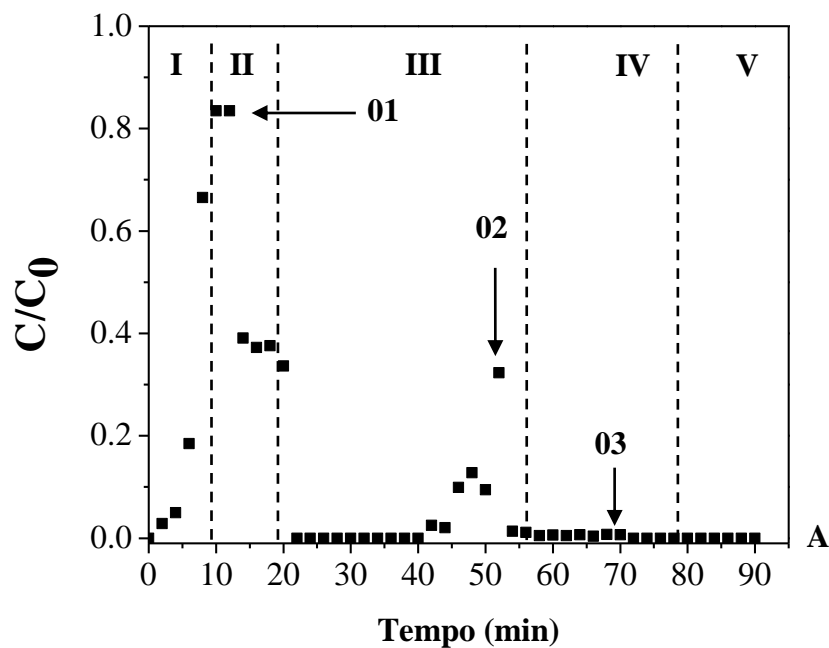
MMC. Joucla *et al.* (2013) observaram o mesmo comportamento da IgG humana em Capto MMC, em que o aumento ou decréscimo da concentração de sal teve grande influência na eluição da IgG. Mariam *et al.* (2015) realizaram a eluição da IgG por meio de um gradiente de aumento do pH e da condutividade do tampão. Isso ocorre devido a competição dos íons salinos pelos sítios ativos do adsorvente, desencadeando na expulsão das proteínas na etapa de eluição.

Dessa maneira, embora o delineamento experimental não tenha sido validado, foram testadas várias condições, dentre as quais, a do ensaio 5 foi a que apresentou melhor desempenho. Com isso, foram analisadas amostras de soro de sangue humano para verificar a purificação da IgG, utilizando as seguintes condições: Adsorção - Tampão fosfato (60 mM, no pH 6,75) sem NaCl (C_{sal} 0 M); Eluição – Tampão fosfato (56,4 mM, pH 5,2) e C_{sal} 0,2 M.

4.2.3 Soro de Sangue Humano

Uma vez obtidas as condições ótimas de adsorção (pH 6,75; C_t 60 mM; C_{sal} 0.0 M) e eluição (pH 5,2, C_t 56,4 mM e C_{sal} 0,2 M) com soluções padrões de IgG, estas foram reproduzidas com amostra de soro humano. As Figuras 21 A e 21 B ilustram o perfil cromatográfico obtido para a amostra de soro humano e o ensaio de eletroforese, respectivamente. Em ambas as figuras pode-se verificar que no pico 02, correspondente a etapa de eluição, houve a separação das proteínas IgG e HSA dos demais constituintes presentes no soro do sangue humano. Contudo, nesse pico houve coeluição das proteínas IgG e HSA, o que pode estar associado ao modo de eluição utilizado, visto que no modo isocrático trabalha-se somente em uma condição fixa de concentração salina e/ou pH. Como o adsorvente Capto MMC apresenta em seu grupo ligante diferentes tipos de interações, talvez o ideal seja realizar a eluição no modo gradiente, como realizado por BALASUNDARAM *et al.* (2013), BHAMBURE *et al.* (2013) e LINDNER *et al.* (2014). No entanto, o perfil de eletroforese mostra que a partir de uma amostra, que contém várias proteínas, foi possível remover IgG e HSA, restando apenas essas proteínas na etapa de eluição. Isto sugere que estas condições podem ser empregadas como etapa de pré-purificação da IgG, assim também como o uso do gradiente na etapa de eluição pode ser estudado para otimizar separar completamente a IgG da HSA.

Figura 21 – **A)** Perfil cromatográfico e **B)** eletroforese revelada com Comassie Blue da amostra de soro de sangue humano na concentração de 5 mg/mL a uma vazão de 0,8 mL/min. **Condições operacionais:** Adsorção: Tampão fosfato (60 mM pH 6,75); Eluição: Tampão acetato (56,4 mM, pH 5,2) + NaCl 0,2 M. Etapas cromatográficas: **I:** Alimentação; **II:** Lavagem; **III:** Eluição; **IV:** Regeneração; **V:** Reequilíbrio. Pontos coletados: **01:** Adsorção; **02:** Eluição; **03:** Regeneração. Pontos do gel de eletroforese: **HMW:** Padrão de alta massa molecular; **F:** amostra de soro de sangue humano; **01:** Adsorção; **02:** Eluição; **03:** Regeneração; **HSA:** Albumina do soro humano; **IgG:** Imunoglobulina do tipo G.



Fonte: Autoria própria.

4.3 Levantamento de dados fundamentais da BSA nos modos batelada e leito fixo

Nesta seção são apresentados os dados referentes aos ensaios das condições de adsorção e eluição para a proteína BSA na resina Capto MMC.

4.3.1 Delineamento Experimental para estudos de Adsorção da BSA

A Tabela 19 apresenta as condições e quantidades adsorvidas do delineamento experimental para a etapa de adsorção da BSA utilizando a resina Capto MMC no modo batelada. Estes ensaios têm como objetivos avaliar a influência dos parâmetros pH, C_t e C_{sal} na adsorção da BSA na resina Capto MMC e assim identificar as melhores condições de adsorção.

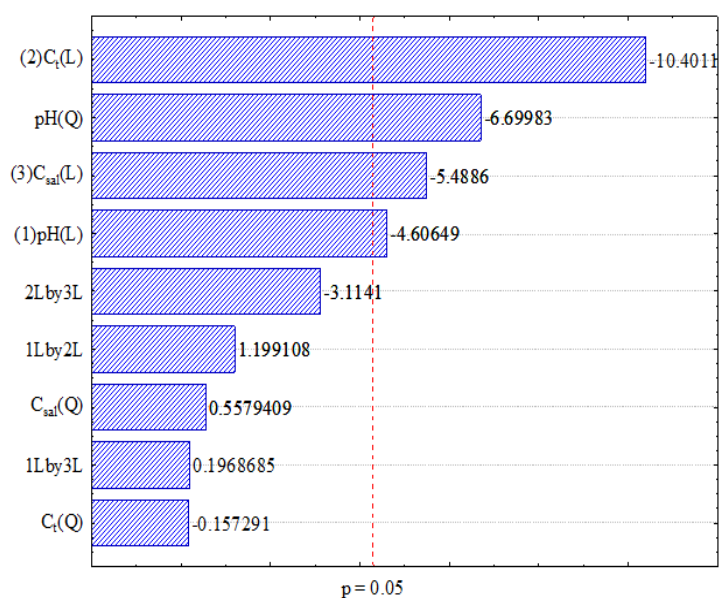
Tabela 19 - Quantidades adsorvidas das condições do delineamento experimental para a etapa de adsorção de BSA na resina Capto MMC.

Ensaio	pH	C_t (mM)	C_{sal} (M)	q (mg/g)
1	-1,00	-1,00	-1,00	138,03
2	-1,00	-1,00	+1,00	116,55
3	-1,00	+1,00	-1,00	61,42
4	-1,00	+1,00	+1,00	27,16
5	+1,00	-1,00	-1,00	140,26
6	+1,00	-1,00	+1,00	143,51
7	+1,00	+1,00	-1,00	99,72
8	+1,00	+1,00	+1,00	45,20
9	-1,68	0,00	0,00	126,28
10	+1,68	0,00	0,00	9,73
11	0,00	-1,68	0,00	117,56
12	0,00	+1,68	0,00	116,14
13	0,00	0,00	-1,68	137,63
14	0,00	0,00	+1,68	104,39
15	0,00	0,00	0,00	103,17
16	0,00	0,00	0,00	115,53
17	0,00	0,00	0,00	118,17

Fonte: Autoria própria.

Os dados supracitados foram analisados estatisticamente gerando o Diagrama de Pareto, ilustrado na Figura 22.

Figura 22 - Diagrama de Pareto para o estudo de adsorção da BSA em Capto MMC.



Fonte: Autoria própria.

De acordo com o Diagrama de Pareto verificou-se que as variáveis C_t , pH e C_{sal} foram significativas. Assim, para verificar a significância e predição do modelo, foi realizada a análise de variância destes dados, apresentada na Tabela 20.

Tabela 20 - Análise de variância (ANOVA) para o erro puro do planejamento composto central na etapa de adsorção da BSA na resina Capto MMC.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	$F_{v1/v2}$	F_{tab} (95%)	F_{tab} (90%)
Regressão	13109,62	4	3277,40	2,95	3,26	2,48
Resíduo	13322,28	12	1110,19			
Falta de ajuste	11639,18	5	2327,84	36,30	19,30	9,29
Erro puro	128,26	2	64,13			
Total	26431,90	16				

Fonte: Autoria própria.

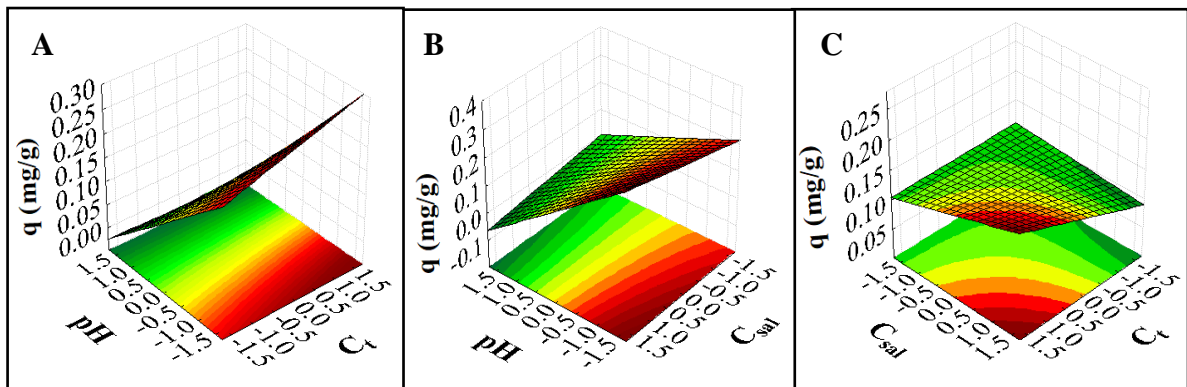
De acordo com a Tabela 20 verificou-se que o modelo quadrático foi significativo para o valor de q para o nível de significância de 90%, uma vez que $F_{v1/v2} = 2,95$ é maior que $F_{tab} (90\%) = 2,48$. Uma vez que o modelo se mostrou significativo, sua representação se deu pela Equação 20. O coeficiente de correlação (R^2) obtido foi 0,55 para um nível de confiança

de 90%, ou seja, esse modelo consegue explicar cerca de 55% dos dados em torno da média.

$$q = -2878,75_{pH}^2 - 1360,87_{pH} - 6938,04_{C_t} - 1931,97_{C_{sal}} \quad (20)$$

Adicionalmente, o teste F apontou que modelo não é preditivo, visto que $F_{v1/v2} = 36,30$ é maior que F_{tab} para os dois níveis de significância avaliados (90 e 95%). Uma vez que o modelo se mostrou significativo, os gráficos de superfície de respostas foram gerados, os quais estão ilustrados nas Figuras 23 A, B e C.

Figura 23 - Superfície de resposta para as variáveis: **A)** pH e C_t com C_{sal} (0,9 M) no ponto central; **B)** pH e C_{sal} com C_t no ponto central (60,00 mM); **C)** C_t e C_{sal} com pH no ponto central (5,00) para adsorção da BSA com fixa no ponto central.



Fonte: Autoria própria.

De acordo com os resultados obtidos verificou-se que os ensaios 1 (pH 4,8; C_t 40mM; C_{sal} 0,5 M), 5 (pH 5,2; C_t 40 mM; C_{sal} 0,5 M) e 6 (pH 5,2; C_t 40 mM; C_{sal} 1,3 M) foram os que apresentaram maiores quantidades de BSA adsorvidas. Uma vez que estes resultados apresentaram quantidades adsorvidas bem próximas, 138,03, 140,26 e 143,51 mg/g, para os ensaios 1, 5 e 6, respectivamente, optou-se por trabalhar na condição do ensaio 1, a qual corresponde ao ponto isoelétrico da BSA. Na literatura existem vários trabalhos com outras resinas que relatam maiores quantidades adsorvidas de BSA quando se trabalha em seu pI (VIEIRA *et al.*, 2004; BAKI e NALAN, 2002; ZHAO *et al.*, 2003; TORRES, 2006), o que pode estar associado ao fato de que no ponto isoelétrico as cargas se anulam e as interações proteína-proteína se reduzem, favorecendo então as interações proteína-resina.

De acordo com as figuras acima, verificou-se que as maiores quantidades adsorvidas foram obtidas ao se trabalhar nas menores faixas de pH, comportamento semelhante aos obtidos por CHU *et al.* (2018). No que se refere às variáveis C_t e C_{sal} , quando ambas foram analisadas com o pH (Figuras 23 A e B) os melhores resultados foram

alcançados quando trabalhado nas faixas mediana e maior (60,00 a 93,40 mM para C_t e 0,9 a 1,6 M para C_{sal}). Porém, avaliando a Figura 23 C ($C_t \times C_{sal}$), as zonas de melhores resultados ficaram bem definidas, correspondendo aos maiores níveis. Nogueira (2016) obteve quantidades adsorvidas similares quando utilizou SBA 15 para adsorção da BSA em solução tampão de acetato de sódio pH 4,8 com adição de NaCl em diferentes concentrações.

4.3.1.1 Cinética de adsorção

Os ensaios de cinética foram realizados na condição ótima de adsorção obtida pelo delineamento experimental (4,8; 40 mM; 0,5 M). A Tabela 21 ilustra os dados de entrada do modelo.

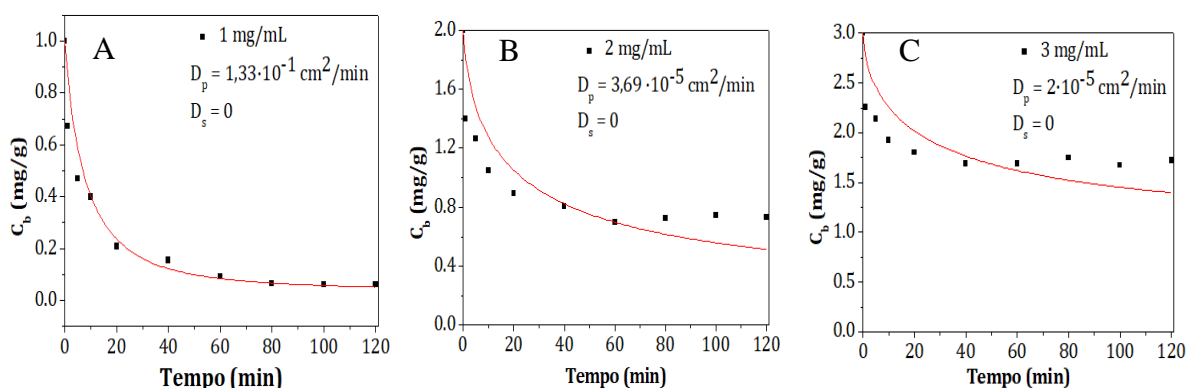
Tabela 21 – Parâmetros matemáticos inseridos no modelo.

Parâmetros	Capto MMC
Porosidade da partícula, ϵ_p	*0,55
Densidade da partícula, D_{ap} (g/cm ³)	1,5
Diâmetro de partícula, d (μ m)	$3,75 \cdot 10^{-3}$
Coefficiente de difusão molecular, D_{AB} (cm ² /min) – BSA	$3,39 \cdot 10^{-5}$
Coefficiente de transferência de massa no filme, k_f (cm/min) – BSA	0,19

*Fonte: Lima (2014).

As Figuras 24 A, B e C ilustram as curvas cinéticas para as concentrações de 1, 2 e 3 mg/mL da BSA. Avaliando o perfil cinético de adsorção para a BSA verificou-se que o tempo de equilíbrio foi atingido em 120 min, e que esse tempo não foi afetado pela concentração inicial da proteína, visto que tiveram o mesmo comportamento.

Figura 24 – Perfis cinéticos de adsorção da BSA nas concentrações de **A)** 1 mg/mL, **B)** 2 mg/mL e **C)** 3 mg/mL preparada em tampão Acetato (40 mM, pH 4,8) + NaCl 0,5 M, utilizando a Capto MMC como resina.



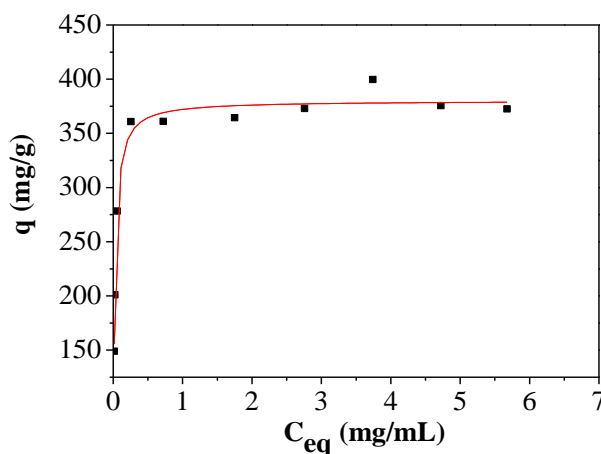
Fonte: Autoria própria.

De acordo com os valores de D_p e D_s estimados para as cinéticas de adsorção da BSA na resina Capto MMC, verifica-se a predominância da difusividade no poro, uma vez que os valores de D_p variaram de $1,33 \cdot 10^{-1}$ a $3,69 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{min}^{-1}$ e os valores de D_s foram nulos. Assim como para a IgG, com o aumento da concentração a difusividade tende a diminuir, o que pode estar relacionado ao tamanho dos poros da resina Capto MMC. No entanto, apesar dos resultados obtidos para a IgG mostrarem a predominância da difusividade no poro, verificou-se que tem-se difusão na superfície, diferente do que ocorre para a BSA, a qual ocorre somente no poro. Este comportamento pode estar relacionado ao modelo estrutural dessas proteínas. Enquanto a BSA tem um formato mais globular a IgG tem sua estrutura semelhante a um “Y”, o que pode dificultar o acesso aos poros. Dessa maneira, em soluções contendo a mistura dessas proteínas haverá competição para acesso aos poros, que em termos estruturais é favorável a BSA. Li *et al.* (2016), ao investigarem o efeito da mudança de pH na estrutura da BSA, verificaram que a mudança de pH de 7,0 a 4,7 não alterou significativamente seu tamanho molecular médio. No entanto, a mudança de pH de 4,7 para 3,0 aumentou a largura da estrutura, ou seja, o aumento de carga positiva desdobrou a BSA. Isto é um indicativo que os resíduos de aminoácidos presentes na superfície da BSA são de caráter ácidos. Em pH mais ácido a estrutura da BSA é desdobrada, assim, os aminoácidos carregados negativamente são expostos, ficando acessíveis a ionização.

4.3.1.2 Isoterma de adsorção

O tempo de equilíbrio obtido na cinética foi utilizado para obtenção da isoterma. A Figura 25 ilustra o perfil adquirido, bem como o ajuste do modelo de Langmuir. De acordo com os resultados, verificou-se que a isoterma obtida apresentou comportamento favorável, indicando que grandes quantidades adsorvidas podem ser obtidas com baixas concentrações de BSA na solução. Além disso, observa-se que nas concentrações de 1,5 e 2,0 mg/mL já ocorre a saturação do adsorvente.

Figura 25 - Isoterma de adsorção da BSA partindo das concentrações iniciais de 0,5 a 7,0 mg/mL, preparadas em tampão acetato de sódio 40 mM, pH 4,8 + NaCl 0,5 M e ajuste do modelo de Langmuir (linha vermelha).



Fonte: Autoria própria.

Os dados gerados no ajuste encontram-se na Tabela 22. A capacidade máxima de adsorção (q_m) obtida foi 380,16 mg/g, valor inferior ao obtido para a IgG, o que possivelmente estar associado ao fato da difusão da BSA ocorrer somente nos poros, enquanto a IgG ocorre nos poros e na superfície. Porém, o valor de q_m foi superior ao encontrado por Chu *et al.* (2018). Estes obtiveram $q_m = 125,5$ mg/g para a HSA utilizando a resina Capto MMC em tampão acetato de sódio (20 mM, pH 4,4) + NaCl 0,2 M. Esse diferencial no valor de q_m pode estar relacionado com a força iônica, a qual é superior no presente trabalho. A presença de sal na solução expõe os aminoácidos hidrofóbicos da molécula de proteína, aumentando a interação com o grupo fenil do ligante.

Tabela 22 - Parâmetros de ajuste do modelo de Langmuir para a isoterma de adsorção da BSA na resina Capto MMC.

q_m (mg/g)	K (mL/mg)	R^2	X^2
380,16	46,12	0,98	11,39

Fonte: Autoria própria.

A constante de dissociação, K , indica a força de ligação entre a proteína e o adsorvente. Na Tabela 22, verifica-se que o valor obtido (46,12 mL/mg) foi quase 10 vezes

superior ao encontrado para a proteína IgG, o que justifica sua presença em todas as etapas na purificação da IgG em amostras do soro do sangue humano. O fato da interação entre a BSA e a Capto MMC ser maior que a da IgG e perdurar em todas as etapas pode estar associado a sua difusão que se dá nos poros, diferente da IgG que ocorre também na superfície do adsorvente. Dessa maneira, as condições de eluição necessitam ser investigadas para que se consiga remover as moléculas de BSA dos poros. No que se refere ao coeficiente de determinação (R^2), verificou-se bom ajuste, visto que se aproxima da unidade. Quanto ao Qui-quadrado (X^2), o valor obtido foi bem inferior ao obtido para a IgG, indicando melhor ajuste do modelo aos dados experimentais.

4.3.2 Delineamento Experimental para estudos de Eluição da BSA

A Tabela 23 apresenta os percentuais de recuperação da BSA obtidos no estudo em leito fixo e a análise de variância, respectivamente.

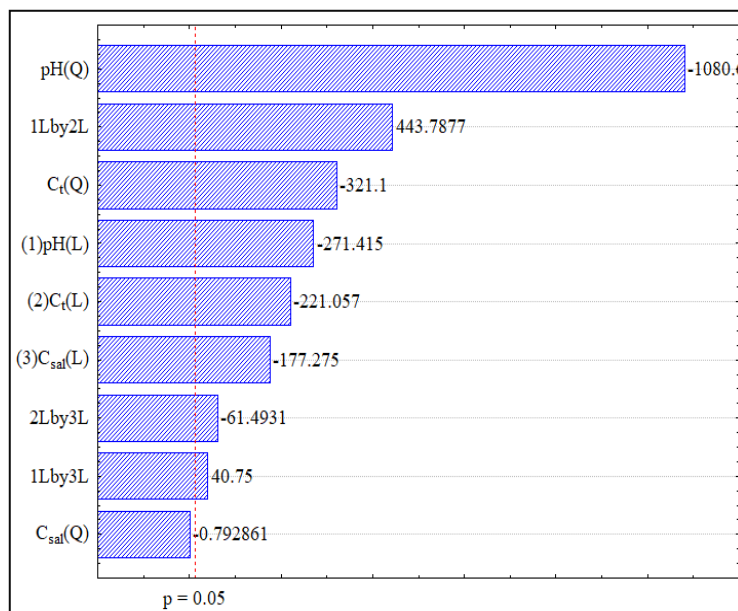
Tabela 23 - Percentuais de recuperação na etapa de eluição da BSA na resina Capto MMC.

Ensaio	pH	C_t (mM)	C_{sal} (M)	Recuperação (%)
1	-1,00	-1,00	-1,00	100,01
2	-1,00	-1,00	+1,00	95,55
3	-1,00	+1,00	-1,00	94,43
4	-1,00	+1,00	+1,00	94,43
5	+1,00	-1,00	-1,00	87,50
6	+1,00	-1,00	+1,00	89,55
7	+1,00	+1,00	-1,00	96,46
8	+1,00	+1,00	+1,00	91,58
9	-1,68	0,00	0,00	83,74
10	+1,68	0,00	0,00	86,90
11	0,00	-1,68	0,00	100,00
12	0,00	+1,68	0,00	90,51
13	0,00	0,00	-1,68	100,00
14	0,00	0,00	+1,68	98,83
15	0,00	0,00	0,00	99,99
16	0,00	0,00	0,00	100,01

Fonte: Autoria própria.

Os dados apresentados na Tabela 23 foram analisados estatisticamente gerando o Diagrama e Pareto, ilustrado na Figura 26.

Figura 26- Diagrama de Pareto para a etapa de eluição da BSA.



Fonte: Autoria própria.

De acordo com o Diagrama de Pareto verificou-se que todas as variáveis foram significativas, exceto a C_{sal} quando analisada pelo modelo quadrático. Assim, para verificar a significância e predição do modelo, foi realizada a análise de variância destes dados, apresentada na Tabela 24.

Tabela 24 - Análise de variância (ANOVA) para o erro puro do planejamento composto central na etapa de eluição da BSA na resina Capto MMC.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{v1/v2}	F _{tab} (95%)	F _{tab} (90%)	F _{tab} (75%)
Regressão	325,45	8	40,68				
Resíduo	120,71	7	17,24	2,36	3,73	2,75	1,70
Falta de ajuste	93,50	5	18,70				
Erro puro	0,00	1	0,00	93495,07	230,20	57,24	8,82
Total	446,16	15					

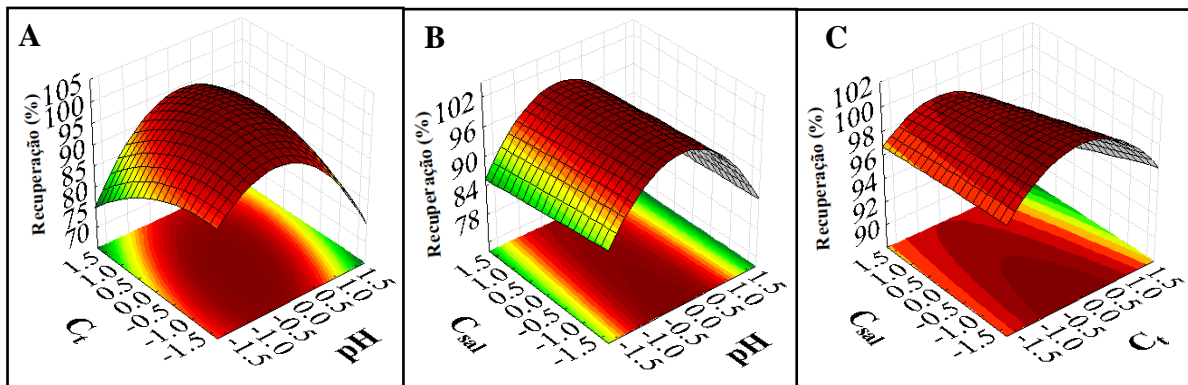
Fonte: Autoria própria.

De acordo com a Tabela 24 verificou-se que o modelo quadrático foi significativo para o percentual de recuperação de BSA ao nível de significância de 75%, uma vez que $F_{v1/v2} = 2,36$ é maior que $F_{tab} (75\%) = 1,70$, gerando a equação do modelo descrita na equação 21.

$$\text{Recuperação BSA (\%)} = -pH^2 - C_t^2 - pH - C_t - C_{sal} + pH \times C_t + pH \times C_{sal} - C_t \times C_{sal} \quad (21)$$

O coeficiente de correlação (R^2) obtido foi 0,79, ou seja, esse modelo consegue explicar 79% dos dados em torno da média. No entanto, embora o modelo não tenha se mostrado significativo, as Superfícies de respostas foram gerados no intuito de melhor compreender este comportamento, os quais estão ilustrados nas Figuras 27 A, B e C.

Figura 27 - Relação das variáveis A) pH e C_t , com a C_{sal} no ponto central (1 M); B) pH e C_{sal} , com a C_t no ponto central (35 mM); C) C_t e C_{sal} , com o pH no ponto central (7,5), para o percentual de recuperação da BSA na etapa de eluição.



Fonte: Autoria própria.

Os perfis de superfícies de resposta indicam que os melhores resultados foram obtidos quando o pH encontra-se na região próxima ao ponto central e nos menores valores de C_t . No que se refere a C_{sal} , não houve uma faixa que se destacasse. Com isso, verificou-se que a condição que obteve melhor desempenho no planejamento é representada pelo ensaio 1 (pH 6,6, C_t 26,0 mM, C_{sal} 0,7 M).

O Diagrama de Pareto, ilustrado na Figura 26 confirma os resultados apresentados nas superfícies de respostas, onde se verifica que a C_{sal} quando avaliada sozinha não foi significativa, ou seja, exerce pouca influência na etapa de eluição da BSA. Porém, a interação da variável C_{sal} com as demais (pH e C_t) são significativas. Esta análise ilustra a importância da análise estatística, por ela permitir a avaliação não somente dos parâmetros individualmente, mas das interações dos mesmos. Hirano *et al.* (2015) verificaram que o aumento da concentração de NaCl enfraquece a eluição da BSA na resina Capto MMC devido

a competição do próprio efeito *salting-out* que ocorre com o NaCl. O aumento da concentração de NaCl ocasiona uma redução da solubilidade das proteínas, uma vez que os íons do sal interagem com os grupos iônicos da proteína, acarretando na exposição de seus grupos hidrofóbicos, o que favorece a interação hidrofóbica entre as proteínas e a resina. No caso da etapa de eluição, a solubilidade da proteína deve ser favorecida.

Diferente do ocorrido com a IgG, onde as melhores condições de eluição foram encontradas nas regiões extremas dos gráficos de superfície de resposta, para a BSA as melhores condições foram obtidas nas regiões intermediárias. Porém, possivelmente, o modelo não foi significativo devido ao comportamento apresentado pela BSA quando na presença de NaCl. De acordo com Sang *et al.*, (2011), a BSA é uma proteína denominada “soft”, ou seja, de baixa estabilidade interna. Com isso, independente da interação, ela tende a adsorver em toda a superfície, o que está associado a um ganho de entropia conformacional. Pessoa Jr. e Kilikian (2005) também afirmam que mesmo a proteína apresentando carga global negativa ou positiva, ainda pode ocorrer adsorção por um trocador com carga não esperada. Em se tratando de um adsorvente multimodal, como a Capto MMC, esse efeito tende a se intensificar.

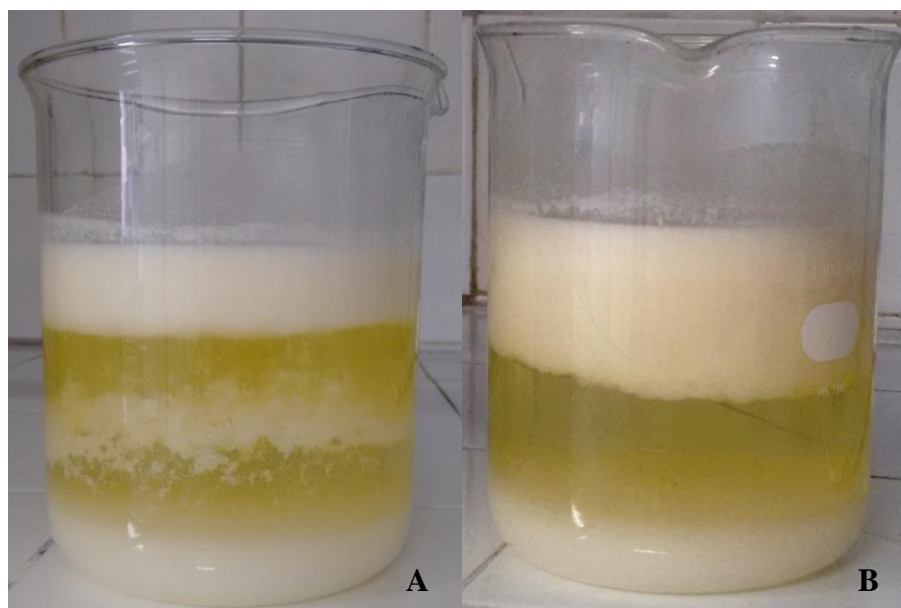
4.4 Purificação das proteínas do Soro do Leite Bovino em leito fixo

Nesta seção encontram-se descritos os resultados obtidos para os ensaios de recuperação e purificação de proteínas de interesse industrial provenientes de amostras de soro do leite bovino.

4.4.1 Tratamento do Soro do Leite Bovino

A Figura 28 ilustra a etapa de precipitação do soro do leite bovino com sulfato de amônio nas concentrações de 50 e 80%. Como pode ser verificado, a precipitação com 80% garante uma maior separação das fases devido a maior concentração de sulfato de amônio, arrastando assim maior quantidade de interferentes. Posterior à precipitação, as amostras foram dialisadas para remoção do sulfato de amônio. Após a precipitação foram coletados os volumes de 360 e 260 mL das amostras precipitadas com 50 e 80%, respectivamente. No final da diálise foram obtidos os volumes de 564 e 499 mL para as amostras de 50 e 80%, respectivamente.

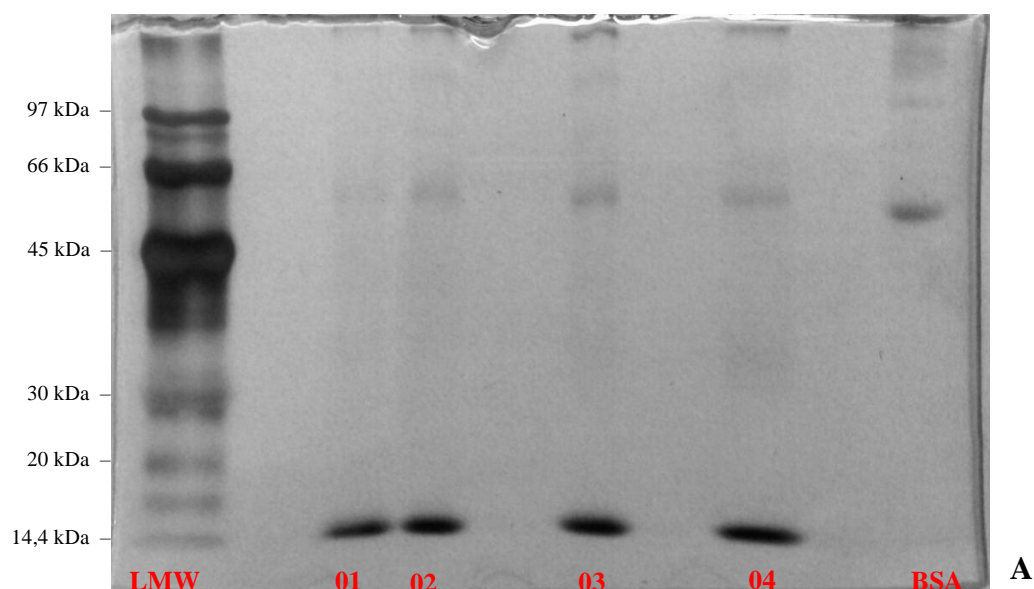
Figura 28 - Precipitação de 500 mL da amostra de soro do leite bovino com sulfato de amônio a 50 (A) e 80% (B).

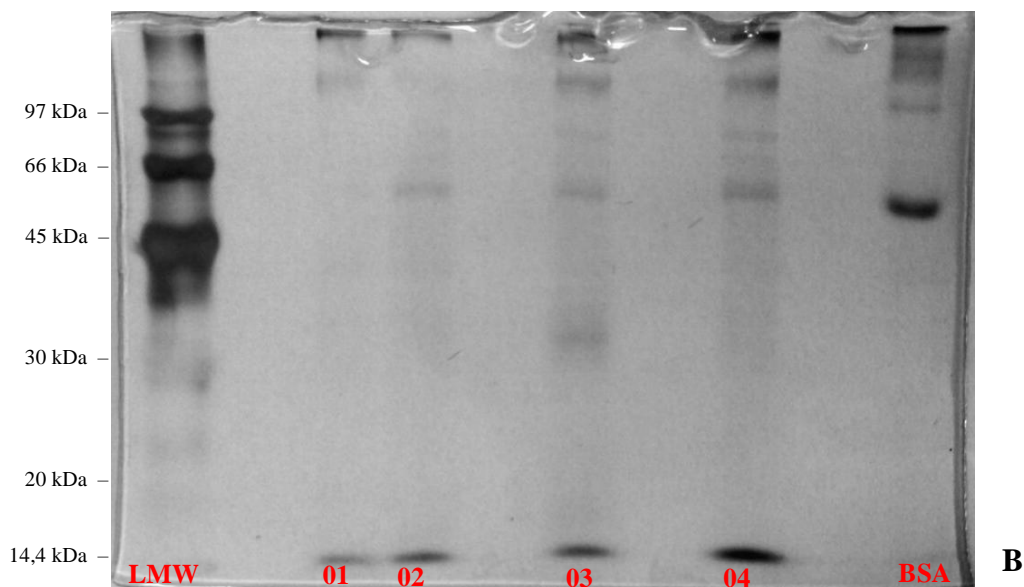


Fonte: Autoria própria.

As Figuras 29 A e 29 B ilustram os perfis de proteínas das amostras de soro do leite bovino após a etapa de precipitação com sulfato de amônio 50 e 80%. Foram preparadas variando a proporção amostra:tampão de amostra para um volume final de 30 μ L.

Figura 29 - Eletroforese das amostras de soro do leite bovino precipitadas com sulfato de amônio A) 50% e B) 80% e dialisadas em membrana de diálise 10 kDa (25 mm X 30 cm). **LMW**: Padrão de baixa massa molecular; **01**: 10:20; **02**: 15:15; **03**: 20:10; **04**: 25:5; **BSA**: Albumina do Soro Bovino.





Fonte: Autoria própria.

Os perfis das eletroforeses das amostras dialisadas mostram que a precipitação com sulfato de amônio 80% precipitou mais proteínas, uma vez que se tem mais bandas de proteínas na faixa superior a 66 kDa, quando comparada à precipitação com sulfato de amônio 50%. Lima *et al.* (2008) explicam essa diferença no arraste de proteínas nas concentrações de sulfato de amônio à 50 e 80% pelo efeito *salting-out*. Soluções de proteínas contendo até certas concentrações de sal favorecem as interações das cargas das proteínas com os íons salinos dissociados, reduzindo as interações proteína-proteína, o que promove maior solubilidade das proteínas no meio aquoso. Com o aumento da força iônica, ocorre o processo inverso. Tem-se uma menor solubilidade das proteínas no meio aquoso devido ao aumento das interações proteína-proteína. Este é ocasionado devido à exposição dos grupos hidrofóbicos das proteínas, desencadeando na precipitação das mesmas.

Após diálise, as amostras foram concentradas por liofilização e então ressuspendidas para um volume final de 15 mL no tampão correspondente aos ensaios indicados no delineamento experimental. O teor de proteínas das amostras de soro do leite bovino foi determinado pelo método de Bradford (Bradford, 1976), onde foram obtidos os valores médios de 0,32 e 0,45 mg/mL para as amostras de 50 e 80%, respectivamente. Através dos resultados verificou-se que a precipitação com sulfato de amônio 80% conseguiu precipitar quase 30% de proteínas a mais que a precipitação com sulfato de amônio 50%. Assim, optou-se por trabalhar com a precipitação de 80% para os ensaios posteriores.

4.4.2 Ensaios Cromatográficos

Foram calculados os balanços de massa para todos os ensaios e obtido o percentual de proteínas recuperado na etapa de eluição, o qual foi utilizado como variável resposta para análise do delineamento experimental. A Tabela 25 ilustra os percentuais de proteínas recuperadas.

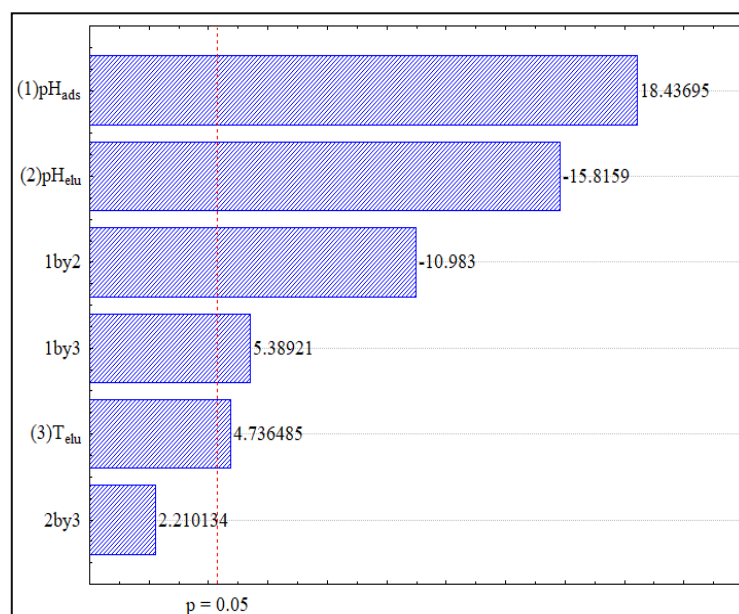
Tabela 25 - Percentuais de recuperação das proteínas na etapa de eluição das amostras de soro do leite bovino na resina Capto MMC.

Ensaio	pH_{ads}	pH_{elu}	t_{elu} (min)	Recuperação (%)
01	-1,00	-1,00	-1,00	9,43
02	-1,00	-1,00	+1,00	25,02
03	-1,00	+1,00	-1,00	18,84
04	-1,00	+1,00	+1,00	1,32
05	+1,00	-1,00	-1,00	64,78
06	+1,00	-1,00	+1,00	56,66
07	+1,00	+1,00	-1,00	2,07
08	+1,00	+1,00	+1,00	40,13
09	0,00	0,00	0,00	43,38
10	0,00	0,00	0,00	47,56
11	0,00	0,00	0,00	45,37

Fonte: Autoria própria.

Estes dados foram analisados estatisticamente, obtendo o Diagrama de pareto, ilustrado na Figura 30.

Figura 30 - Diagrama de Pareto para o estudo de separação das proteínas do soro bovino em leite fixo utilizando a resina Capto MMC.



Fonte: Autoria própria.

O Diagrama de Pareto mostra que das variáveis analisadas somente a interação entre o pH_{elu} e o t_{elu} não foi significativo, como pode ser verificado na diferença do percentual de proteínas recuperado de 64,78 e 56,66% para os ensaios 5 e 6, respectivamente, onde a única diferença foi do t_{elu} (15 e 25 min, respectivamente). Dessa maneira, no intuito de verificar a significância e predição do modelo empregado, foi realizada a análise de variância, descrita na Tabela 26.

Tabela 26 - Análise de variância (ANOVA) para o erro puro do planejamento composto central para os ensaios cromatográficos com soro de leite bovino na resina Capto MMC.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	$F_{v1/v2}$	F_{tab} (95%)	F_{tab} (90%)	F_{tab} (75%)
Regressão	3331,77	5	666,35	2,17	5,05	3,45	1,89
Resíduo	1535,13	5	307,03				
Falta de ajuste	1505,03	2	752,52	172,14	19,00	9,00	3,00
Erro puro	8,74	2	4,37				
Total	4866,90	10					

Fonte: Autoria própria.

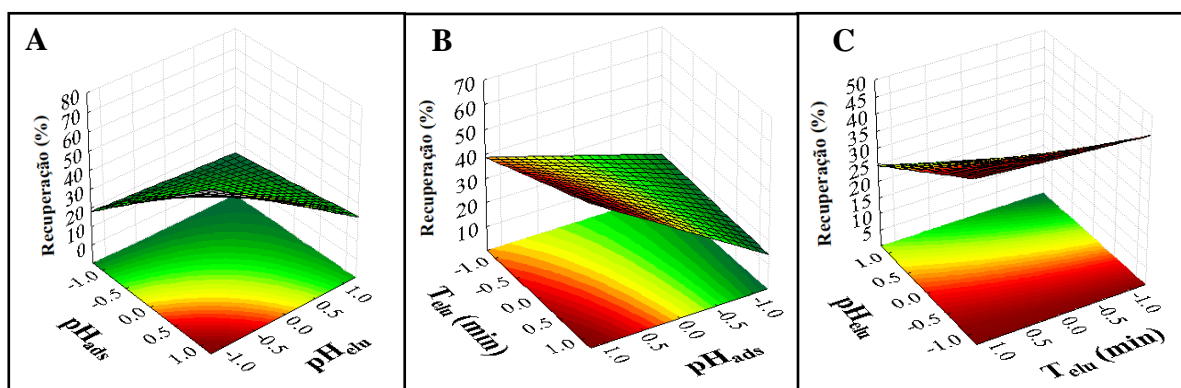
De acordo com a Tabela 26 verificou-se que o modelo quadrático foi significativo para o valor de q somente ao nível de significância de 75%, uma vez que $F_{v1/v2} = 2$ é maior

que $F_{\text{tab}} (75\%) = 1,89$, gerando a equação do modelo descrita na equação 22.

$$\text{Recuperação (\%)} = 1485,94pH_{\text{ads}} - 1093,48pH_{\text{elu}} + 98,07t_{\text{elu}} - 527,31pH_{\text{ads}} \times pH_{\text{elu}} + 126,96pH_{\text{ads}} \times t_{\text{elu}} \quad (22)$$

O coeficiente de correlação (R^2) obtido foi 0,69 para um nível de confiança de 75%, ou seja, esse modelo consegue explicar cerca de 69% dos dados em torno da média. Assim, como obtido para os testes de eluição nas proteínas IgG e BSA, não foi possível atingir significância no nível de 95% quando envolvia recuperação na etapa de eluição, apontando para a necessidade de análise mais contundente dos parâmetros que possam influenciá-la. Embora o modelo não tenha se mostrado significativo, os gráficos de superfície de respostas foram gerados no intuito de melhor compreender os resultados obtidos, os quais estão ilustrados nas Figuras 31 A, B e C.

Figura 31 - Relação dos parâmetros: **A)** pH_{ads} e pH_{elu} com o T_{elu} fixo no ponto central (20 min); **B)** pH_{ads} e T_{elu} (min) com o pH_{elu} fixo no ponto central (6,75); **C)** pH_{elu} e T_{elu} (min) com o pH_{ads} fixo no ponto central (4,8) no percentual de recuperação de proteína na etapa de eluição.



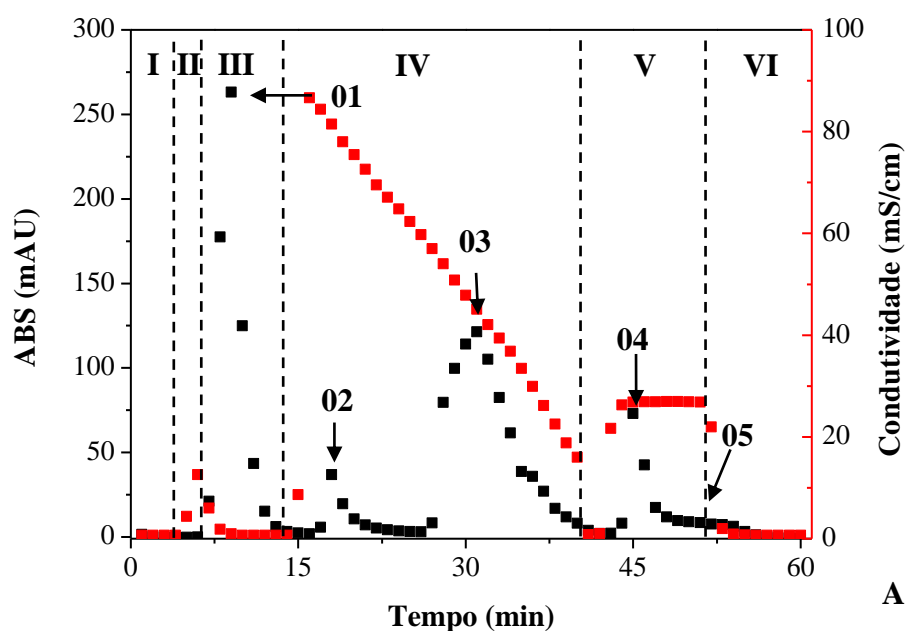
Fonte: Autoria própria.

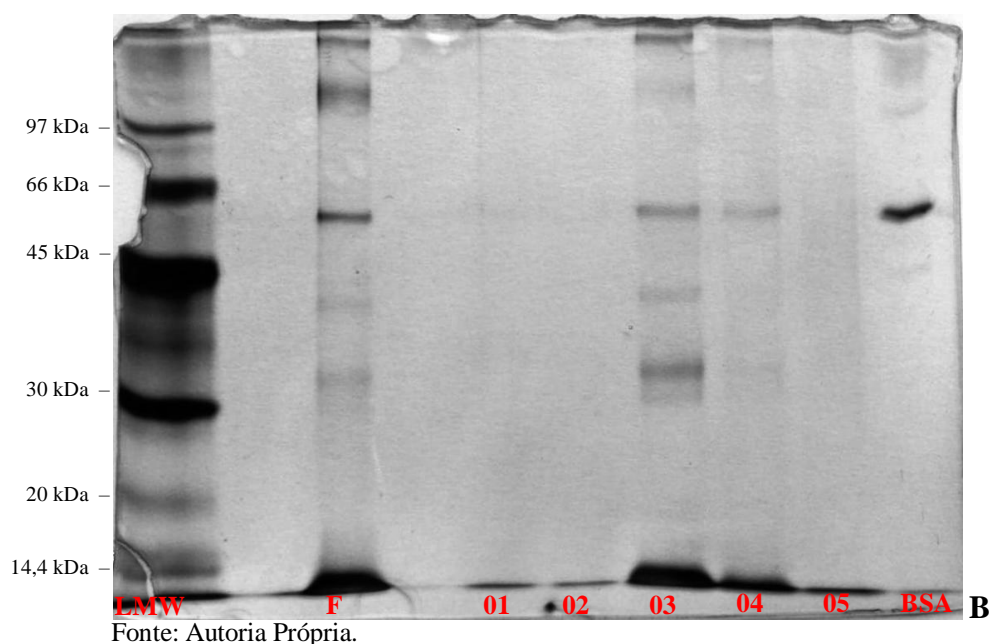
De acordo com os gráficos de superfície de respostas ilustrados acima verificou-se que os melhores resultados foram obtidos nas maiores faixas de pH_{ads} e T_{elu} e nas menores faixas de pH_{elu} . Avaliando os dados do delineamento, verificou-se que as condições do ensaio 5 (pH_{ads} 5,2, pH_{elu} 6,0 e T_{elu} 15 min) e 6 (pH_{ads} 5,2, pH_{elu} 6,0 e t_{elu} 25 min) foram as que tiveram maiores percentuais de recuperação das proteínas na etapa de eluição. Porém, ao se avaliar os ensaios de eletroforese verifica-se que o ensaio 8 (pH_{ads} 5,2, pH_{elu} 7,5 e t_{elu} 25 min) recuperou um número maior de proteínas. Assim, dependendo das proteínas alvo essa condição pode ser utilizada.

As Figuras 32, 33, 34, 35 e 36 ilustram os perfis cromatográficos e as

eletroforeses dos ensaios 2, 5, 6, 8 e 9, os quais apresentaram separação na etapa de eluição.

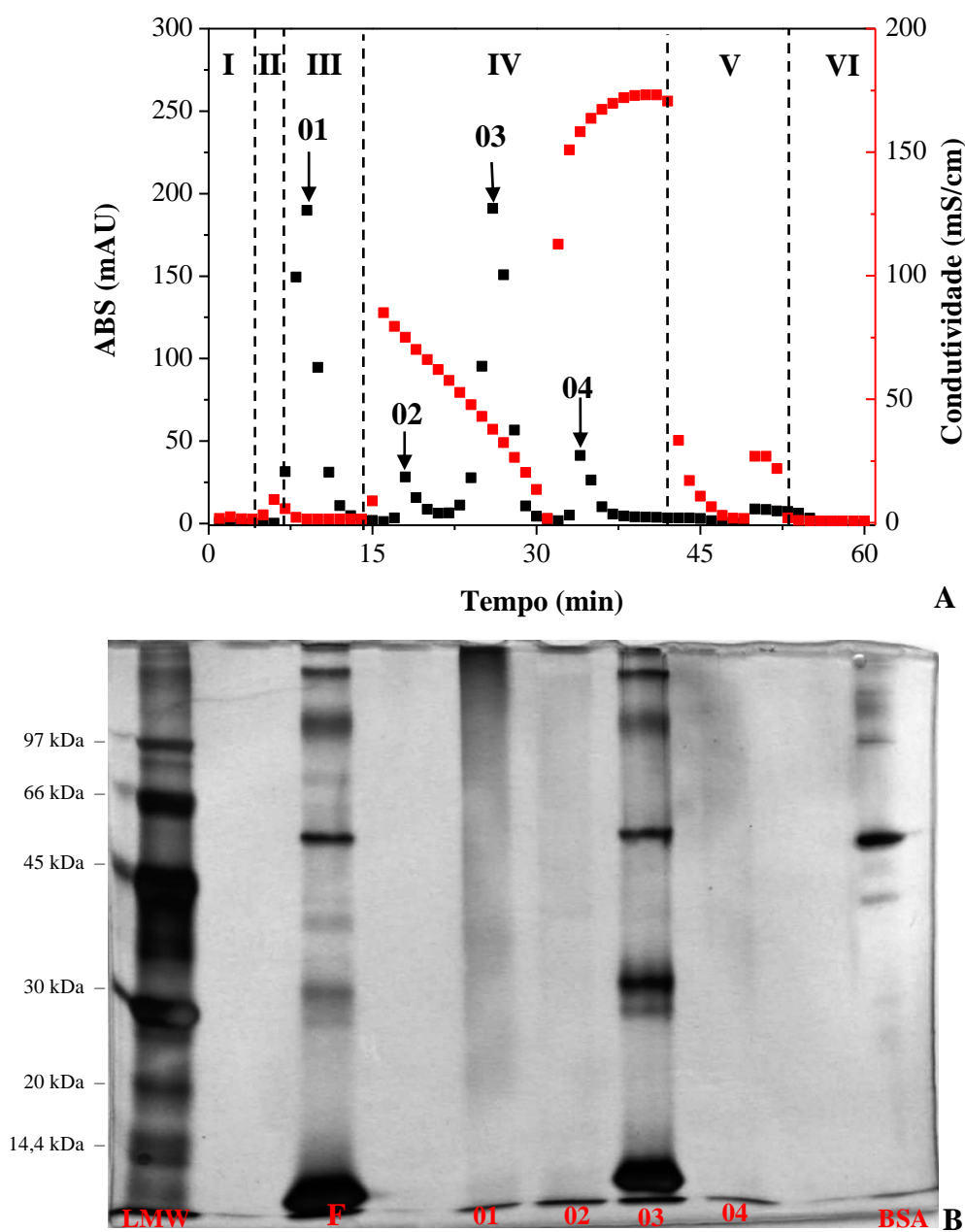
Figura 32 – **A)** Ensaio cromatográfico e **B)** eletroforese revelada com nitrato de prata da amostra de Soro do leite bovino precipitada com sulfato de amônio 80%, dialisada em membrana de 10 kDa (25 mm X 30 cm) e liofilizada na concentração de 0,45 mg/mL. Condições do ensaio 2: pH de adsorção 4,4; pH de eluição 6,0; tempo de eluição de 25 min. Etapas cromatográficas: **I:** Equilíbrio; **II:** Alimentação; **III:** Lavagem; **IV:** Eluição; **V:** Regeneração; **VI:** Reequilíbrio. Pontos dos géis de eletroforese: **LMW:** Padrão de baixa massa molecular; **F:** amostra de soro de soro do leite bovino após precipitação com sulfato de amônio 80%, diálise e liofilização; **01:** Lavagem; **02:** 1º ponto da Eluição; **03:** 2º ponto Eluição; **04:** 1º ponto da Regeneração; **05:** 2º ponto da Regeneração; **BSA:** Padrão de Albumina do Soro Bovino.





De acordo com as Figuras 32 A e 32 B, pode-se observar a presença de dois picos na etapa de eluição. Esta separação, possivelmente, foi favorecida pelo uso do gradiente salino decrescente, onde as proteínas com caráter menos hidrofóbico saem no primeiro pico, seguidas das proteínas com caráter mais hidrofóbico no segundo pico. As bandas de proteínas presentes nos pontos 01 (lavagem) e 02 (1º ponto da eluição) são associados aos Glicomacropéptídeos (9,2 kDa) e a BSA (66kDa). Já no ponto 03 (2º ponto da eluição) foi possível observar a presença de um pico com caráter mais alargado. Santos Neto (2010) explica que este comportamento pode estar associado à coeluição de proteínas, uma vez que têm-se a presença de 06 bandas de proteínas, as quais compreendem a faixa de massa molar que vai de 14 a superior a 97 kDa. As duas bandas superiores a 97 kDa possivelmente são as Ig's (≥ 146 kDa). As bandas abaixo de 97 kDa, são associadas as proteínas BSA (66 kDa), o dímero da β -Lg (36 kDa) e α -La (14,4 kDa). No entanto, na etapa de regeneração (ponto 04) ainda foi possível ver a presença das proteínas BSA (66 kDa) e ao dímero da β -Lg (36 kDa).

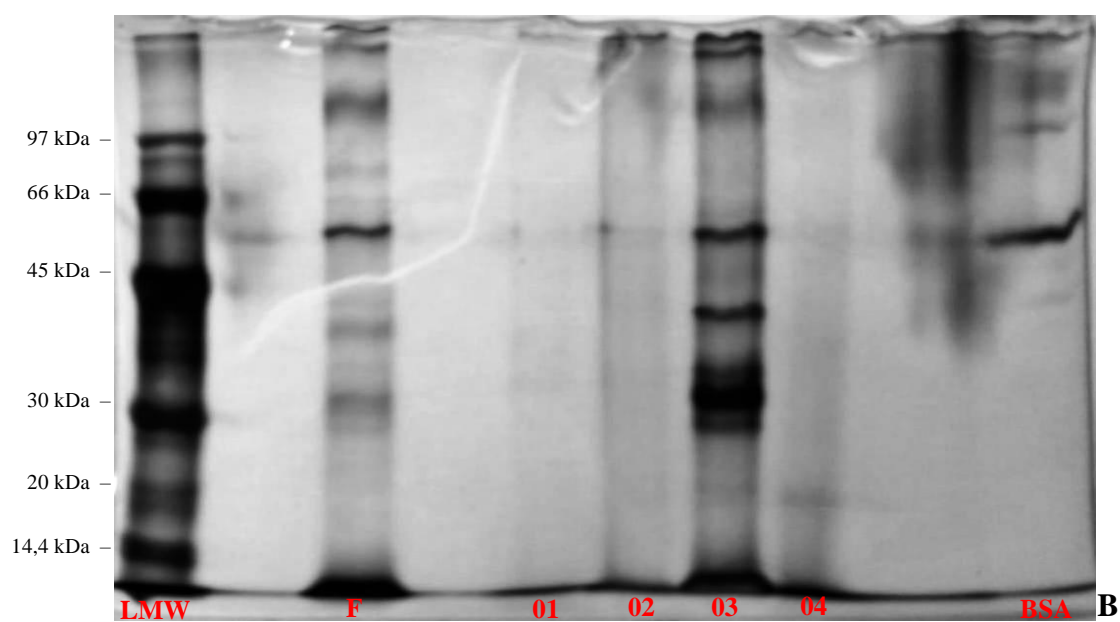
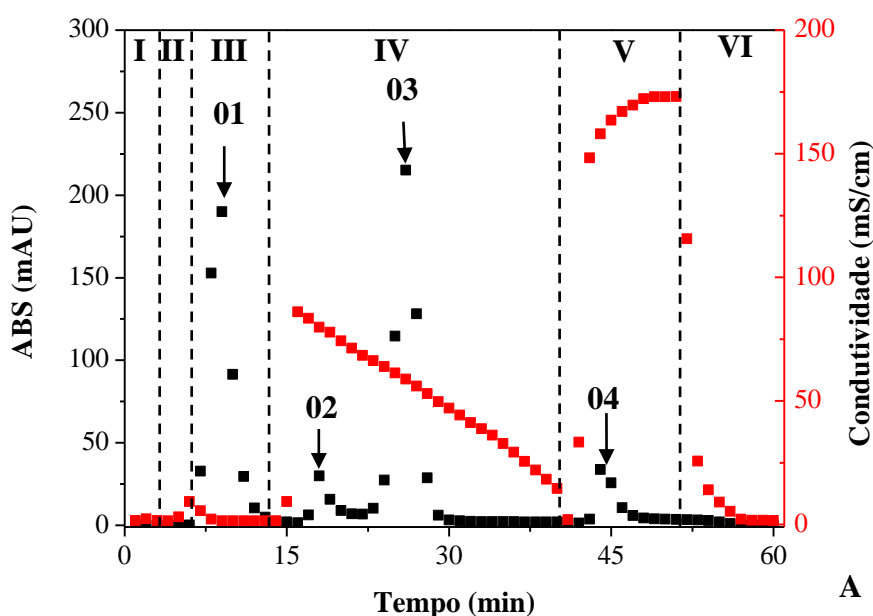
Figura 33 – **A)** Ensaio cromatográfico e **B)** eletroforese revelada com nitrato de prata da amostra de Soro do leite bovino precipitada com sulfato de amônio 80%, dialisada em membrana de 10 kDa (25 mm X 30 cm) e liofilizada na concentração de 0,45 mg/mL. Condições ensaio 5: pH de adsorção 5,2; pH de eluição 6,0; tempo de eluição de 15 min. Etapas cromatográficas: **I:** Equilíbrio; **II:** Alimentação; **III:** Lavagem; **IV:** Eluição; **V:** Regeneração; **VI:** Reequilíbrio. Pontos dos géis de eletroforese: **LMW:** Padrão de baixa massa molecular; **F:** amostra de soro de soro do leite bovino após precipitação com sulfato de amônio 80%, diálise e liofilização; **01:** Lavagem; **02:** 1º ponto da Eluição; **03:** 2º ponto Eluição; **04:** Regeneração; **BSA:** Albumina do Soro Bovino.



Fonte: Autoria Própria.

De acordo com as Figuras 33 A e 33 B, pode-se observar separação de picos na etapa de eluição. Esta separação, possivelmente, foi favorecida pelo uso do gradiente salino decrescente, onde as proteínas com caráter menos hidrofóbico saem no primeiro pico, seguidas das proteínas com caráter mais hidrofóbico no segundo pico. Os pontos 01 (lavagem) e 02 (1º ponto da eluição) são associados aos Glicomacropéptídeos (9,2 kDa). No ponto 03 (2º ponto da eluição) foi possível observar a presença de 05 bandas de proteínas compreendendo a faixa de massa molar que vai de 14 a superior a 97 kDa. As duas bandas superiores a 97 kDa possivelmente são as Ig's (≥ 146 kDa), seguidas da BSA (66 kDa), o dímero do β -Lg (36 kDa) e α -La (14,4 kDa). Diferente do que foi observado no cromatograma do ensaio 2 (Figura 32 A), mesmo havendo coeluição de proteínas no segundo pico da eluição (ponto 03), o mesmo apresentou uma resolução menos assimétrica, o que pode estar associado ao tempo empregado na etapa de eluição, que foi de 15 min, 10 min mais curto que o do ensaio 2. Na etapa de regeneração (ponto 04) não foi possível ver nenhuma banda de proteína.

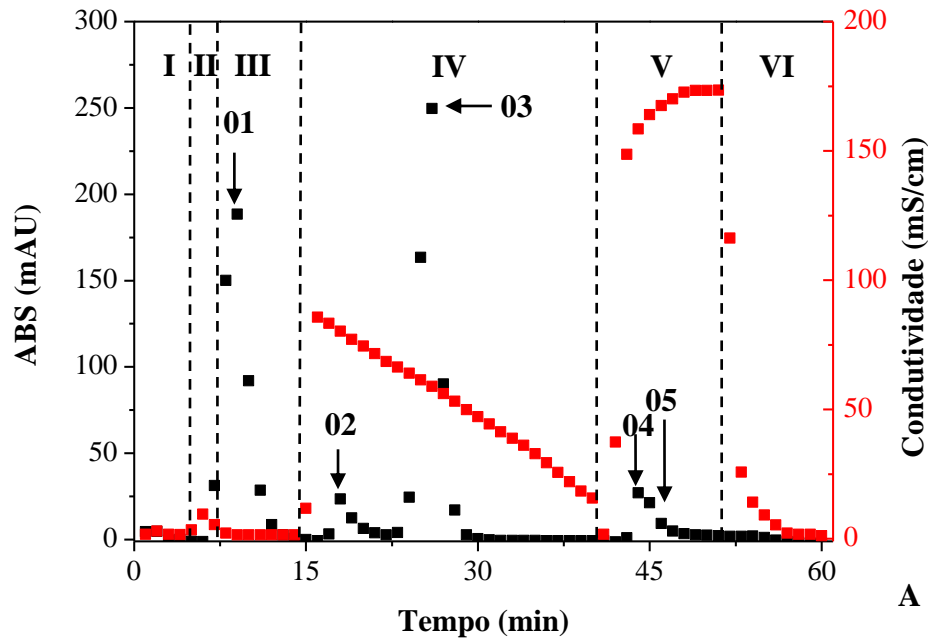
Figura 34 – **A)** Ensaio cromatográfico e **B)** eletroforese revelada com nitrato de prata da amostra de Soro do leite bovino precipitada com sulfato de amônio 80%, dialisada em membrana de 10 kDa (25 mm X 30 cm) e liofilizada na concentração de 0,45 mg/mL. Condições do ensaio 06: pH de adsorção 5,2; pH de eluição 6,0; tempo de eluição de 25 min. Etapas cromatográficas: **I:** Equilíbrio; **II:** Alimentação; **III:** Lavagem; **IV:** Eluição; **V:** Regeneração; **VI:** Reequilíbrio. Pontos dos géis de eletroforese: **LMW:** Padrão de baixa massa molecular; **F:** amostra de soro de soro do leite bovino após precipitação com sulfato de amônio 80%, diálise e liofilização; **01:** Lavagem; **02:** 1º ponto da Eluição; **03:** 2º ponto Eluição; **04:** Regeneração; **BSA:** Albumina do Soro Bovino.

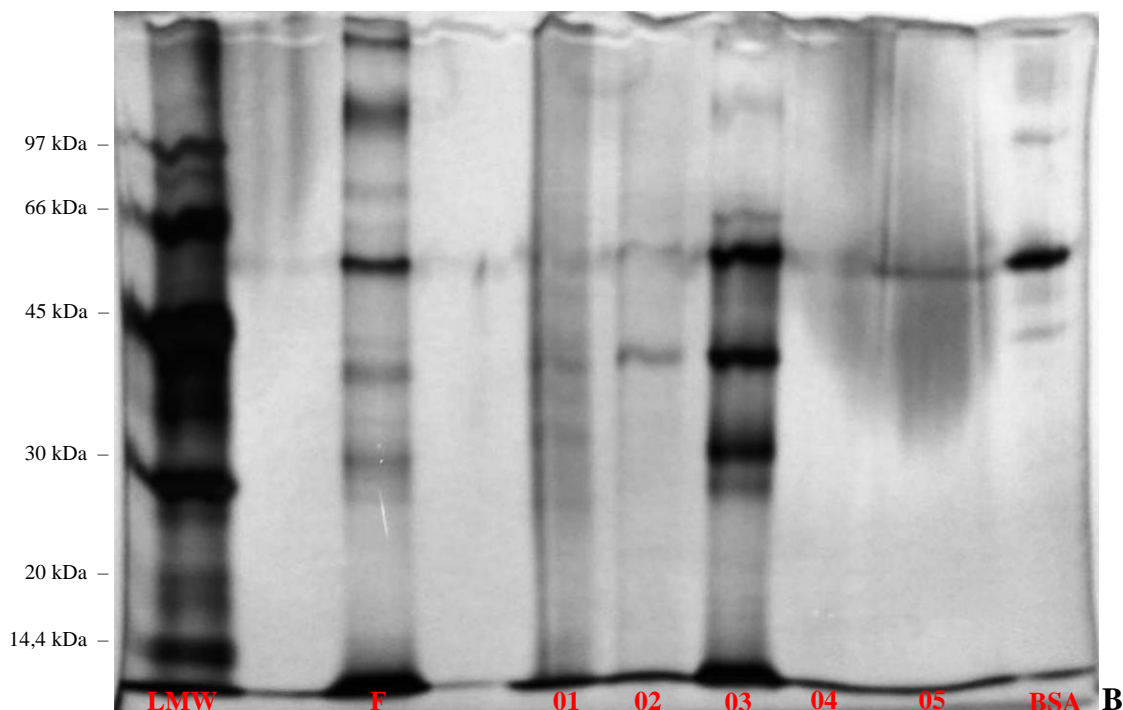


Fonte: Autoria própria.

Analisando as Figuras 34 (A e B) referentes ao ensaio 06, pode-se observar separação de picos na etapa de eluição. Os pontos 01 (lavagem) e 02 (1º ponto da eluição) podem ser associados aos Glicomacropéptídeos (9,2 kDa). No ponto 03 (2º ponto da eluição) foi possível observar a presença de 06 bandas de proteínas compreendendo a faixa de massa molar que vai de 14 a superior a 97 kDa. As duas bandas superiores a 97 kDa possivelmente são as Ig's (≥ 146 kDa), seguidas da BSA (66 kDa) e do dímero da β -Lg (36 kDa). A banda seguinte, possivelmente corresponda a β -Lg (18 kDa), visto que ela está bem próxima da faixa de 20 kDa. Por fim, tem-se α -La (14,4 kDa). Já a etapa de regeneração, ponto 04, apresenta duas bandas protéicas, as quais compreendem, possivelmente, a BSA (66 kDa) e a β -Lg (18 kDa) devido a proximidade da faixa de 20 kDa.

Figura 35 – **A)** Ensaio cromatográfico e **B)** eletroforese revelada com nitrato de prata da amostra de Soro do leite bovino precipitada com sulfato de amônio 80%, dialisada em membrana de 10 kDa (25 mm X 30 cm) e liofilizada na concentração de 0,45 mg/mL. Condições do ensaio 08: pH de adsorção 5,2; pH de eluição 7,5; tempo de eluição de 25 min. Etapas cromatográficas: **I:** Equilíbrio; **II:** Alimentação; **III:** Lavagem; **IV:** Eluição; **V:** Regeneração; **VI:** Reequilíbrio. Pontos dos géis de eletroforese: **LMW:** Padrão de baixa massa molecular; **F:** amostra de soro de soro do leite bovino após precipitação com sulfato de amônio 80%, diálise e liofilização; **01:** Lavagem; **02:** 1º ponto da Eluição; **03:** 2º ponto da Eluição; **04:** 1º ponto da Regeneração; **05:** 2º ponto da Regeneração; **BSA:** Albumina do Soro Bovino.

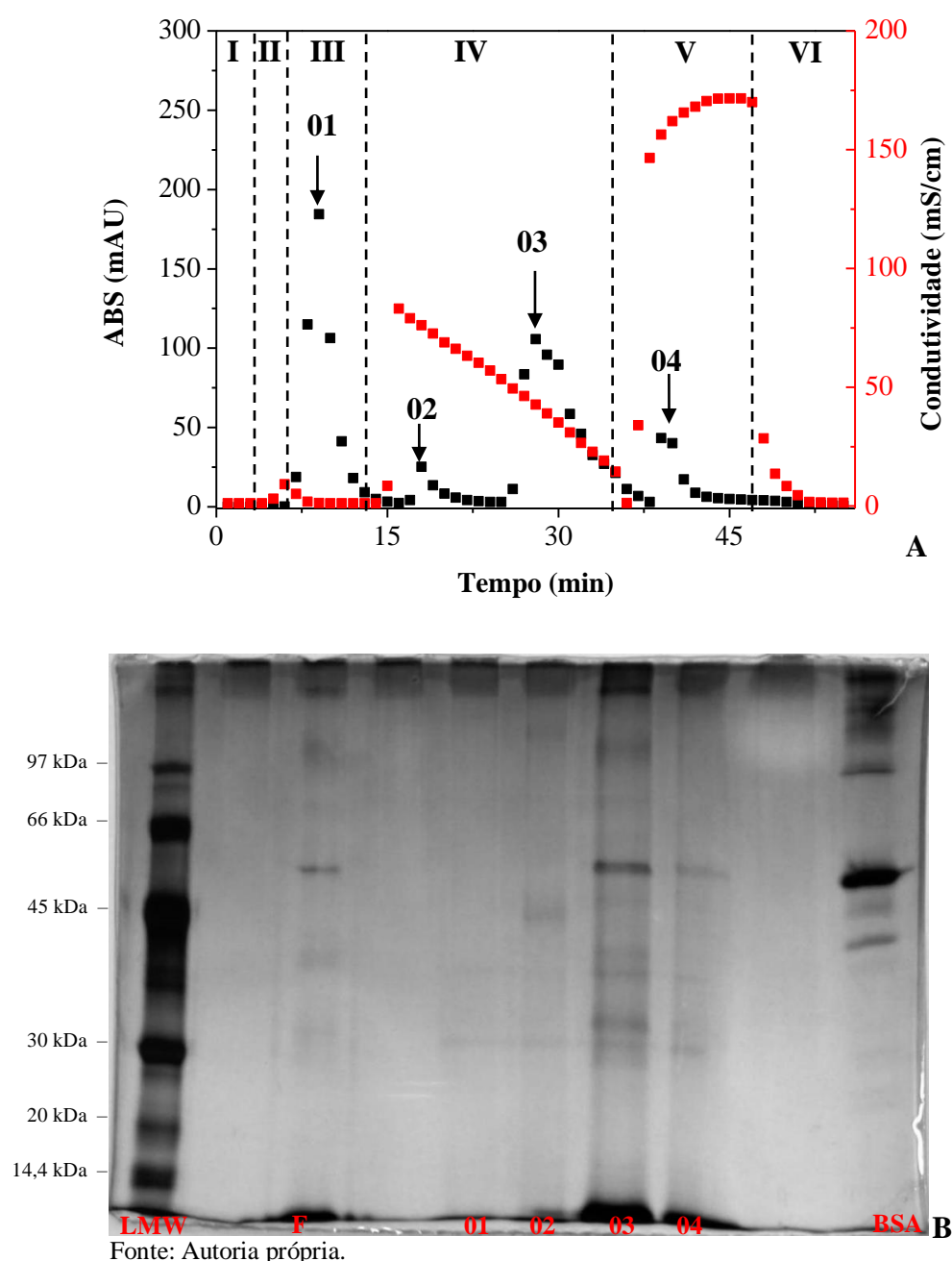




Fonte: Autoria própria.

De acordo com o cromatograma do ensaio 08, verificou-se que foi obtido o mesmo perfil apresentado nos cromatogramas anteriores, porém, com melhor simetria e resolução. No ponto 01, correspondente a lavagem, foi possível ver a presença de 03 bandas de proteínas, compreendendo, possivelmente as proteínas BSA (66 kDa), ao fragmento da proteína do glóbulo de gordura do leite, a Butirofilina (56 kDa) e ao dímero da β -Lg (18 kDa). No ponto 02 (1º ponto da eluição) tem-se as proteínas BSA (66 kDa) e o dímero da β -Lg (18 kDa), semelhante ao ensaio anterior (Figura 35), porém, com bandas mais definidas, apontando que o pH 7,5 foi mais eficiente na etapa de eluição quando comparado ao pH 6,0. Isto pode estar associado ao fato de que no pH 7,5 tem um maior afastamento dos pI's das proteínas eluídas, com isso, as interações de troca iônica irão atuar juntamente com as hidrofóbicas na eluição das proteínas. Ao se avaliar o ponto 03 (2º ponto da eluição), foi possível observar a presença de uma banda de proteína na faixa superior a 97 kDa, possivelmente correspondendo as Ig's (≥ 146 kDa), BSA (66 kDa), Butirofilina (56 kDa) e α -La (14,4 kDa). Na etapa de regeneração, pontos 04 e 05, ainda foi possível verificar traços de BSA (66 kDa).

Figura 36 – **A)** Ensaio cromatográfico e **B)** eletroforese revelada com nitrato de prata da amostra de Soro do leite bovino precipitada com sulfato de amônio 80%, dialisada em membrana de 10 kDa (25 mm X 30 cm) e liofilizada na concentração de 0,45 mg/mL. Condições do ensaio 09: pH de adsorção 4,8; pH de eluição 6,75; tempo de eluição de 20 min. Etapas cromatográficas: **I:** Equilíbrio; **II:** Alimentação; **III:** Lavagem; **IV:** Eluição; **V:** Regeneração; **VI:** Reequilíbrio. Pontos dos géis de eletroforese: **LMW:** Padrão de baixa massa molecular; **F:** amostra de soro de soro do leite bovino após precipitação com sulfato de amônio 80%, diálise e liofilização; **01:** Lavagem; **02:** 1º ponto da Eluição; **03:** 2º ponto Eluição; **04:** Regeneração; **BSA:** Albumina do Soro Bovino.



Assim como nos perfis anteriores, no ensaio 09 tem-se a presença de dois picos na etapa de eluição. No ponto 01 (lavagem) não se teve presença de bandas protéicas. No 1º pico da eluição (ponto 02) tem-se a presença de 03 bandas de proteínas, onde a de maior massa molar possivelmente está relacionada às Ig's (≥ 146 kDa), a Butirofilina (56 kDa), e por último, tem-se o dímero da β -Lg (18 kDa). Ao se avaliar o 2º pico da eluição (ponto 03), foi possível observar a presença duas bandas de proteína na faixa superior a 97 kDa que correspondem as Ig's (≥ 146 kDa). Nas faixas de 30 e 56 kDa tem-se a Butirofilina (56 kDa) e o dímero da β -Lg (18 kDa). Por fim, verificou a presença de α -La (14,4 kDa). Assim como no ensaio 2 (Figura 32), o segundo pico da eluição teve caráter alargado, estendendo-se até o final da eluição. Nestes dois ensaios (2 e 9) os pHs de eluição empregados são 6,00 e 6,75, respectivamente, faixa de pH que compreende os pI's da Ig's. Assim, no decorrer da etapa de eluição, ao diminuir a força iônica, nessa faixa de pH, as interações de troca iônica podem ser favorecidas, dificultando a eluição das proteínas. A etapa de regeneração (ponto 04) ainda apresentou traços de todas as proteínas presentes no 2º pico da eluição (ponto 03), exceto a banda das Ig's.

Dessa maneira, verificou-se que, nas condições analisadas, as proteínas adsorvidas pela Capto MMC foram as mesmas em todos os ensaios, compreendendo as Ig's (≥ 146 kDa), BSA (66 kDa), Butirofilina (56 kDa), dímero da β -Lg (30 kDa), β -Lg (18 kDa) e α -La (14,4 kDa). Os perfis apresentados nestes experimentos assemelham-se aos encontrados por Cavalcanti (2010) ao avaliar a purificação das proteínas α -La e β -Lg usando resinas de troca iônica, e também por Cheison *et al* (2011) ao avaliarem a temperatura e pH para obtenção da α -La nativa com baixo residual de β -Lg ou na forma totalmente purificada.

4.5 Purificação das proteínas do soro do leite bovino em leito expandido

Para os ensaios em leito expandido, foi avaliado o desempenho da resina multimodal Capto MMC em leito expandido, visto que a mesma apresenta densidade de $1,08 \text{ g/cm}^3$. Porém, ao iniciar o processo verificou-se a que a densidade apresentada pela Capto MMC não é suficiente para sua aplicação em ALE, uma vez que a mesma se dispersou ao longo do leito e não foi possível identificar a altura expandida, como pode ser ilustrada na Figura 37. Dessa maneira, os ensaios em ALE foram conduzidos com as resinas *Streamline SP* e *Streamline DEAE*.

Figura 37 - Perfil da Capto MMC em sistema de fluidização.

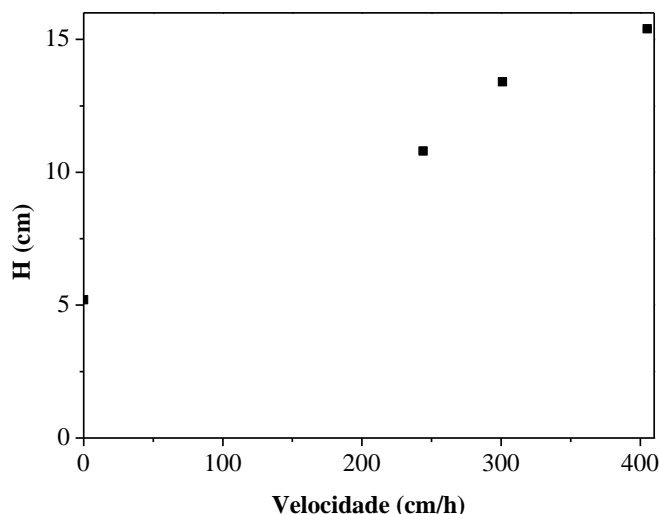


Fonte: Autoria própria.

4.5.1 Grau de Expansão do Leito

Antes de iniciar os experimentos com leito expandido, foi determinado o GE, relação entre a altura inicial e final do leito a uma velocidade específica. Este parâmetro determina o quão próximo está o leito expandido do empacotado, determina a estabilidade do leito, de maneira a evitar o uso de velocidades que promova a dispersão do leito. A Figura 38 ilustra o perfil de expansão para a resina *Streamline SP* em tampão Fosfato de Sódio (40 mM pH 7,5).

Figura 38 - Perfil do Grau de Expansão para a resina *Streamline SP* em tampão fosfato 40 mM pH 7,5 em função da velocidade de fluxo. $H_0 = 5,2$ cm.



Fonte: Autoria própria.

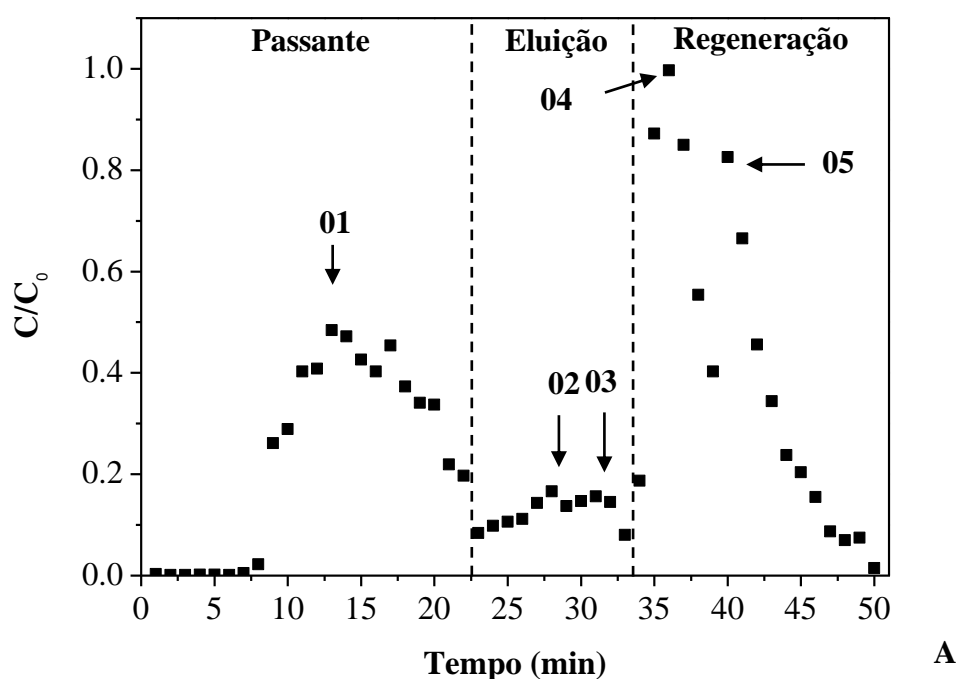
De acordo com a Figura 38, verifica-se que a expansão do leito se deu de maneira linear a velocidade. As velocidades utilizadas configuraram uma expansão do leito na ordem de 2,08 a 2,96, encontrando-se na faixa indicada pelo fabricante (Pharmacia) que é 2 a 3 na velocidade de 300 cm/h (Pharmacia, 1993). Assim, optou-se por trabalhar na velocidade de 252 cm/h, pois a mesma conferiu o grau de expansão já indicado pelo fabricante e garantiu maior estabilidade do leito fluidizado. Cavalcanti (2010) ao avaliar a expansão da resina *Streamline SP* utilizando tampão Tris (50 mM, pH 7,5) com $H_0 = 5,0$ cm e $V = 300$ cm/h obteve um $GE = 1,52$, o que configura um leito com GE menor do que o obtido no presente trabalho. Nas condições utilizadas neste trabalho, foi possível obter boa estabilidade do leito e maior GE trabalhando com uma velocidade menor do que a referenciada.

4.5.2 Condições Cromatográficas

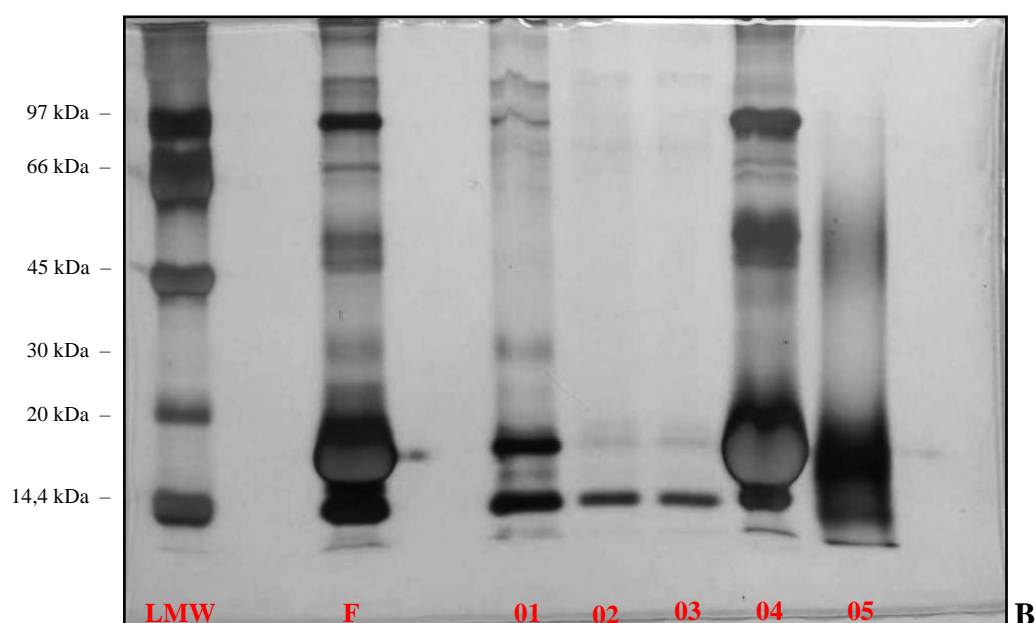
4.5.2.1 Estratégia 1

As Figuras 39 A e 39 B ilustram os perfis cromatográfico e de eletroforese obtidos com a amostra de soro do leite bovino na resina *Streamline SP*. Neste ensaio foram utilizadas as condições obtidas no delineamento experimental realizado para amostra de soro do leite bovino tratado (precipitação/diálise/liofilização) na resina Capto MMC em leito fixo.

Figura 39 – **A)** Ensaio cromatográfico e **B)** eletroforese revelada com nitrato de prata da amostra de Soro do leite bovino na resina *Streamline* SP. Adsorção: tampão acetato 40 mM pH 5,2; Eluição: Tampão fosfato (40 mM, pH 7,5) com gradiente decrescente de NaCl (1 – 0 M). **LMW:** Padrão de baixa massa molecular; **F:** amostra de soro de soro do leite bovino *in natura*; **01:** Passante; **02:** 1° ponto da Eluição; **03:** 2° ponto Eluição; **04:** 1° ponto da Regeneração; **05:** 2° ponto da Regeneração.



Fonte: Autoria própria.



Fonte: Autoria própria.

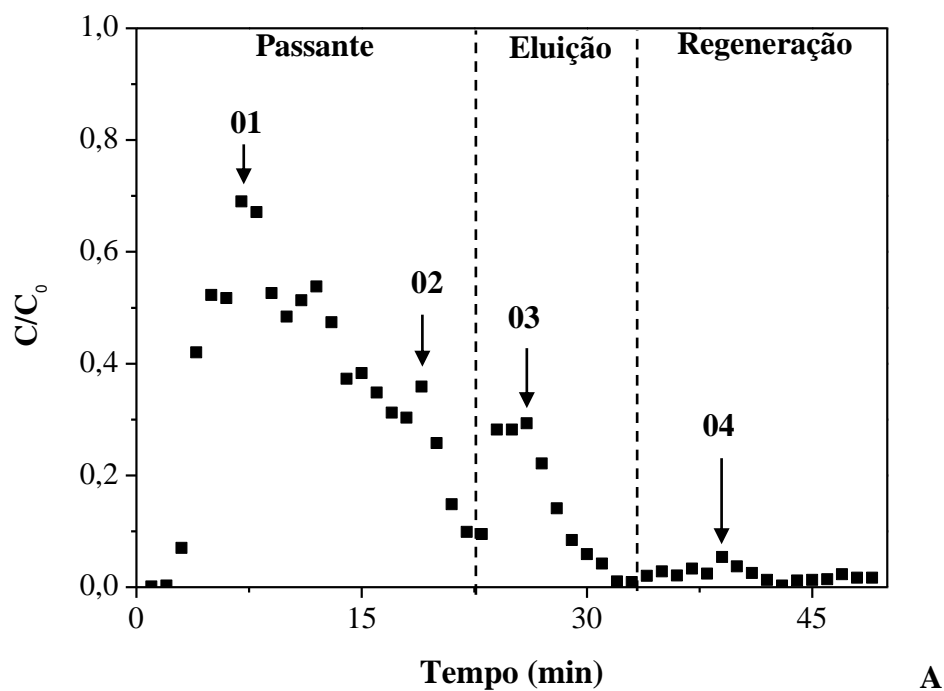
Na corrida cromatográfica é possível verificar dois picos na etapa de eluição (02 e 03). Em ambos tem-se a presença da α -La e traços da β -Lg na faixas de 14,4 kDa e 18 kDa, respectivamente. Nestes mesmos picos ainda existem três bandas de proteínas na faixa acima de 66 kDa que podem ser traços das proteínas Lactoferrina (78 kDa), Transferrina (80 kDa) e Lactoperoxidase (89 kDa). Na etapa de regeneração, além das proteínas citadas na etapa anterior, tem-se a presença de Butirofilina (56 kDa), BSA (66 kDa), IG's (\geq 146 kDa).

Através do cálculo de balanço de massa obteve-se que as condições de eluição do teste 1 foram capazes de recuperar 15,78% das proteínas adsorvidas. Além disso, constatou-se que na etapa de eluição verificou-se maior seletividade pela proteína α -La (14,4 kDa).

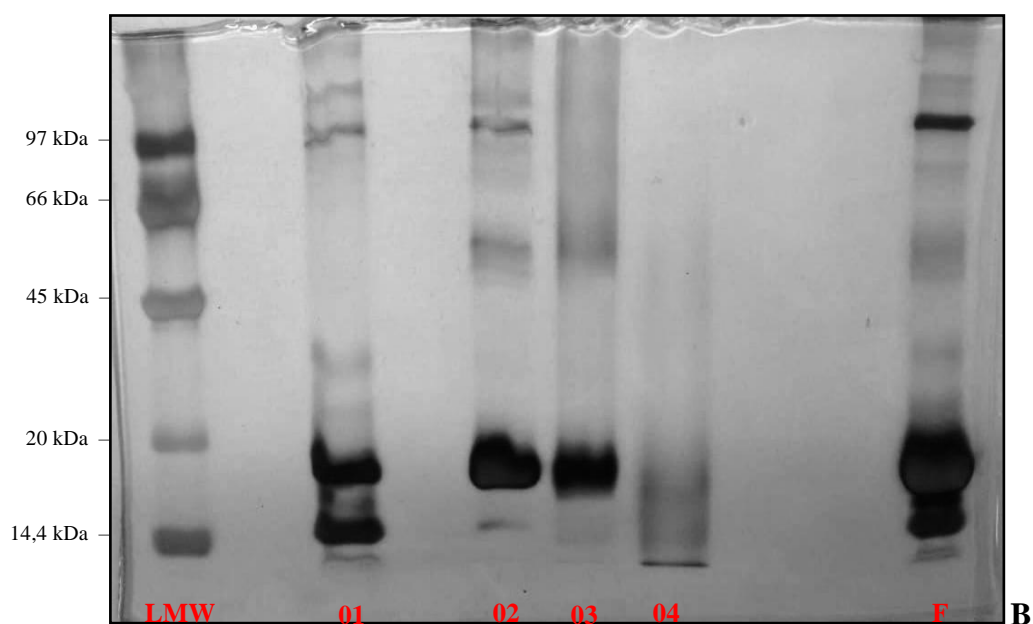
4.5.2.2 Estratégia 2

As Figuras 40 A e 40 B ilustram os perfis cromatográficos e de eletroforese obtidos com a amostra de soro do leite bovino na resina *Streamline SP*. Neste ensaio, foram reproduzidas as melhores condições encontradas por Cavalcanti (2010) ao utilizar resinas de troca iônica *Streamline SP* e *Streamline DEAE* e *Streamline Phenyl* para purificação das proteínas α -La e β -Lg em leite expandido. Neste ensaio, embora prolongado, constatou-se a presença somente de um pico na etapa de eluição (03). Neste, foi possível verificar maior seletividade da resina *Streamline SP* pela proteína β -Lg (18 kDa) e traços da Butirofilina (56 kDa). Na regeneração (04), ainda é possível ver traços da β -Lg (18 kDa). Através do cálculo de balanço de massa obteve-se que as condições de eluição do teste 2, recuperou 30,67% das proteínas adsorvidas. Em pH7,5 as proteínas BSA, β -Lg e α -La encontram-se carregadas negativamente, aumentando sua interação com a resina *Streamline SP*.

Figura 40 – **A)** Ensaio cromatográfico e **B)** eletroforese revelada com nitrato de prata da amostra de Soro do leite bovino na resina *Streamline* SP. Adsorção: tampão Fosfato de Sódio (40 mM, pH 7,5); Eluição: tampão Fosfato de Sódio (40 mM, pH 7,5) + NaCl (1 M). **LMW:** Padrão de baixa massa molecular; **F:** amostra de soro de soro do leite bovino *in natura*; **01:** 1º ponto do Passante; **02:** 2º ponto do Passante; **03:** Eluição; **04:** Regeneração.



Fonte: Autoria própria.

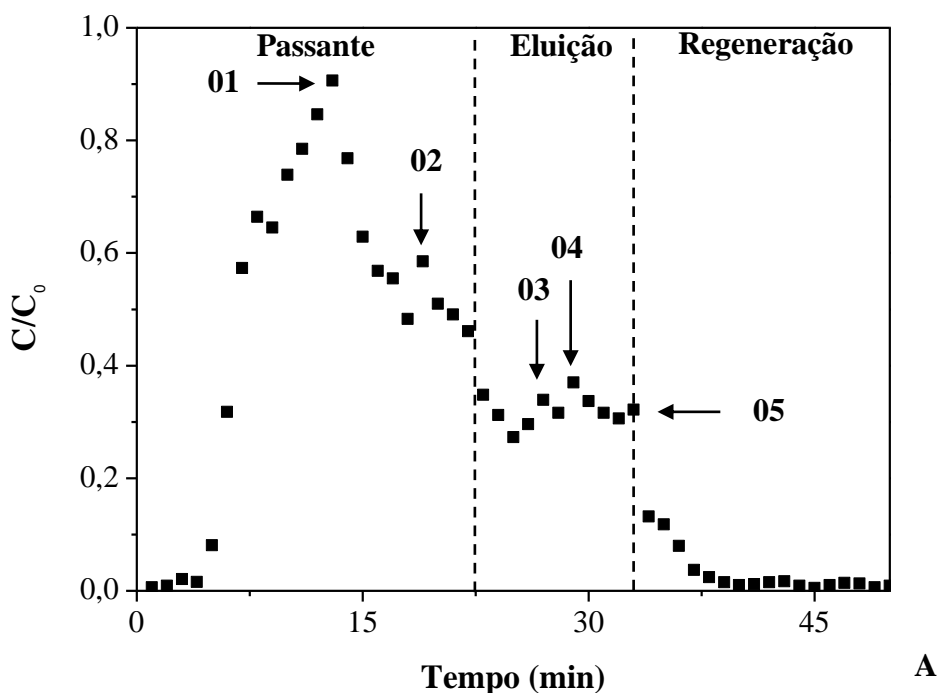


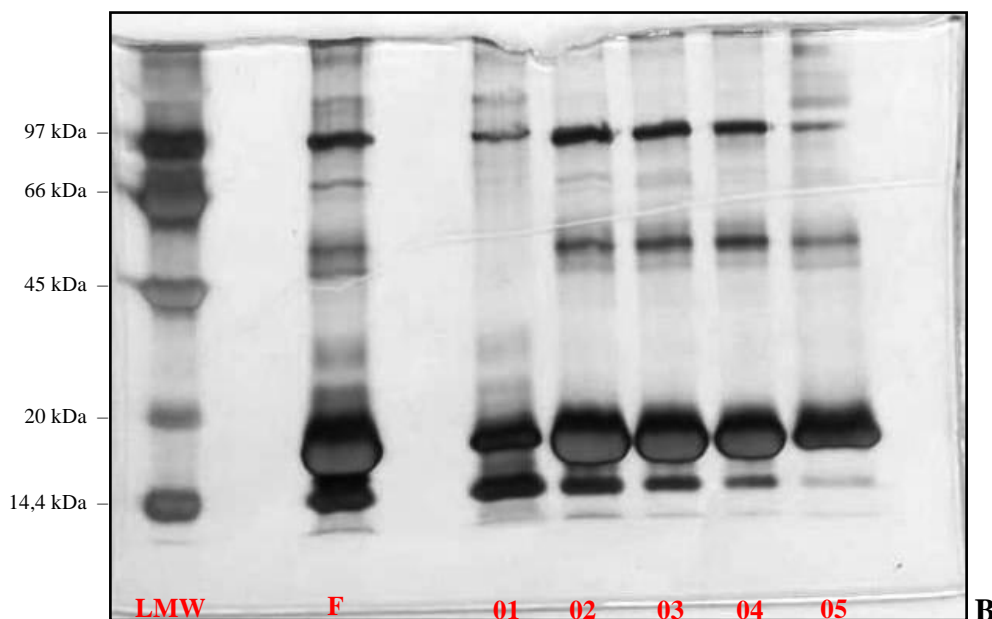
Fonte: Autoria própria.

4.5.2.3 Estratégia 3

Neste ensaio foi realizado um gradiente decrescente de pH na etapa de eluição com concentração de NaCl constante de 1 M, buscando avaliar a separação e/ou purificação das proteínas do soro do leite bovino em leite expandido. As Figuras 41 A e 41 B ilustram os perfis cromatográfico e de eletroforese obtidos com a amostra de soro do leite bovino na resina *Streamline SP*.

Figura 41 – **A)** Ensaio cromatográfico e **B)** eletroforese revelada com nitrato de prata da amostra de Soro do leite bovino na resina *Streamline SP*. Adsorção: tampão Fosfato de Sódio (40 mM, pH 7,5); Eluição: tampão Fosfato de Sódio (40 mM, pH com gradiente decrescente de 8,0 - 7,0) + NaCl (1 M). **LMW**: Padrão de baixa massa molecular; **F**: amostra de soro de soro do leite bovino *in natura*; **01**: 1º ponto do Passante; **02**: 2º ponto do Passante; **03**: 1º Ponto da Eluição; **04**: 2º Ponto da Eluição; **05**: Regeneração.





Fonte: Autoria própria.

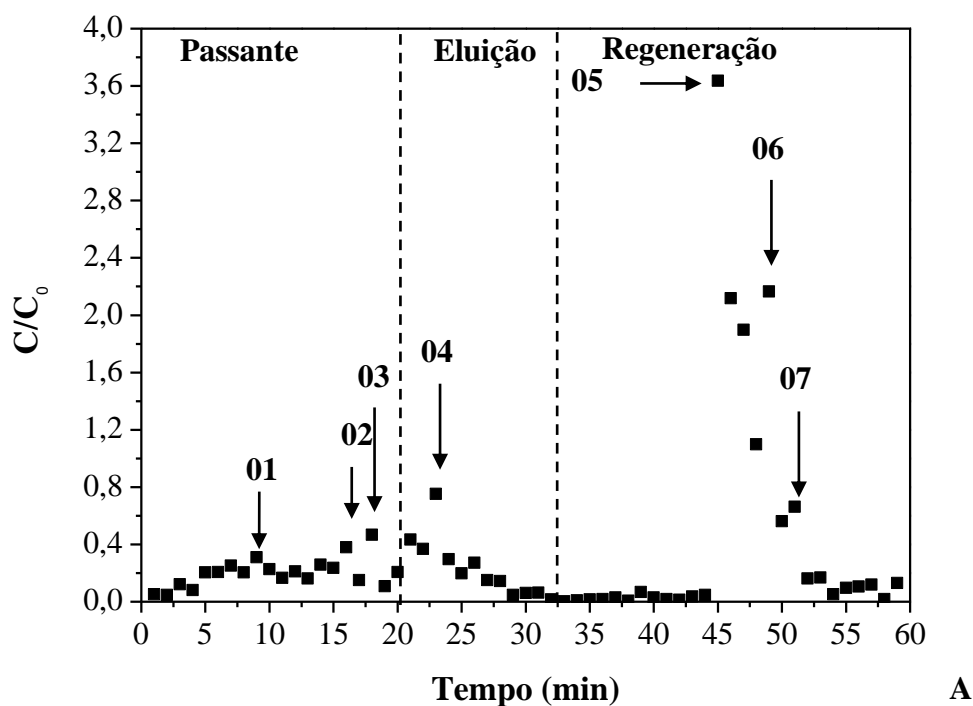
Neste ensaio, através da eletroforese, foi possível verificar que o gradiente empregado na etapa de eluição não foi suficiente para separar as proteínas do soro do leite bovino. Pessoa Jr. e Kilikian (2005) afirmam que mesmo a proteína apresentando carga global negativa, ou seja, estando em pH acima do seu pI, ainda pode ocorrer adsorção por um trocador com carga não esperada (no caso, positiva), fenômeno conhecido como efeito Donnan. Isso vai depender da localização dos grupos com cargas presentes na superfície da proteína. Em todos os pontos analisados, estão presentes as mesmas proteínas. São elas: α -La (14,4 kDa), β -Lg (18 kDa), Butirofilina (56 kDa), BSA (66 kDa) e uma banda que pode estar associada a proteína Lactoperoxidase (89 kDa). Assim, para estas condições, o cálculo do balanço de massa apontou 9,63% como percentual de recuperação na eluição em relação ao que foi adsorvido.

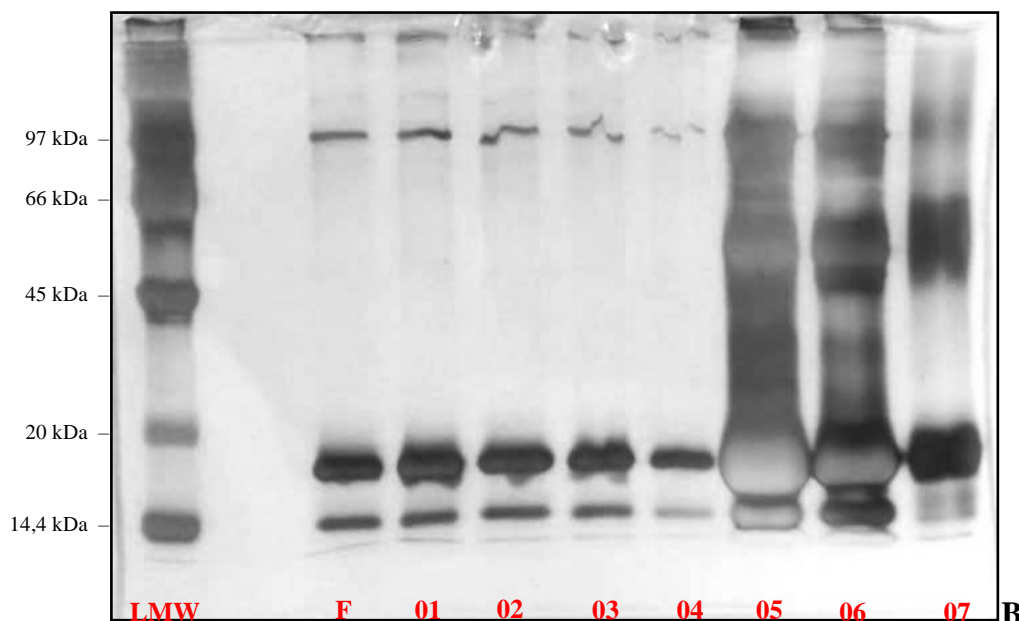
4.5.2.4 Estratégia 4

Uma vez analisadas as três condições supracitadas, optou-se por realizar dois testes com sequência de etapas cromatográficas, utilizando as condições do teste 2 como etapa inicial. A fração passante proveniente do teste 2 foi utilizada como alimentação da segunda etapa na resina *Streamline* DEAE. Enquanto a fração da eluição do teste 2 foi a alimentação da resina *Phenyl Sepharose*. Sequências cromatográficas são bastante empregadas em processos para purificação de proteínas, uma vez que matrizes, como soro do leite bovino,

apresentam proteínas com diferentes características. Dependendo das condições, algumas apresentam-se com cargas positivas ou negativas, ou com características hidrofóbicas. As Figuras 42 A e 42 B ilustram os perfis cromatográficos e de eletroforese obtidos com a injeção do passante na resina *Streamline* DEAE.

Figura 42 – **A)** Ensaio cromatográfico e **B)** eletroforese revelada com nitrato de prata do passante resultante do teste 2 na resina *Streamline* DEAE. Adsorção: tampão Fosfato de Sódio (40 mM, pH 7,5); Eluição: Tampão Fosfato de Sódio (40 mM, pH 7,5) + NaCl (1 M). **LMW:** Padrão de baixa massa molecular; **F:** fração da etapa passante coletada no teste 2; **01:** 1º ponto do Passante; **02:** 2º ponto do Passante; **03:** 3º Ponto do Passante; **04:** Eluição; **05:** 1º Ponto da Regeneração; **06:** 2º da Regeneração; **07:** 3º Ponto da Regeneração.





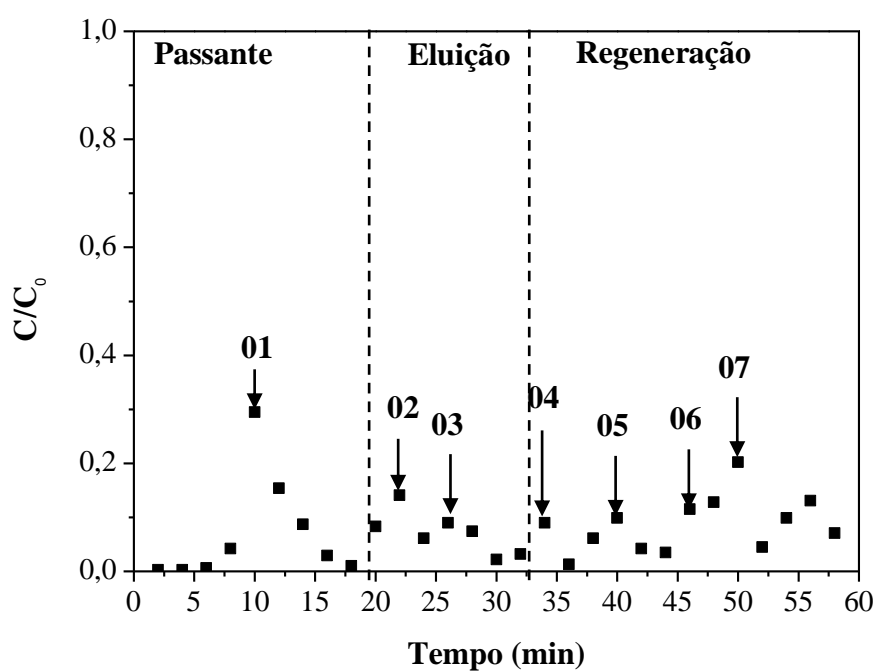
Fonte: Autoria própria.

Analisando o perfil cromatográfico, verifica-se a presença de pico na etapa de eluição (04), onde se tem a presença das proteínas α -La (14,4 kDa), β -Lg (18 kDa), uma banda próximo de 97 kDa que pode está associada as proteínas Lactoperoxidase (89 kDa), Lactoferrina (78 kDa) e Transferrina (80 kDa), e por último, uma banda acima de 97 kDa que se refere as Ig's (≥ 146 kDa). Para as condições utilizadas, o cálculo do balanço de massa mostrou 10% como percentual de recuperação na eluição.

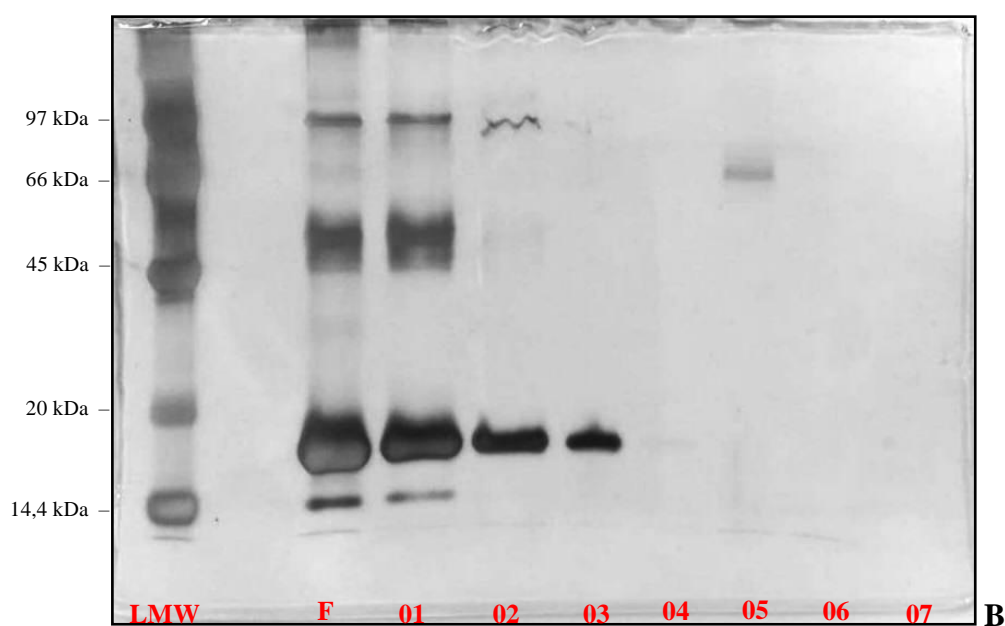
4.5.2.5 Teste 5

A Fração eluída no teste 2 foi injetada na resina hidrofóbica *Phenyl Sepharose*, visto que a mesma apresenta NaCl na concentração de 1 M. Esta condição permite que os íons salinos se associem com as moléculas de água na solução, ao invés da proteína, a qual expõem seus grupos hidrofóbicos para interagir com os sítios ativos da resina. Os perfis cromatográfico e de eletroforese encontram-se ilustrados nas Figuras 43 A e 43 B. Vale ressaltar que este ensaio foi conduzido em leito fixo, uma vez que essa resina não é apropriada para aplicação em leito expandido.

Figura 43 – **A)** Ensaio cromatográfico e **B)** eletroforese revelada com nitrato de prata da fração eluída no teste 2 na resina *Phenyl Sepharose*. Adsorção: tampão Fosfato de Sódio (40 mM, pH 7,5) + NaCl (1 M); Eluição: tampão Fosfato de Sódio (40 mM, pH 7,5). **LMW:** Padrão de baixa massa molecular; **F:** fração da etapa de eluição coletada no teste 2; **01:** Passante; **02:** 1º ponto da Eluição; **03:** 2º Ponto da Eluição; **04:** 1º Ponto da Regeneração; **05:** 2º Ponto da Regeneração; **06:** 3º Ponto da Regeneração; **07:** 4º Ponto da Regeneração.



A



B

Fonte: Autoria própria.

Através do perfil cromatográfico verifica-se a presença de dois picos na etapa de eluição (02 e 03). O ensaio de eletroforese mostra no pico 02 a presença da β -Lg (18 kDa) e uma banda próxima de 97 kDa que pode estar associada às proteínas Lactoperoxidase (89 kDa), Lactoferrina (78 kDa) e Transferrina (80 kDa). No entanto, no pico 03 é possível verificar somente a presença da β -Lg (18 kDa). O balanço de massa aponta 68% como percentual de recuperação na etapa de eluição nestas condições. Com este resultado, verificou-se que, nas condições utilizadas, o uso das interações de troca iônica e hidrofóbica, através das resinas *Streamline SP* e *Phenyl Sepharose*, foram mais eficientes no processo de purificação da β -Lg (18 kDa), além de mostrar maior seletividade quando comparado à resina multimodal Capto MMC. Rosa (2015) explica que a cromatografia de troca iônica raramente é utilizada como única etapa para purificação de proteínas devido a sua baixa especificidade, uma vez que possuem cargas. Assim, uma etapa com interação hidrofóbica é capaz de auxiliar na purificação das moléculas com características hidrofóbicas. Ao investigar a purificação das proteínas do soro do leite utilizando as resinas *Streamline SP*, *Streamline DEAE* e *Streamline Phenyl*, Cavalcanti (2010) verificou na etapa de eluição, para todas as resinas, a presença das proteínas: BSA (66 kDa), Lactoferrina (76 kDa), Lactoperoxidase (89 kDa), dímero da β -lactoglobulina (30 kDa), β -Lg (18,3 kDa) e α -La (14 kDa).

5 CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados verificou-se que, nas condições obtidas pelos delineamentos experimentais, a resina multimodal Capto MMC apresentou alta capacidade de adsorção para as proteínas IgG e BSA, onde os modelos do delineamento mostraram-se significativos no níveis de significância a partir de 90%. Para os ensaios de eluição de ambas as proteínas, os modelos do delineamento foram significativos ao nível de significância de 75%, devido as diferentes formas de interação das proteínas com a resina Capto MMC. Quando as melhores condições obtidas nos delineamentos foram reproduzidas em amostras de soro de sangue humano apresentaram ótimo desempenho, recuperando somente IgG e HSA na etapa de eluição.

No que se refere ao tratamento realizado nas amostras de soro do leite bovino para os ensaios em leito fixo, os ensaios cromatográficos e suas eletroforeses mostram que o tratamento utilizado conseguiu recuperar um teor de 0,7% de proteínas, o qual apresentou perfil de proteínas condizente ao reportado na literatura.

Assim como nos ensaios de eluição da IgG e BSA, o delineamento experimental realizado para as amostras de soro do leite bovino não se mostrou significativo, o que pode está associado às múltiplas interações envolvidas. Porém, o ensaio com melhor desempenho apresentou um percentual de recuperação na etapa de eluição de 40,13%, além de maior seletividade pelas proteínas BSA (66 kDa) e o dímero da β -Lg (30 kDa). Dessa maneira, podem ser utilizadas como etapa de pré-purificação para obtenção destas proteínas.

Quanto aos ensaios realizados em leito expandido com as resinas de troca iônica *Streamline SP* e *Streamline DEAE*, verificou-se que, apesar de seu uso em ALE, as condições cromatográficas utilizadas não viabilizaram a separação e/ou purificação de proteínas do soro do leite bovino, o que pode está associado às características dos aminoácidos presentes na superfície das proteínas (hidrofóbicos e com cargas). No entanto, o uso destas duas resinas de maneira combinada mostraram maior seletividade para a proteína β -Lg (18 kDa).

O uso combinado das resinas *Streamline SP* e *Phenyl Sepharose* foram eficientes para obtenção da proteína β -Lg (18 kDa) isolada das demais. Isso sugere que o uso das interações de troca iônica e hidrofóbica torna-se mais eficiente nos processos de purificação quando utilizadas separada e sequencialmente.

Diante do apresentado, conclui-se que o emprego da resina multimodal Capto MMC tornou-se muito eficiente nas etapas de adsorção. No entanto, na eluição é necessária

uma investigação mais abrangente de parâmetros como pH, força iônica e uso de gradientes de pH e salino. As condições encontradas no presente trabalho se mostraram eficientes na separação da IgG a partir do soro humano, assim também como na obtenção da β -Lg na forma isolada a partir do soro do leite bovino.

5.1 Discussão Geral

Diante do conteúdo apresentado, verifica-se uma abordagem completa do uso de técnicas cromatográficas para captura de proteínas a partir de amostras complexas (soros do sangue humano e do leite bovino). Através dos delineamentos experimentais realizados, foi possível o controle dos parâmetros pH, C_t e C_{sal} , constatando o potencial do uso da resina multimodal Capto MMC como etapa de pré purificação das proteínas do soro do sangue humano (HSA e IgG) e soro do leite bovino (BSA e dímero da β -Lg).

A obtenção da β -Lg e BSA na forma purificada, a partir do soro do leite bovino, foi possibilitada através do uso das técnicas nos leitos expandido e fixo com a combinação das resinas *Streamline SP* e *Phenyl Sepharose*, respectivamente, ressaltando a eficiência e importância dessa técnica.

Dessa maneira, como trabalhos futuros para a captura de proteínas com resinas multimodais podem ser apontados:

1. Estudo de outros sais adicionados nos tampões como sulfato de amônio e ureia;
2. Estudo de gradientes de eluição, como: pH e salino.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Antibodies and Antigens**. In: Cellular and Molecular Immunology, 2 ed., 1994.
- ALMEIDAR. M. R. G. **Estudo da purificação do ácido clavulânico utilizando processo contínuo de adsorção**. 2003. 170 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- ALMEIDA, C. C.; CONTE JÚNIOR, C. A.; SILVA, A. C. O.; ALVARES, T. S. Proteína do soro do leite: composição e suas propriedades funcionais. **Enciclopédia biosfera**, v. 9, n. 16, p. 1840 – 1854, 2013.
- ALMEIDA, C. C.; MONTEIRO, M. L. G.; COSTA-LIMA, B. R. C.; ALVARES, T. S.; CONTE-JUNIOR, C. A. *In vitro* digestibility of commercial whey protein supplements. **LWT - Food Science and Technology**, v. 61, p. 7-11, 2015.
- ALVES, M. P.; MOREIRA, R. O.; RODRIGUES JÚNIOR, P. H.; MARTINS, M. C. F.; PERRONE, Í. T.; CARVALHO, A. F. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 69, n. 3, p. 212-226, mai/jun, 2014.
- AMERSHAM BIOSCIENCES, **Protein Purification Handbook**, ed.. v. 18-1132-29, 2001.
- ASGARI, S.; JAHANSHAHI, M.; RAHIMPOUR, A. Cost-effective nanoporous Agar–Agar polymer/Nickel powder composite particle for effective bio-products adsorption by expanded bed chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1361, p. 191-202, 2014.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis**. 16 ed. Arlington: AOAC, 1995, v. 1.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJO. **ABIQ conclui estimativa sobre o crescimento do mercado brasileiro de queijos em 2014, por tipo de produtos**. São Paulo, 2015.
- AVELINO, S. **Recuperação de proteínas por precipitação e flotação: polieletrólitos e éteres de celulose como precipitantes**. 1997. 150 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- BABCOCK, J. J.; BRANCALEON, L. Bovine serum albumin oligomers in the E- and B-forms at low protein concentration and ionic strength. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 53, p. 42 – 53, 2013.
- BAKI, E.; NALAN, O. Human serum albumin (HSA) adsorption with chitosan microspheres, **Journal of Applied Polymer Science**, v. 86, p. 3035 - 3039, 2002.
- BALASUNDARAM, B.; CHHATRE, S.; ARORA, D.; TITCHENER-HOOKER, N. J.; BRACEWELL, D. G. Study of the conditions for multi-modal chromatographic capture of Fab' from dual-salt precipitated *E. coli* homogenate. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 88, p. 372-377, 2013.
- BALDASSO, C.; BARROS, T. C.; TESSARO, I. C. Concentration and purification of whey

proteins by ultrafiltration. **Desalination**, v. 278, p. 381 – 386, 2011.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 1 ed., Campinas – SP: Editora da UNICAMP, 2001, 412 f.

BERNARDI, S.; GÉTAZ, D.; FORRER, N.; MORBIDELLI, M. Modeling of mixed-mode chromatography of peptides. **Journal of Chromatography A**, v. 1283, p. 46 - 52, 2013.

BEZERRA, T. S. **Caracterização física, química e morfológica de polpa de marolo liofilizada**. 2014. 141 f. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos), Universidade Federal de Lavras, Lavras.

BEZOLD, F.; GOLL, J.; MINCEVA, M. Study of the applicability of non-conventional aqueous two-phase systems in counter-current and centrifugal partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1388, p. 126 - 132, 2015.

BHAMBURE, R.; GUPTA, D.; RATHORE, A. S. A novel multimodal chromatography based single step purification process for efficient manufacturing of an *E. coli* based biotherapeutic protein product. **Journal of Chromatography A**, v. 1314, p. 188 - 198, 2013.

BOHÓRQUEZ, M. A. M. **Avaliação do etanol como agente precipitante de glicosil hidrolases produzidas por *Trichoderma harzianum* P49P11**. 2014. 71 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

BOX, G. E. P.; WILSON, K. B. On the experimental attainment of optimum conditions. **Journal of the Royal Statistical Society**, v. 13, p. 1 – 45, 1951.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemical**, v. 72, p. 248 – 254, 1976.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os métodos analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 14 dez. 2006. Seção 1, p. 8.

BUND, T.; ALLELEIN, S.; ARUNKUMAR, A.; LUCEY, J. A.; ETZEL, M. R. Chromatographic purification and characterization of whey protein–dextran glycation products. **Journal of Chromatography A**, v. 1244, p. 98 – 105, 2012.

BURNOUF, T. Plasma fractionation in the world: current status. **Transfusion Clinique et Biologique**, v. 14, n. 1, p. 41 - 50, 2007.

BURNOUF, T.; RADOSEVICH, M. Affinity chromatography in the industrial purification of plasma proteins for therapeutic use. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 49, n. 1 – 3, p. 575 - 586, 2001.

CARDOSO, G. S. P. **Avaliação físico-química e microbiológica do leite cru refrigerado e soros dos queijos minas frescal e mussarelas estocados sob diferentes temperatura**. 2014.

125 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

CARVALHO, R. A. **Diagramas de Fase de Sistemas Aquosos Bifásicos Compostos por PEO 400 + Sais Inorgânicos + Água e Estudo da Extração de Ácido Monometilarsônico (MMA) Utilizando Sistema Aquoso Bifásico**. 2017. 66 f. Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.

CASTRO, M. D. L.; CAPOTE, F. P.; ÁVILA, N. S. Is dialysis alive as a membrane-based separation technique?. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, p. 315 - 326, 2008.

CAVALCANTI, J. S. **Recuperação e purificação de proteínas do soro de queijo “tipo coalho” usando cromatografia de troca iônica e interação hidrofóbica em leite na forma expandida**. 2010. 129 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Vento de Tecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

CHEISON, S. C.; BOR, E. K.; FARAJ, A. K.; KULOZIK, U. Selective hydrolysis of α -lactalbumin by Acid Protease A offers potential for β -lactoglobulin purification in whey proteins. **LWT - Food Science and Technology**, v. 49, p. 117 - 122, 2012.

CHEISON, S. C.; LEEB, E.; TORO-SIERRA, J.; KULOZIK, U. Influence of hydrolysis temperature and pH on the selective hydrolysis of whey proteins by trypsin and potential recovery of native alpha-lactalbumin. **International Dairy Journal**, v. 21, p. 166 – 171, 2011.

CHOI, Y.; PARK, Y.; YOON, S.; LEE, H. Purification and characterization of a new inducible thermostable extracellular lipolytic enzyme from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* P1. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 124, p. 11 – 19, 2016.

CHU, W.; W. Q.; Y. S.; L. D. High-throughput screening and optimization of mixed-mode resins for human serum albumin separation with microtiter filter plate. **Biochemical Engineering Journal**, v. 131, p.47 – 57, 2018.

CHUNG, W. K.; HOU, Y.; HOLSTEIN, M. FREED, A.; MAKHATADZE, G. I.; CRAME, S. M. Investigation of protein binding affinity in multimodal chromatographic systems using a homologous protein library. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 191 – 198, 2010.

COHN, E. J.; STRONG, L. E.; HUGHES JÚNIOR., W. L.; MULFORD, D. J.; ASHWORTH, J. N.; MELIM, M.; TAYLOR, H. L. Preparation and properties of serum and plasma protein. IV. A system for the separation into fractions of protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. **Journal of American Chemical Society**, v. 8, p. 459 – 475, 1946.

CORRÊA, N. G. **Efeito da velocidade de congelamento sobre a liofilização, reidratação e atributos de qualidade de fatias de maçã**. 2013. 107 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e ciência de Alimentos), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto.

COSTA, A. R.; COIMBRA, J. S. R.; FERREIRA, L. A.; MARCOS, J. C.; SANTOS, I. J. B.;

SALDAÑA, M. D. A.; TEIXEIRA, J. A. C. Partitioning of bovine lactoferrin in aqueous two-phase system containing poly (ethylene glycol) and sodium citrate. **Food and Bioproducts Processing**, v. 95, p. 118 - 124, 2015.

COSTA, H. B. **Desenvolvimento de processo para a purificação de bromelina a partir de resíduos de abacaxizeiro (*Ananas comosus* var. *comosus*) cv. Vitória**. 2014. 150 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo.

CURBELO, F. D. S. **Estudo da remoção de óleo em águas produzidas na indústria de petróleo, por adsorção em coluna utilizando a vermiculita expandida e hidrofobizada**. 2002. 88 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

DELLOITTE. 2017 global life sciences Outlook. 2017.

DONG, Y.; PANG, B.; YU, F.; LI, L.; LIU, W.; XIU Z. Extraction and purification of IgG by hydrophilic organic solvent salting-out extraction. **Journal of Chromatography B**, v. 1012 – 1013, p. 137 – 143, 2016.

DORAN, P. M. **Bioprocess Engineering Principles**. 2 ed. Waltham: Elsevier, 2012. 919 p.

DU, Q. Y.; LIN, D. Q.; ZHANG, Q. L.; YAO, S. J. An integrated expanded bed adsorption process for lactoferrin and immunoglobulin G purification from crude sweet whey. **Journal of Chromatography B**, v. 947 – 948, p. 201-207, 2014.

ELPÍDIO, C. M. A.; **Síntese e caracterização de adsorvente pelicular para Adsorção em Leito Expandido (ALE)**. 2016. 92 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade federal do Rio Grande do Norte, Natal.

FERNANDES, S. S.; GAUTÉRIO, G. V.; MOLON, F. O.; FIGUEIRA, F. S.; BUFFON, J. G.; KALIL, S. J. **Adsorção da enzima peroxidase de farelo de arroz em resinas de troca iônica**. In: X ENCONTRO BRASILEIRO DE ADSORÇÃO, 2014, Guarujá. Pôster. Disponível em: <<http://www2.unifesp.br>>. Acesso em: 07 fev. 2019.

FERREIRA, B. B. A. **Avaliação das resinas de troca iônica (Amberlite Ira 67 e Ira 96) para adsorção de ácido láctico obtido a partir do glicerol em coluna de leito fixo**. 2017. 75 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará.

FOGAÇA, G. N. **Utilização de eletroforese microfluídica na detecção da adição de soro de queijo em leite cru, pasteurizado, UHT e em pó**. 2017. 71 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência do Leite e Derivados), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.

FONTAN, R. C. I. **Termodinâmica e modelagem da adsorção em sistemas mono e multicomponentes compostos por α -Lactoalbumina e β -Lactoglobulina**. 2005. 90 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. **Dossiê proteínas**. n. 22, 2012

GABRIELCZYK, J.; JÖRDENING, H. J. Ion exchange resins as additives for efficient protein refolding by dialysis. **Protein Expression and Purification**, v. 133, p. 35 – 40, 2017.

GALANAKIS, C. M.; CHASIOTIS, S.; BOTSARIS, G.; GEKAS, V. Separation and recovery of proteins and sugars from Halloumi cheese whey. **Food Research International**, v. 65, p. 477 - 483, 2014.

GANJU, S.; GOGATE, P. R. A review on approaches for efficient recovery of whey proteins from dairy industry effluents. **Journal of Food Engineering**, v. 215, p. 84 – 96, 2017.

GAO, D.; TIAN, Y.; LIANG, F.; JIN, D.; CHEN, Y.; ZHANG, H.; YU, A. Investigation on the pH-dependent binding of Eosin Y and bovine serum albumin by spectral methods. **Journal of Luminescence**, v. 127, p. 515 – 522, 2007.

GAO, D.; WANG, L. L.; LIN, D. Q.; YAO, S. J. Evaluating antibody monomer separation from associated aggregates using mixed-mode chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1294, p. 70 - 75, 2013.

GAŠPERŠIČ, J.; PODGORNIK, A.; KRAMBERGER, P.; JARC, M.; JANČAR, J.; ŽORŽ, M.; KRAJNC, N. L. Separation of pegylated recombinant proteins and isoforms on CIM ion exchangers. **Journal of Chromatography B**, v. 1033 – 1034, p. 91 – 96, 2016.

GE HEALTHCARE BIO-SCIENCES AB. **Multimodal Chromatography Handbook**, 2013.

GE HEALTHCARE BIO-SCIENCES AB. **Streamline Handbook**, 2006.

GENG, X. L.; TOLKACH, A.; OTTE, J.; IPSEN, R. Pilot-scale purification of α -lactalbumin from enriched whey protein concentrate by anion-exchange chromatography and ultrafiltration. **Dairy Science & Technology**, v. 95, p. 353 - 368, 2015.

GÓES FILHO, L. S. **Caracterização e estudos cinéticos de albumina tratada com espécies reativas derivadas de óxidos de nitrogênio: espectroscopia de absorvância e fluorescência**. 2005. 84 f. Dissertação (Mestrado em Física). Centro Técnico Científico, Pontifícia Universidade Católica, Rio de Janeiro.

GONDIM, D. R. **Quitosa/Alginato epoxilado com corantes imobilizados como potencial fase estacionária para purificação de IgG do soro humano**. 2012. 100 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

GONDIM, D. R. **Seleção de materiais com potencial aplicação na purificação de IgG humana**. 2017. 164 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

GOSPODAREK, A. M.; HISER, D. E.; O'CONNELL, J. P.; FERNANDEZ, E. J. Unfolding of a model protein on ion exchange and mixed mode chromatography surfaces. **Journal of Chromatography A**, v. 1355, p. 238 - 252, 2014.

GROSSMANN, L.; EBERT, S.; HINRICHS, J.; WEISS, J. Effect of precipitation,

lyophilization, and organic solvent extraction on preparation of protein-rich powders from the microalgae *Chlorella protothecoides*. **Algal Research**, v. 29, p. 266 – 276, 2018.

GUIZADO, T. R. C. **Estudos computacionais da interação de porfirinas e seus complexos de ferro com albumina sérica humana**. 2008. 138 f. Dissertação (Mestrado em Física). Centro Técnico Científico, Pontifícia Universidade Católica, Rio de Janeiro.

HABERT, A. C.; BORGES, C. P.; NOBREGA, R. **Processos de Separação por membranas**. 1 ed., Rio de Janeiro: E-pappers. 2006. 180 p.

HANKE, A. T.; OTTENS, M. Purifying biopharmaceuticals: knowledge-based chromatographic process development. **Trends in Biotechnology**, v. 32, n. 4, p. 210 - 220, 2014.

HARRISON, R. G.; TODD, P. W.; RUDGE, S. R.; PETRIDES, D. P. **Bioseparations science and engineering**. 2 ed. Nova Iorque: Oxford University Press. 2003. 406 p.

HIRANO, A.; ARAKAWA, T.; KAMEDA, T. Effects of arginine on multimodal anionexchange chromatography, **Protein Expression and Purification**, v. 116, p. 105 – 112, 2015.

HIRANO, A.; ARAKAWA, T.; KAMEDA, T. Interaction of arginine with Capto MMC in multimodal chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1338, p. 58 - 66, 2014.

HO, Y. S. Selection of optimum sorption isotherm, **Carbon**. v. 42, p. 2115 – 2116, 2004.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Indicadores IBGE: Contas Nacionais Trimestrais - Indicadores de Volume e Valores Correntes**. Abr.-Jun. 2018.

IKEGUCHI, M. Transient Non-Native Helix Formation during the Folding of β -Lactoglobulin. **Biomolecules**, v. 4, p. 202 - 216, 2014.

JACK, L. J.; MATHER, I. H. Cloning and analysis of cDNA encoding bovine butyrophilin, an apical glycoprotein expressed in mammary tissue and secreted in association with the milk-fat globule membrane during lactation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p. 14481 – 14486, 1990.

JOHANSSON, B. L., BELEW, M., ERIKSSON, S., GLAD, G. LIND, O; MALOISEL, J. L.; NORRMAN, N. Preparation and characterization of prototypes for multi-modal separation aimed for capture of positively charged biomolecules at high-salt conditions. **Journal of Chromatography A**, v. 1016, p. 35 – 49, 2003.

JØHNKE, M.; PETERSEN, T. E. **The Alpha-Lactalbumin/Oleic Acid Complex and Its Cytotoxic Activity**. In: HURLEY, W. L. (Ed.). *Milk Protein*. Rijeka: In Tech Open, 2012 p. 119-144.

JOUCLA, G.; SÉNÉCHAL, C. L.; BÉGORRE, M.; GARBAY, B.; SANTARELLI, X.; CABANNE, C. Cation exchange versus multimodal cation exchange resins for antibody capture from CHO supernatants: Identification of contaminating Host Cell Proteins by mass

spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 942 – 943, p. 126 - 133, 2013.

JOZALA, A. F.; NOVAES, L. C. L.; MAZZOLA, P. G.; NASCIMENTO, L. O.; PENNA, T. C. V.; TEIXEIRA, J. A.; PASSARINHA, L. A.; QUEIROZ, J. A.; PESSOA JÚNIOR, A. Low-cost purification of nisin from milk whey to a highly active product. **Food and Bioproducts Processing**, v. 93, p. 115 – 121, 2015.

KALAIVANI, S.; REGUPATHI, I. Synergistic extraction of α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin from acid whey using aqueous biphasic system: Process evaluation and optimization. **Separation and Purification Technology**, v. 146, p. 301 - 310, 2015.

KALEAS, K. A.; SCHMELZER, C. H.; PIZARRO, S. A. Industrial case study: Evaluation of a mixed-mode resin for selective capture of a human growth factor recombinantly expressed in *E. coli*. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p.235 - 242, 2010.

KUMAR, V.; RATHORE, A. S. Two-stage chromatographic separation of aggregates for monoclonal antibody therapeutics. **Journal of Chromatography A**, v. 1368, p. 155 – 162, 2014.

LADISCH, M. R. **Bioseparations Engineering: Principles, Practice, and Economics**. Nova Iorque: John Wiley & Sons. 2001. 735 p.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680 - 685, 1970.

LAM, R. S. H.; NICKERSON, M. T. The effect of pH and temperature pre-treatments on the structure, surface characteristics and emulsifying properties of alpha-lactalbumin. **Food Chemistry**, v. 173, p. 163 - 170, 2015.

LANGMUIR, I. The dissociation of hydrogen into atoms. III. The mechanism of the reaction. **Journal of the American Chemical Society**, v. 38, n. 6, p. 1145 - 1156, jun. 1916.

LEEB, E.; GÖTZ, A.; LETZEL, T.; CHEISON, S. C.; KULOZIK, U. Influence of denaturation and aggregation of β -lactoglobulin on its tryptic hydrolysis and the release of functional peptides. **Food Chemistry**, v. 187, p. 545 - 554, 2015.

LI, R.; WU, Z.; WANG, Y.; DING, L.; WANG, Y. Role of pH-induced structural change in protein aggregation in foam fractionation of bovine serum albumin. **Biotechnology Reports**, v. 9, p. 46 – 52, 2016.

LIMA, L. H. F. **Precipitação de Lisozima e insulinas bovina e suína por “salting out” com o uso de eletrólitos voláteis**. 2006. 87 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

LIMA, M. R.; SILVA, V. P. A.; FURTADO, R. F.; ALVES, C. R.; GUEDES, M. I. F.; DUTRA, R. A. F. **Purificação de ricina a partir de saturação com sulfato de amônio**. In: III CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA: ENERGIA E RICINOQUÍMICA. 2008. Salvador. Disponível em: <<http://www.cnpa.embrapa.br>>. Acesso em: 07 fev 2019.

LIMA, M. A. **Recuperação e purificação de β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis***

utilizando cromatografia de modo misto. 2014. 115 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Centro de tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

LIMA, M. A.; FREITAS, M. F. M.; GONÇALVES, L. R. B.; SILVA JUNIOR, I. J. Recovery and purification of a *Kluyvermyces lactis* β -galactosidase by Mixed Mode Chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 1015 – 1016, p. 181 – 191, 2016.

LIU, B.; YANG, Y.; REN, Q. Parallel pore and surface diffusion of levulinic acid in basic polymeric adsorbents. **Journal of Chromatography A**, v. 1132, n. 1, p. 190 - 200, 2006.

LIU, N.; WANG, Z.; LIU, X. M.; YU, L.; SUN, Y. Characterization of novel mixed-mode protein adsorbents fabricated from benzoyl-modified polyethyleneimine-grafted Sepharose. **Journal of Chromatography A**, v. 1372, p. 157 - 165, 2014.

LIU, P.; YANG, H.; GENG, X. Mixed retention mechanism of proteins in weak anion-exchange chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 7497 – 7504, 2009.

LOCH, J. I.; BONAREK, P.; POLIT, A.; ŚWIĄTEK, S.; CZUB, M.; LUDWIKOWSKA, M.; LEWIŃSKI, K. Conformational variability of goat β -lactoglobulin: Crystallographic and thermodynamic studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 1283 - 1291, 2015.

MAGALHÃES, E. R. B. **Avaliação de floculante natural à base de Moringa oleifera no tratamento de água produzida na indústria do petróleo: aplicação da técnica combinada floculação/flotação.** 2014. 83 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade federal do Rio Grande do Norte, Natal.

MAHN, A.; ISMAIL, M. Depletion of highly abundant proteins in blood plasma by ammonium sulfate precipitation for 2D-PAGE analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 3645 – 3648, 2011.

MANOEL, E. A.; SANTOS, J. C. S.; FREIRE, D. M. G.; RUEDA, N.; LAFUENTE, R. F. Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the openform of the enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 71, p. 53 – 57, 2015.

MAO, X.; ZHANG, G. F.; LI, C.; ZHAO, Y. C.; LIU, Y.; WANG, T. T.; DUAN, C. Y.; WANG, J. Y.; LIU, L. B. One-step Method for the Isolation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin from Cow's Milk While Preserving their Antigenicity. **International Journal of Food Properties**, v. 20, p. 792 – 800, 2017.

MARIAM, S. H. S.; OOI, C. W.; TAN, W. S.; JANNA, O. A.; ARBAKARIYA, A.; TEY, B. T. Purification of rabbit polyclonal immunoglobulin G with ammonium sulphate precipitation and mixed-mode chromatography. **Separation and Purification Technology**, v. 144, p. 133 – 138, 2015.

MATAK, K. E.; TAHERGORABI, R.; JACZYNSKI, J. A review: Protein isolates recovered by isoelectric solubilization/precipitation processing from muscle food by-products as a component of nutraceutical foods. **Food Research International**, v. 77, p. 697 – 703, 2015.

MATOS, T.; QUEIROZ, J. A.; BÜLOW, L. Plasmid DNA purification using a multimodal chromatography resin. **Journal Molecular Recognition**, v. 27, p. 184 - 189, 2014.

MCCORMICK, D. K. Expanded Bed Adsorption. The first new unit process operation in decades. **Bio/Technology**, v. 11, p. 1059, 1993.

MCSWEENEY, S.; MULVIHILL, D. M.; O'CALLAGHAN, D. M. The influence of pH on the heat-induced aggregation of model milk protein systems and model infant formula emulsions stabilized by milk protein ingredients. **Food Hydrocolloids**, v. 18, p.109 – 125, 2004.

MENDONÇA, L. A. **Desempenho do delineamento composto central em experimentos com alto coeficiente de variação**. 2012. 68 f. Dissertação (Mestrado em Estatística), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

MICHNIK, A.; MICHALIK, K.; DRZAZGA, Z. Stability of bovine serum albumin at different pH. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 80, p. 399 – 406, 2005.

MOHAMMED, S. A.; EISSA, M. S.; AHMED, H. M. Simple protein precipitation extraction technique followed by validated chromatographic method for linezolid analysis in real human plasma samples to study its pharmacokinetics. **Journal of Chromatography B**, v. 1043, p. 235 – 240, 2017.

MORAES, C. C.; SALA, L.; ORES, J. C.; BRAGA, A. R. C.; COSTA, J. A. V.; KALIL, S. J. Expanded and Fixed Bed Ion Exchange Chromatography for the Recovery of C-Phycocyanin in a Single Step by Using Lysed Cells. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 93, p. 111 - 115, 2015.

MORRISSEY, J. H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. **Analytical Biochemistry**, v. 117, p. 307 – 310, 1981.

MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F. Enzimas: Poderosa ferramenta na industria. **Ciência hoje**, v. 41, p. 28 – 33. 2007.

NASCIMENTO, R. F.; LIMA, A. C. A.; VIDAL, C. B.; MELO, D. Q.; RAULINO, G. S. R. **Adsorção: aspectos teóricos e aplicações ambientais**. 1 ed., Fortaleza: Imprensa Universitária. 2014. 256 p.

NOGUEIRA, K. A. B. **Estudo da adsorção de biomoléculas (Albumina de Soro Bovino e Lisozima) em materiais mesoporosos**. 2016.65 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

OLIVEIRA, M. N. **Tecnologia de produtos lácteos funcionais**. 1 ed., São Paulo: Atheneu. 2009. 384 p.

OLIVEIRA, D. F.; BRAVO, C. E. C.; TONIAL, I B. SORO DE LEITE: UM SUBPRODUTO VALIOSO. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Mar/Abr, nº 385, 67: 64-71, 2012.

OLIVEIRA, G. C. **Plasma humano: componentes e derivados. Conservação e utilização**

terapêutica em ambiente hospitalar. 2016. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Almada.

ORTIZ, A. **O uso de medidas de extensão e intensidade no intercâmbio de informações na cadeia de suprimentos do setor farmacêutico brasileiro.** 2003. 115 f. Dissertação (Mestrado em Logística), Universidade católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

OUTINEN, M.; RANTAMÄKI, P.; HEINO, A. Effect of Milk Pretreatment on the Whey Composition and Whey Powder Functionality. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 1, 2010.

PADLAN, E. A. Anatomy of the Antibody Molecule. **Molecular Immunology**, v. 31, p. 169 – 217, 1994.

PAUL, J.; JENSEN, S.; DUKART, A.; Cornelissen, G. Optimization of a preparative multimodal ion exchange step for purification of a potential malaria vaccine. **Journal of Chromatography A**, v. 1366, p. 38-44, 2014.

PAULA, R. R. **Estudo da cinética e influência dos métodos de secagem sobre as propriedades físico-químicas de soro do leite.** 2015. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre.

PELEGRINE, D. H. G.; CARRASQUEIRA, R. L. Aproveitamento do soro do leite no enriquecimento nutricional de bebidas, **Brazilian Journal of Food Technology**, p. 145 – 151, 2008.

PERÁZIO, B. A. A. **Efeitos dos pontos axiais e centrais sobre a eficiência do delineamento composto central.** 2012. 57 f. Dissertação (Mestrado em Estatística), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

PESSOA JÚNIOR, A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de Produtos Biotecnológicos.** 1 ed., Barueri-SP: Editora Manole, 2005, 444 p.

PEZZINI, J.; CABANNE, C.; GANTIER, R.; JANAKIRAMAN, V. N.; SANTARELLI, X. A comprehensive evaluation of mixed mode interactions of HEA and PPA HyperCel™ chromatographic media. **Journal of Chromatography B**, v. 976–977, p. 68 - 77, 2015.

PHARMACIA LKB BIOTECHNOLOGY GUIDE, Junho de 1993.

PRINGELS, L.; BROECKX, V.; BOONEN, K.; LANDUYT, B.; SCHOOF, L. Abundant plasma protein depletion using ammonium sulfate precipitation and Protein A affinity chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 1089, p. 43 – 59, 2018.

PUHL, A. C. **Obtenção de um biocatalisador da protease TEV para a remoção de caudas de histidinas de proteínas recombinantes.** 2008. 81 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

PURWANTO, M. G. M. The Role and Efficiency of Ammonium Sulphate Precipitation in Purification Process of Papain Crude Extract. **Procedia Chemistry**, v. 18, p. 127 – 131, 2016.

REVISTA ADITIVOS & INGREDIENTES. **Propriedades nutricionais das proteínas do soro do leite**. N. 107, p. 28 - 39, abril de 2013.

REZAEI, H.; ASHTIANI, F. Z.; FOULADITAJAR, A. Effects of operating parameters on fouling mechanism and membrane flux in cross-flow microfiltration of whey. **Desalination**, v. 274, p. 262 - 271, 2011.

RIBEIRO, P. F. F. A. C. **Processo de Liofilização de Produtos Alimentares Perecíveis**. 2012. 117 f. Dissertação (mestrado em Engenharia Mecânica). Departamento de Engenharia Mecânica, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, Lisboa.

ROSA, J. B. **Modelagem computacional da coluna cromatográfica de troca iônica para aplicação em processos de purificação de proteínas**. 2015. 277 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

SALERMO, M. S.; MATSUMOTO, C.; FERRAZ, I. Biofármacos no Brasil: características, importância e delineamento de políticas públicas para seu desenvolvimento. **Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada**. 2018.

SANG, L. C.; VINU, A.; COPPENS, M. O. General description of the adsorption of proteins at their iso-electric point in nanoporous materials. **Langmuir**, v. 27, n. 22, p. 13828 - 13837, 2011.

SANTOS, M. J.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Fractionation and recovery of whey proteins by hydrophobic interaction chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 475 - 479, 2011.

SANTOS, J. H. P. M.; SILVA, F. A.; COUTINHO, J. A. P.; VENTURA, S. P. M.; PESSOA JR, A. Ionic liquids as a novel class of electrolytes in polymeric aqueous biphasic systems. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 661 - 668, 2015.

SANTOS NETO, A. J. Problemas com o Formato dos Picos em Cromatografia Líquida – Parte 4. **Scientia Chromatographica**, v. 2, p. 61 - 67, 2010.

SAUFI, S. M.; FEE, C. J. Mixed matrix membrane chromatography based on hydrophobic interaction for whey protein fractionation. **Journal of Membrane Science**, v. 444, p. 157 - 163, 2013.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial – Vol 2**. 1 ed., São Paulo: Ed. Edgard Blücher Ltda, 2001. 541 p.

SCHVEITZER, B. **Interação da Albumina do Soro Bovino (BSA) com sais biliares induzidas por Surfactantes Aniônicos**. 2006. 99 f. Tese (Doutorado em Química). Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SHA, X.; TU, Z.; LIU, W.; WANG, H.; SHI, Y.; HUANG, T.; MAN, Z. Effect of ammonium sulfate fractional precipitation on gel strength and characteristics of gelatin from bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) scale. **Food Hydrocolloids**, v. 36, p.173 - 180, 2014.

SHEN, A.; LI, X.; DONG, X.; WEI, J.; GUO, Z.; LIANG, X. Glutathione-based zwitterionic

stationary phase for hydrophilic interaction/cation-exchange mixed-mode chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1314, p. 63 - 69, 2013.

SHI, L.; BEAMER, S. K.; YANG, H.; JACZYNSKI, J. Micro-emulsification/encapsulation of krill oil by complex coacervation with krill protein isolated using isoelectric solubilization/precipitation. **Food Chemistry**, v. 244, p.284 – 291, 2018.

SHI, L.; BEAMER, S. K.; YIN, T.; MATAK, K. E.; YANG, H. JACZYNSKI, J. Mass balance for isoelectric solubilization/precipitation of carp, chicken, menhaden, and krill. **LWT - Food Science and Technology**, v. 81, p. 26 – 34, 2017.

SILVA, C.; Ribeiro, A.; Ferreira, D.; Veiga, F. Administração oral de peptídios e proteínas: I. Estratégias gerais para aumento da biodisponibilidade oral. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 2, abr./jun., 2002.

SOUSA JUNIOR, F. C.; VAZ, M. R. F.; PADILHA, C. E. A.; CHIBÉRIO, A. S.; MARTINS, D. R. A.; MACEDO, G. R.; SANTOS, E. S. Recovery and purification of recombinant 503 antigen of *Leishmania infantum chagasi* using expanded bed adsorption chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 986 – 987, p. 1-7, 2015.

SOUSA, P. L. R. **Avaliação da biodegradação do dibenzotiofeno utilizando lodos ativados**. 2015. 74 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

TAHA, M.; QUENTAL, M. V.; CORREIA, I.; FREIRE, M. G.; COUTINHO, J. A. P. Extraction and stability of bovine serum albumin (BSA) using cholinium-based Good's buffers ionic liquids. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 1158 - 1166, 2015.

TAN, Y. H.; LIU, M.; NOLTING, B.; GO, J. G.; GERVAY-HAGUE, J.; LIU, G.-Y. A Nanoengineering Approach for Investigation and Regulation of Protein Immobilization. **ACS Nano**, v. 2, n. 11, p. 2374 - 2384, 2008.

TANG, W.; ZHANG, H.; WANG, L.; QIAN, H.; QI, X. Targeted separation of antibacterial peptide from protein hydrolysate of anchovy cooking wastewater by equilibrium dialysis. **Food Chemistry**, v. 168, p. 115 – 123, 2015.

TATTINI JÚNIOR, V. **Efeito da liofilização sobre a estrutura e mudanças de fase da albumina bovina modificada por reação com metoxi – polietilenoglicol**. 2004. 67 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica). Universidade de São Paulo, Araraquara.

TEIXEIRA, A. **A Indústria Farmacêutica no Brasil: um estudo do impacto socioeconômico dos medicamentos genéricos**. 2014. 84 f. Monografia (Curso de Ciências Econômicas), Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

TORRES, M. A. **Produção e caracterização de microesferas de quitosana natural e modificada quimicamente e o seu uso na adsorção das proteínas BSA e lisozima**. 2006. 123 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

TSAKALI, E.; PETROTOS, K.; D'ALLESSANDRO, A.; GOULAS, P. **A review on whey composition and the methods used for its utilization for food and pharmaceutical products**. 6TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON SIMULATION AND MODELLING IN THE FOOD AND BIO-INDUSTRY FOODSIM., CIMO Research Centre, Braganca, Portugal 2010.

VENTUROSU, R. C.; ALMEIDA, K. E.; RODRIGUES, A. M.; DAMIN, M. R.; OLIVEIRA, M. N. Determinação da composição físico-química de produtos lácteos: estudo exploratório de comparação dos resultados obtidos por metodologia oficial e por ultra-som, **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 4, p. 607 – 613, 2007.

VIEIRA, R. **Remoção e recuperação de íons Hg(II) utilizando quitosana natural e reticulada**. 2004. 125 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

WANG, Y.; HU, X.; HAN, J.; NI, L.; TANG, X.; HU, Y.; CHEN, T. Integrated method of thermosensitive triblock copolymer–salt aqueous two phase extraction and dialysis membrane separation for purification of lycium barbarum polysaccharide. **Food Chemistry**, v. 194, p. 257 – 264, 2016.

WOLFE, L. S.; BARRINGER, C. P.; MOSTAFA, S. S.; SHUKLA, A. A. Multimodal chromatography: Characterization of protein binding and selectivity enhancement through mobile phase modulators. **Journal of Chromatography A**, v. 1340, p.151 - 156, 2014.

WONGCHUPHAN, R.; TEY, B. T.; TAN, W. S.; TAIP, F. S.; KAMAL, S. M. M.; LING, T. C. Application of dye-ligands affinity adsorbent in capturing of rabbit immunoglobulin G. **Biochemical Engineering Journal**, v. 45, n. 3, p. 232 - 238, 2009.

YAN, J.; ZHANG, Q.; LIN, D.; YAO, S. Coadsorption of Human Immunoglobulin G and Bovine Serum Albumin on a *p*-Aminohippuric Acid Based Mixed-Mode Resin. **Journal Chemical & Engineering Data**, v. 61, p. 151 – 159, 2016.

YANG, Y. F.; ZHANG, L. Z.; DU, X. P.; ZHANG, S. F.; LI, L. J.; JIANG, Z. D.; WU, L. M.; NI, H.; CHEN, F. Recovery and purification of limonin from pummelo [*Citrus grandis*] peel using water extraction, ammonium sulfate precipitation and resin adsorption. **Journal of Chromatography B**, v. 1060, p. 150 – 157, 2017.

YE, W.; LIN, X.; ZHANG, Y.; XU, Y.; SUN, R.; WEN, C.; WANG, X.; BAO, S.; CHEN, R. Quantification and pharmacokinetics of alpinetin in rat plasma by UHPLC–MS/MS using protein precipitation coupled with dilution approach to eliminate matrix effects. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 152, p. 242 – 247, 2018.

YU, L.; ZHANG, L.; SUN, Y. Protein behavior at surfaces: Orientation, conformational transitions and transport. **Journal of Chromatography A**, v. 1382, p. 118 - 134, 2015.

ZAMORA, P. P.; MORAIS, J. L.; NAGATA, N. Por que otimização multivariada?. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 10, n. 2, p. 106 – 110, 2005.

ZHANG, C.; FREDERICKS, D.; CAMPI, E. M.; FLORIO, P.; JESPERGAARD, C.; SCHIØDT, C. B.; HEARN, M. T. W. Purification of monoclonal antibodies by chemical

affinity mixed mode chromatography. **Separation and Purification Technology**, v. 142, p. 332 - 339, 2015.

ZHANG, J.; LIU, X.; SUBIRADE, M.; ZHOU, P.; LIANG, L. A study of multi-ligand beta-lactoglobulin complex formation. **Food Chemistry**, v. 165, p. 256 - 261, 2014.

ZHAO, J.; YAO, S.; LIN, D. Adsorbents for Expanded Bed Adsorption: Preparation and Functionalization. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 17, n. 4, p. 678 – 687, 2009.

ZHAO, L.; CAI, X.; HUANG, S.; WANG, S.; HUANG, Y.; HONG, J.; RAO, P. Isolation and identification of a whey protein-sourced calcium-binding tripeptide Tyr-Asp-Thr. **International Dairy Journal**, v. 40, p. 16 - 23, 2015.

ZHAO, L.; HUANG, S.; CAI, X.; HONG, J. WANG, S. A specific peptide with calcium chelating capacity isolated from whey protein hydrolysate. **Journal of Functional Foods**, v. 10, p. 46 – 53, 2014.

ZHAO, Z. P.; WANG, Z.; WANG, S.C. Formation charged characteristic and BSA adsorption behavior of carboxymethyl chitosan/PES composite MF membrane, **Journal of Membrane Science**, v. 217, p. 151 - 158, 2003.

ZITTLE, C. A.; THOMPSON, M. P.; CUSTER, J. H.; CERBULIS, J. κ -casein- β -lactoglobulin interaction in solution when heated. **Journal Dairy Science**, v. 45, p. 807 – 10, 1962.

ZUÑIGA, A. D. G. **Estratégia de purificação das proteínas α -lactoalbumina e β -lactoglobulina do soro do queijo**. 2003. 168 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.