



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO DA LACTOFERRINA DO SORO DE
QUEIJO

Ariane Karla Alves Verdan

Orientadora: Bruna Mara Aparecida de
Carvalho

OURO BRANCO

Dezembro – 2014



MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO DA LACTOFERRINA DO SORO DE QUEIJO

Ariane Karla Alves Verdan

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado em cumprimento às
exigências do Curso de Bacharelado em
Engenharia de Bioprocessos da
Universidade Federal de São João del Rei.

Orientadora: Bruna Mara Aparecida de
Carvalho

OURO BRANCO

Dezembro - 2014

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS**

**MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO DA LACTOFERRINA DO SORO DE
QUEIJO**

Ariane Karla Alves Verdan

A Banca Examinadora, composta pelos membros abaixo, avaliou este TCC:

Bruna Mara Aparecida de Carvalho – Orientadora

Ênio Nazaré de Oliveira Junior – examinador 1

Sandra de Cássia Dias – examinador 2

Ouro Branco, ____/____/____

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder força e coragem, iluminando minhas decisões e guiando todo o meu caminho.

A Professora Bruna Mara Aparecida de Carvalho, pela orientação, dedicação, paciência e amizade. Por seus ensinamentos e pela confiança depositada.

Aos meus pais, Maria Helena e Flávio, que sempre me deram forças pra seguir em frente e que não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida. Obrigada por seu cuidado e dedicação.

Ao meu noivo Wallace, pelo amor, companheirismo e paciência, pelo incentivo e pelo apoio constantes.

As minhas amigas Mariana, Tatiana e Thayane, que estiveram presentes durante toda a graduação. Obrigada por todos os momentos, de alegrias e de angústias. Vencemos juntas essa etapa!

A todos os professores do curso de Engenharia de Bioprocessos, que foram tão importantes na minha vida acadêmica, especialmente Sandra de Cássia Dias e Ênio Nazaré de Oliveira Júnior, que fazem parte desta banca.

Lista de Figuras

Figura 1 - Fluxograma da produção de queijo.	6
Figura 2 - Estrutura da lactoferrina, indicando os quatro domínios de polipeptídeo. Fonte: Montoya <i>et al</i> , 2011.	11
Figura 3 - Aminoácidos envolvidos na ligação da lactoferrina aos íons. Fonte: Montoya <i>et al</i> , 2011.....	12
Figura 4 – Ultrafiltração tangencial. Adaptado de Kilikian, 2008.	16
Figura 5 - Etapas da cromatografia de troca aniônica. Fonte: Kilikian, 2008.	20
Figura 6 – Etapas da cromatografia de afinidade. Fonte: Kilikian, 2008.	22

Lista de tabelas

Tabela 1 – Composição centesimal do leite de várias espécies de animais. ...	4
Tabela 2 – Composição do soro de queijo.	7
Tabela 3 – Propriedades bioquímicas e concentração g/l das proteínas do soro.	9

Resumo

O soro de queijo é produzido em grandes quantidades e possui um elevado teor de matéria orgânica, tornando-se um resíduo que pode gerar grandes problemas ambientais. Dessa forma, seu aproveitamento é visto com grande interesse pelas indústrias, através da sua utilização no desenvolvimento de novos produtos. O objetivo do trabalho apresentado foi discutir os métodos de purificação da proteína lactoferrina, presente no soro de queijo. A lactoferrina se destaca devido as suas propriedades funcionais e físico-químicas. Os processos cromatográficos possuem a habilidade de atingir elevado grau de pureza a partir de misturas com reduzidas concentrações dos compostos de interesse, mostrando-se como um método de interesse na recuperação de proteínas do soro. Diversos tipos de cromatografia têm sido relatados na adsorção da lactoferrina, como a cromatografia de troca iônica e a cromatografia por afinidade, assim como as condições de processo utilizadas. O aprimoramento de operações unitárias aplicadas a bioprocessos e bioprodutos, as chamadas de técnicas de “*downstream processing*”, se faz necessário para atender a demanda de pesquisas na área de biotecnologia.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. Leite	4
3.2. Soro de queijo.....	5
3.2.1. Lactose	7
3.2.2. Minerais	8
3.2.3. Proteínas do soro.....	8
3.2.3.1. Lactoferrina	10
3.3. Processos de recuperação das proteínas do soro.....	13
3.3.1. Processos de membrana	13
3.3.2. Processos de adsorção	14
3.3.2.1. Adsorção em leite fixo.....	15
3.3.2.1. Adsorção em leite fluidizado	16
3.4. Métodos de purificação da lactoferrina	16
3.4.1. Separação por membrana	16
3.4.2. Adsorção por troca iônica	17
3.4.2.1. Troca catiônica.....	18
3.4.2.2. Troca aniônica	19
3.4.2.3. Troca catiônica e aniônica simultâneas	21
3.4.3. Adsorção por afinidade	21
4. Conclusão.....	24
5. Referências Bibliográficas	25

1. INTRODUÇÃO

O soro de queijo é uma substância líquida aquosa derivada da fabricação de queijos e caseína. O soro de queijo é produzido em grandes quantidades e possui um elevado teor de matéria orgânica, tornando-se um resíduo com alta demanda química de oxigênio. Estima-se a geração de aproximadamente 7,4 milhões de toneladas de soro de leite por ano no Brasil. Nele está presente uma grande quantidade de lactose, proteínas e sais minerais. Dessa forma, o aproveitamento do soro de leite é visto com grande interesse pelas indústrias de alimentos, farmacêutica e de biocombustíveis (ANTUNES, 2003).

Os principais constituintes proteicos presentes no soro são α -lactoalbumina e β -lactoglobulina, soro albumina bovina, lactoferrina, imunoglobulinas, fosfolipoproteínas, fatores bioativos e enzimas, correspondendo a 20% das proteínas do leite (ANTUNES, 2003).

O reconhecimento do valor nutricional do soro de queijo, principalmente devido às propriedades nutricionais, biológicas e funcionais das suas proteínas, assim como a necessidade de amenizar o problema do impacto ambiental, causado pela produção de grandes volumes deste produto, trouxe o desenvolvimento das tecnologias de purificação (MACEDO, 2010).

A lactoferrina (LF) que se destaca devido a suas atividades biológica, bactericida, antifúngica, antiviral e participação na resposta imune inata e adaptativa (TOMITA *et al*, 2008) tem sua tecnologia de purificação estudada predominantemente por processos de adsorção, que apresentam como vantagens a alta velocidade de processamento, sem perda de capacidade de adsorção, módulos compactos para operação em grande escala e baixa pressão durante todo o processo (SAUFI, 2011).

Processos de separação por membrana, principalmente a ultrafiltração tangencial, também são utilizados na recuperação da lactoferrina. Porém, esse tipo de processo é mais dependente da quantidade de volume e apresenta menor grau de pureza na purificação (SAUFI, 2011).

A maioria dos processos de purificação de proteínas envolve pelo menos um passo cromatográfico. A cromatografia é a etapa chave para o sucesso de um processo de purificação, devido principalmente a habilidade de atingir elevado grau de pureza a partir de misturas com reduzidas concentrações dos compostos de interesse, como é o caso do soro de queijo (CHASE, 2011).

Diversos tipos de cromatografia têm sido relatados para adsorção da lactoferrina. Entre eles, destacam-se a cromatografia de troca iônica, em que as proteínas carregadas são ligadas em trocadores de íons com carga oposta, e a cromatografia de afinidade, que explora as interações específicas que podem ocorrer entre proteínas e ligantes imobilizados, assim como processos integrados (CHASE, 2011).

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é estudar e discutir os diferentes métodos de purificação da lactoferrina do soro de queijo.

2.1. Objetivos específicos

- Estudar a importância das proteínas do soro do queijo.
- Discutir e analisar a adsorção em leite fixo e leite fluidizado.
- Discutir e analisar a adsorção da lactoferrina por troca iônica.
- Discutir e analisar a adsorção da lactoferrina por afinidade.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Leite

O leite é um alimento composto por água, proteínas, gordura, açúcares (principalmente lactose), vitaminas e sais minerais. A definição físico-química do leite é dada como sendo uma emulsão natural, na qual os glóbulos de gordura estão mantidos em suspensão, devido à presença de substâncias proteicas e minerais em um estado coloidal (BEUX, 2013).

Os sólidos do leite são compostos por gordura, proteínas, lactose, sais minerais e vitaminas. As gorduras formam uma emulsão, as proteínas formam uma dispersão coloidal e a lactose e os sais minerais formam uma solução verdadeira com a água (ORDÓÑEZ *et al*, 2007).

A composição do leite varia principalmente em função da espécie. A Tabela 1 apresenta os valores de composição em relação ao teor de gordura, proteínas, lactose, cinzas e água para diferentes espécies.

Tabela 1 – Composição centesimal do leite de várias espécies de animais.

Espécie	Proteína (%)	Gordura (%)	Lactose (%)	Cinzas (%)	Água (%)
Humana	1,5	3,5	7,0	0,2	87,8
Bovina	3,5	3,8	5,0	0,7	87,0
Caprina	4,0	3,0	4,8	0,8	87,4
Ovina	5,4	8,2	4,8	0,9	80,7
Equina	2,6	1,6	6,1	0,4	89,3
Búfala	4,1	7,7	4,8	0,7	82,7

Fonte: Aquarone *et al*, 2005.

As proteínas do leite são compostas por caseínas (80%) e pelas proteínas do soro (20%). As caseínas são encontradas dispersas no leite, na forma de micelas, e são compostas por α_{s1} -caseína, α_{s2} -caseína, β -caseína, κ -caseína, γ -caseína e

fosfato de cálcio coloidal. A κ -caseína não precipita na presença de íon cálcio e atua na proteção das demais caseínas, já que se encontra na superfície externa da micela. A micela é uma partícula hidratada e porosa, composta por submicelas, as quais são unidas pelo fosfato de cálcio coloidal (ORDÓÑEZ *et al*, 2007).

A gordura é o componente que mais varia entre as espécies e raças e seu conteúdo é inversamente proporcional à quantidade de leite produzido. Ela encontra-se na forma de glóbulos emulsionados na fase líquida. Geralmente é fixado um teor mínimo de gordura no leite para a padronização do queijo produzido. Uma das funções da gordura é atuar na cor, consistência e sabor final do queijo (AQUARONE *et al*, 2001).

A lactose é o carboidrato livre presente no leite. É um dissacarídeo redutor composto por galactose e glicose unidas por uma ligação $\beta,1\rightarrow4$, responsável pelo sabor doce do leite. É o substrato utilizado pelo fermento láctico para a produção de ácido láctico na fabricação de queijos (AQUARONE *et al*, 2001).

Os principais sais minerais presentes no leite são os fosfatos, cloretos, sulfatos, carbonatos e bicarbonatos de sódio, potássio, cálcio e magnésio. O cálcio auxilia na coagulação enzimática do leite e exerce papel na estrutura da massa coagulada. Todas as vitaminas estão presentes no leite, as lipossolúveis (A, D e E) estão associadas à porção gordurosa, enquanto as hidrossolúveis são encontradas no soro (ORDÓÑEZ *et al*, 2007).

Enzimas estão presentes no leite em baixas concentrações, mas sua atividade é de grande importância nos processos bioquímicos. Entre as principais classes de enzimas presentes no leite, estão: lípases, proteases, fosfatases, oxidases, transferases, catalase, superóxido dismutase e lactoperoxidase, ou simplesmente, peroxidase (ORDÓÑEZ *et al*, 2007).

3.2. Soro de queijo

O queijo é um derivado lácteo, obtido através da precipitação da caseína, principal proteína do leite. Durante esse processo é formada uma porção aquosa

denominada soro de leite ou soro de queijo. O soro de queijo é produzido em grandes quantidades. Estima-se que para a produção de um quilo de queijo são utilizados 10 litros de leite e gerados 9 litros de soro (MIZUBUTI, 1994).

A Figura 1 apresenta o fluxograma da produção de queijo. Inicialmente deve-se realizar a padronização na composição do leite, para que se tenha uniformidade na produção. Em seguida, realiza-se o tratamento térmico do leite cru (pasteurização), com objetivo de eliminar micro-organismos patogênicos e indesejáveis que alteram as características do produto. Na próxima etapa há a coagulação do leite, através da precipitação das caseínas, formando o gel de coalhada. Realiza-se o corte do gel, com o objetivo de aumentar a área superficial das partículas de massa (coágulos), permitindo a expulsão do soro. Para acelerar a sinérese, o processo envolve agitação e aquecimento. Em seguida, inicia-se a eliminação do soro (dessora e prensagem), com a formação de duas fases, uma mais densa (massa), que precipita, e outra aquosa, denominada soro. Após essa operação o queijo é moldado e levado para salga e maturação. O soro é proveniente das etapas de corte, agitação, cozimento, dessora e prensagem (AQUARONE *et al*, 2001).

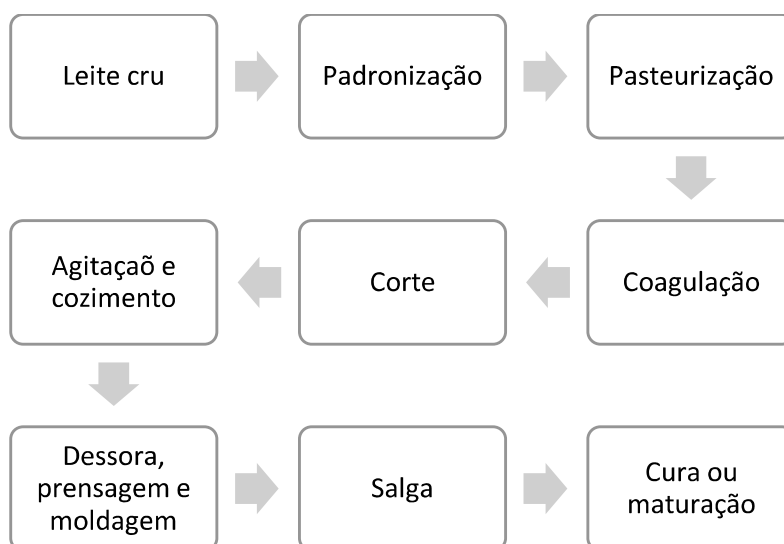


Figura 1 - Fluxograma da produção de queijo.

O soro apresenta-se como uma mistura diluída de proteínas, lactose, sais minerais e gordura, como pode ser observado na Tabela 2. A composição do soro pode variar em função da composição do leite, do tipo de tratamento a que ele é submetido durante o processo de fabricação do queijo (homogeneização, aquecimento, adição de cloreto de sódio, etc.) ou da produção de caseínas (ANTUNES, 2003).

Tabela 2 – Composição do soro de queijo.

Componente	Concentração (%)
Sólidos totais	6,2
Proteína total	0,75
Lactose	4,2
Gordura	0,04
Cinzas	0,8
Ácido láctico	0,4

Fonte: Antunes, 2003.

Existem dois tipos de soro, o doce e o ácido, dependendo do modo de coagulação do leite. O soro doce possui um pH de aproximadamente 6,0 e é produzido a partir da coagulação enzimática do leite por ação da quimosina. Já o soro ácido, de pH de aproximadamente 4,6, é obtido após a coagulação das caseínas por acidificação biológica, através da fermentação microbiana da lactose do leite em ácido láctico. O soro doce apresenta um teor de lactose superior ao do soro ácido, uma vez que neste último parte da lactose é transformada em ácido láctico (MACEDO, 2010).

3.2.1. Lactose

A lactose é o carboidrato de maior concentração do soro, representado 70% em base seca. No leite cru, é responsável por 40% do total de sólidos. É um

dissacarídeo, formado por galactose e glicose, e possui baixa solubilidade (MACEDO, 2010).

Esse carboidrato é um dos principais responsáveis pelas elevadas cargas orgânicas presentes neste produto, expressas em termos de demanda bioquímica de oxigênio (BALDASSO, 2008).

3.2.2. Minerais

As substâncias minerais mais abundantes no soro são o potássio, o sódio, o cálcio, o magnésio, o cloro, o fósforo e o enxofre. Os sais dissolvidos afetam várias propriedades do soro, como a estabilidade térmica e a conformação das suas proteínas (BALDASSO, 2008).

Parte destes componentes está associada às proteínas do soro, como, por exemplo, na lactoferrina, que contém ferro, e na fosfatase alcalina, que contém zinco, estando a maior parte em solução (MACEDO, 2010).

3.2.3. Proteínas do soro

Os principais constituintes proteicos presentes no soro são α -lactoalbumina (25%) e β -lactoglobulina (55%), proteínas globulares de baixa massa molar, que representam aproximadamente 80% das proteínas totais do soro de leite. Ambas são sintetizadas nas glândulas mamárias (ANTUNES, 2003).

Os componentes proteicos presentes no soro em menores quantidades são a soro albumina bovina, lactoferrina, imunoglobulinas, fosfolipoproteínas, fatores bioativos e enzimas (ANTUNES, 2003). A tabela 3 apresenta as propriedades bioquímicas e a concentração das proteínas do soro.

Tabela 3 – Propriedades bioquímicas e concentração g/l das proteínas do soro.

Proteína	Massa molar (kDa)	Ponto isoelétrico	Concentração g.L⁻¹
β-lactoglobulina	18,4	5,2	2,7
α-lactoalbumina	14,15	4,2 - 4,8	1,2
Soro albumina bovina	69	4,7 - 4,9	0,4
Imunoglobulina	15 -1000	5,5 -8,3	0,65
Peptonas	4,1 – 40,8	3,3 – 3,7	1,4
Lactoferrina	78	9	0,1
Lactoperoxidase	89	9,5	0,02
Glicomacropeptídeo	7	-	-

Fonte: Audic *et al*, 2003.

As proteínas encontram-se em solução coloidal, sob a forma de moléculas ou de agregados moleculares muito pequenos, com um diâmetro que pode variar entre 3 a 6 nm, podendo estar ligadas a íons (MACEDO, 2010).

A principal diferença entre as proteínas do soro de leite e a caseína está relacionada à forma molecular, solubilidade e resistência ao pH e calor. As proteínas do soro são globulares, compactas, solúveis em ampla faixa de pH, termolábeis e não coaguláveis pela enzima renina. Sua solubilidade se deve ao fato de que os grupos hidrofóbicos encontram-se voltados para o interior da molécula, enquanto os hidrofílicos estão para o exterior da molécula. As propriedades funcionais dessas proteínas dependem de fatores físico-químicos, como a composição e sequência de aminoácidos, flexibilidade, tamanho, conformação e distribuição de cargas na estrutura da molécula e de fatores como pH, temperatura, concentração de proteína e tipos de íons presentes na solução (BOSHI, 2006).

As proteínas do soro podem ser usadas na sua forma nativa em aplicações alimentícias, uma vez que apresentam baixa força iônica, o que as torna solúveis em amplas faixas de pH. Além disso, possuem alta qualidade nutricional e propriedades funcionais (ANTUNES, 2003).

Entre as propriedades das proteínas está a desnaturação, que causa uma modificação na sua conformação globular ou pregueada para linear, tornando-as mais reativas. Esse fenômeno também expõe os resíduos de aminoácidos essenciais, o que faz com que seu valor biológico não seja diminuído (BALDASSO, 2008).

As proteínas do soro possuem alta solubilidade em diferentes valores de pH, se não tiverem sofrido desnaturação térmica, e apresentam baixa viscosidade, comparadas a outras proteínas. Por serem solúveis, não tem grande capacidade de adsorver água na sua forma nativa, mas em condições de aquecimento aumentam a capacidade reter água, formando géis de forma irreversível. Como possuem regiões hidrofóbicas e hidrofílicas, podem atuar como emulsificantes (BALDASSO, 2008).

As proteínas possuem em sua superfície grupamentos com cargas positivas, provenientes dos aminoácidos histidina, lisina, arginina e aminas terminais, e cargas negativas, devidas ao ácido aspártico e grupamentos carboxílicos terminais. Dessa forma, a carga líquida de uma proteína depende da proporção entre suas cargas positivas e negativas, que varia de acordo com o pH. Quando o número de cargas positivas é igual ao de negativas, tem-se o ponto isoelétrico (PI). Acima do PI as proteínas possuem carga líquida negativa, enquanto abaixo a carga líquida é positiva (KILIKIAN, 2008).

3.2.3.1. Lactoferrina

A lactoferrina (LF) é uma das proteínas presente no soro com atividade biológica. Ela está presente em secreções, como lágrimas, saliva, secreções nasais e brônquicas, bile, fluido gastrointestinal, urina e em maiores concentrações no colostro e leite dos mamíferos (MONTROYA *et al*, 2011).

É uma glicoproteína de cadeia simples, com massa molar 80 kDa, de coloração avermelhada, contendo 692 aminoácidos. A cadeia de polipeptídios é dobrada em dois lobos simétricos, conectados por uma região dobradiça que fornece flexibilidade à molécula, e cada lobo pode ligar-se a um íon Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} ou Mn^{2+} (BROCK, 2002).

Essa proteína pode apresentar duas formas, a holo-lactoferrina e a apo-lactoferrina. A holo-lactoferrina é saturada de ferro, apresenta uma molécula mais fechada e uma maior resistência à proteólise, enquanto a apo-lactoferrina não possui ferro ligado (BROCK, 2002).

A estrutura primária da lactoferrina apresenta resíduos de Cys em número e posição adequados para a formação de 17 pontes dissulfeto intramolecular. Os resíduos de Asn presentes nos domínios C e N-terminal fornecem vários locais de N-glicosilação. A composição de aminoácidos da LF conferem a esta proteína um caráter básico, e seu ponto isoelétrico está entre 8 e 9 (MONTTOYA *et al*, 2011). A conformação da LF através de cristalografia é apresentada na Figura 2.

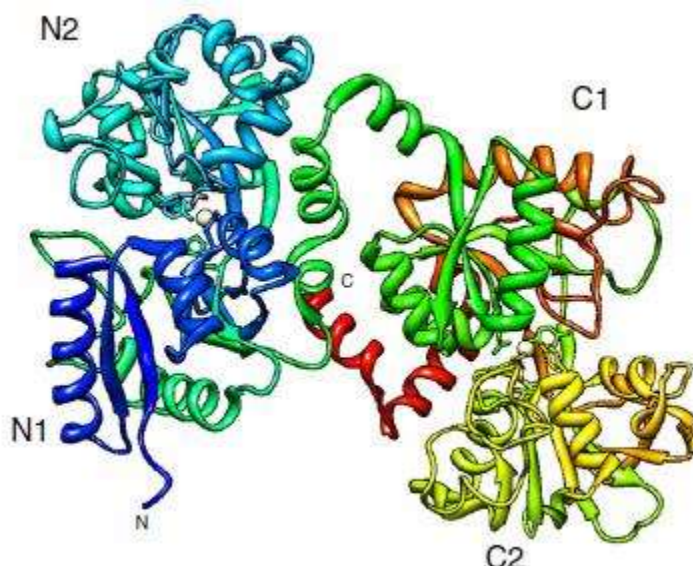


Figura 2 - Estrutura da lactoferrina, indicando os quatro domínios de polipeptídeo.
Fonte: Montoya *et al*, 2011.

Os aminoácidos diretamente envolvidos na ligação com Fe^{3+} são Asp60, Tyr92, Tyr192 e His253, enquanto Arg121 está envolvido na ligação do CO_3^{2-} , como é apresentado na Figura 3 (MONTTOYA *et al*, 2011).

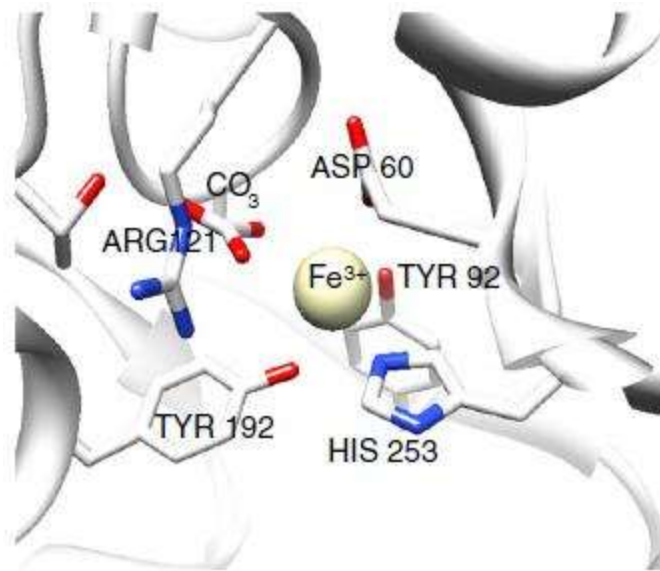


Figura 3 - Aminoácidos envolvidos na ligação da lactoferrina aos íons. Fonte: Montoya *et al*, 2011.

A LF apresenta diversas ações fisiológicas, como atividade antiviral, atividade imunomodulatória, atividade antioxidante, regulação da resposta inflamatória e ações bacteriostática e bactericida. A ação bacteriostática é explicada pela capacidade de quelar íons férricos (Fe^{3+}), o que limita a utilização deste nutriente por bactérias no local da infecção e regula negativamente a expressão de seus fatores de virulência. Já a ação bactericida se deve à capacidade da lactoferrina de se ligar às moléculas de lipopolissacarídeos das bactérias gram-negativas. A ligação do resíduo N-terminal da lactoferrina rico em aminoácidos positivos à membrana celular bacteriana provoca sua desestabilização (TOMITA *et al*, 2008).

Devido à variada gama de aplicações nas indústrias farmacêutica e alimentícia, na medicina e biologia, muitas tecnologias de recuperação e isolamento da lactoferrina em altos níveis de pureza foram desenvolvidas. Os processos envolvem diversas etapas, mas as técnicas que apresentam maior grau de pureza e resolução são os processos cromatográficos (MONTTOYA *et al*, 2011).

3.3. Processos de recuperação das proteínas do soro

Atualmente, existe interesse comercial considerável na preparação das proteínas individuais para alimentação e aplicações nutricionais e terapêuticas. Dessa forma, têm sido desenvolvidos vários métodos de fracionamento de proteínas do soro, embora só alguns deles tenham aplicação em nível industrial. Os principais produtos obtidos a partir do processamento do soro de leite são concentrados (CPS), isolados (IPS) e fracionados proteico do soro (FPS) (BALDASSO, 2008).

Um processo de recuperação viável deve ser simples, rápido, não desnaturante e deve garantir um alto rendimento e qualidade do produto. Estes processos se dividem em duas categorias principais: utilizando processos de separação por membrana e cromatografia de adsorção seletiva, que serão apresentados a seguir (CHASE, 2011).

3.3.1. Processos de membrana

Os processos de separação por membrana (PSM) podem ser aplicados na concentração, fracionamento e purificação das proteínas do soro. Dentre os PSM, o mais usado na recuperação de proteínas, inclusive a lactoferrina, é a ultrafiltração (UF) operada em fluxo tangencial (PEREIRA, 2009).

Uma membrana pode ser descrita como uma interface, geralmente heterogênea, que age como uma barreira ao fluxo de moléculas e espécies iônicas presentes nos líquidos e / ou vapores em contato com as duas superfícies. As membranas são tradicionalmente utilizadas para separações com alta taxa de transferência, mas com requisitos de baixa resolução (SAXENA, 2009).

Em comparação com os métodos cromatográficos, as técnicas de separação por membrana oferecem vantagens de baixo custo e facilidade de *scale-up* para a produção comercial. No entanto, a falta de seletividade da membrana e a sua incrustação, devido à adsorção de proteínas durante a filtração restringe suas aplicações (SAXENA, 2009).

A ultrafiltração com fluxo tangencial tem sido amplamente utilizada como método preferido para a concentração de proteínas do soro. Ela é adequada para pressões inferiores a 10 bar, usando membranas com tamanho de poro de até aproximadamente 100 nm. São retidos compostos com massa molar na faixa de 1 kDa a 100 kDa, dependendo do corte nominal da membrana. Os compostos de massa molar menor são retidos no filtrado, enquanto as proteínas com massa molar maiores que o corte nominal da membrana estarão presentes no concentrado (BOSHI, 2006).

3.3.2. Processos de adsorção

A separação de proteínas por cromatografia é cada vez mais comum no processamento *downstream*, oferecendo vantagens de alta velocidade de processamento, sem perda de capacidade de adsorção, módulos compactos para operação em grande escala e baixa pressão durante todo o processo. Diversos tipos de cromatografia, em uma ampla gama de tipos e aplicações, têm sido revisados por vários autores, como Chase (2011); Liang *et al* (2011) (SAUFI, 2011).

Os processos de adsorção são pouco dependentes do volume, uma vez que a capacidade adsorvente está relacionada principalmente com a massa da proteína recuperada, assim como da concentração das espécies adsorvidas, e não do volume de líquido processado. Além disso, processos cromatográficos possuem a habilidade de atingir elevado grau de pureza a partir de misturas com reduzidas concentrações dos compostos de interesse (CHASE, 2011).

Um sistema cromatográfico compreende duas fases, uma fase estacionária fixa e uma fase móvel. O princípio da separação se baseia na existência de interações entre os constituintes da amostra com ambas as fases. As moléculas possuem interações diferentes com a fase estacionária, sendo transportadas a velocidades diferentes, separando-se assim uma das outras (KILIKIAN, 2008).

A adsorção está relacionada com a interação dos grupos funcionais das partículas da fase estacionária e do soluto. O soluto é adsorvido pela superfície das partículas sólidas, e a separação ocorre pelo equilíbrio entre a quantidade de

composto adsorvido e a fase líquida. As moléculas do soluto e do solvente competem pelos sítios ativos presentes na superfície do adsorvente. A adsorção ocorre em um sítio desocupado, em razão das forças elétricas, físicas ou reações químicas (FERREIRA, 2001).

De forma geral, nos processos de adsorção seletiva uma única proteína purificada é produzida, em conjunto com uma solução de soro com as outras proteínas. Diversos métodos de processos cromatográficos de adsorção para o fracionamento de proteínas do soro têm sido relatados e são descritos nos próximos tópicos (DOULTANI, 2004).

3.3.2.1. Adsorção em leito fixo

A adsorção em leito fixo é caracterizada pela passagem de um fluido contendo o soluto a ser adsorvido por um tubo cilíndrico, em que o adsorvente se encontra empacotado. No início há uma alta taxa de adsorção, de forma que a concentração do soluto na saída da coluna é baixa. À medida que as partículas do adsorvente ficam saturadas, há um aumento da concentração do soluto no efluente, ocasionando o início da ruptura. Ao se atingir a capacidade máxima do adsorvente, a concentração de equilíbrio do soluto na entrada e na saída é igual (VEREDAS, 2000).

Quando se utiliza leito fixo, a taxa de adsorção é afetada pela transferência de massa do sistema. Essa transferência ocorre da fase fluida para a fase estacionária, até um ponto em que há resistência nos poros do adsorvente e a capacidade máxima é atingida (VEREDAS, 2000).

A adsorção em leito fixo exige uma alimentação com meios isentos de partículas em suspensão e demanda tempos elevados de operação, devido a reduzida difusividade do meio através do leito (KILIKIAN, 2008).

3.3.2.1. Adsorção em leito fluidizado

Em um leito fluidizado, as partículas do adsorvente são movimentadas por meio de um fluxo ascendente na coluna, formando uma suspensão de uma mistura de partículas. O estado fluidizado promove aumento da porosidade do leito, evitando que o material particulado contaminante provoque a obstrução do meio poroso. A limitação difusional do líquido é reduzida, diminuindo o tempo do processo. Devido a essas características, tem-se redução de uma operação unitária preliminar para separação dos contaminantes particulados, como a filtração ou a centrifugação (KILIKIAN, 2008).

Porém são requeridos tipos especiais de colunas e equipamentos complexos. Dessa forma, a adsorção em leito fluidizado é operada apenas em escala laboratorial (FERREIRA, 2001).

3.4. Métodos de purificação da lactoferrina

3.4.1. Separação por membrana

A lactoferrina pode ser concentrada pelo método de ultrafiltração do soro, utilizando-se membranas com corte nominal de 70kDa, de forma que permaneça na fração concentrada, uma vez que é uma proteína de 78kDa. Porém, nesse caso, a LF não é totalmente purificada, uma vez que a lactoperoxidase (89kDa) e a soro albumina (69kDa) também estão presentes nessa fração (CHASE, 2011). O processo de ultrafiltração tangencial é apresentado na Figura 4.

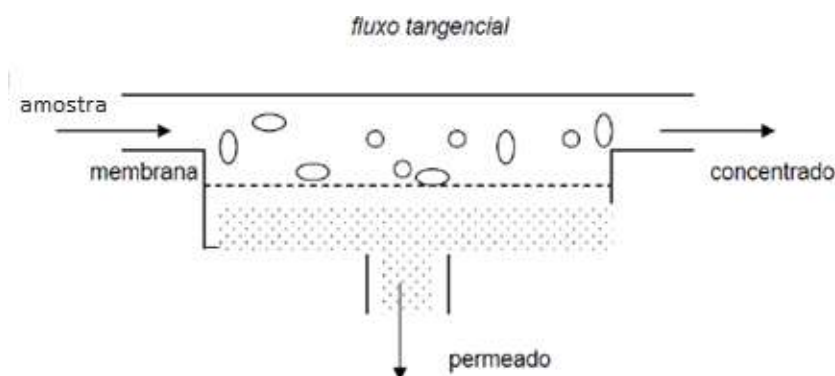


Figura 4 – Ultrafiltração tangencial. Adaptado de Kilikian, 2008.

Almecija *et al* (2007) estudaram o fracionamento das proteínas do soro utilizando ultrafiltração tangencial. Empregou-se uma membrana de 30 kDa de cerâmica tubular no modo de diafiltração contínua, em diferentes faixas de pH. Para α -lactalbumina e β -lactoglobulina, a soma dos rendimentos do retentado e do permeado foi de cerca de 100% em todos os casos. Em contraste, as frações de soro albumina, imunoglobulina e lactoferrina permaneceram na fração retida, com 60% de pureza (pH 9) em relação ao soro inicial.

3.4.2. Adsorção por troca iônica

A troca iônica se baseia na distribuição de carga das proteínas. As proteínas são adsorvidas nas resinas trocadoras de íons por ligação eletrostática entre cargas opostas da superfície da proteína e o grupo carregado do adsorvente. A molécula de proteína desloca os contra íons que se situam nos poros e interage com o adsorvente. Ou seja, a cromatografia de troca-iônica baseia-se na competição entre íons de interesse e contaminantes pelos grupos carregados da fase estacionária (KILIKIAN, 2008).

A vantagem do uso da cromatografia de troca iônica para proteínas é que a adsorção pode ser facilmente reversível com a mudança das condições de processo. O processo de cromatografia de troca iônica segue uma sequência de etapas, que incluem adsorção, lavagem, eluição e regeneração (KILIKIAN, 2008).

O trocador iônico consiste de um sólido poroso que possui grupos funcionais ligados na superfície. Esses grupos podem se associar a contra íons, e os contra íons podem ser reversivelmente trocados por outros íons, presentes na molécula de interesse. A troca iônica é dividida em catiônica e aniônica. Na troca catiônica os contra íons possuem carga positiva, enquanto na aniônica eles são negativos (KILIKIAN, 2008).

3.4.2.1. Troca catiônica

A estrutura de um trocador catiônico consiste de uma matriz sólida com grupos iônicos carregados negativamente. Os contra íons, positivos, neutralizam essas cargas, mantendo o sistema em equilíbrio. Quando as proteínas do soro entram em contato com a superfície, ocorre uma perturbação do sistema. Dessa forma as proteínas com carga positiva são adsorvidas na matriz negativa, restabelecendo o equilíbrio (KILIKIAN, 2008).

A lactoperoxidase e a lactoferrina são as proteínas que se encontram em menor concentração no soro. Por suas características físico-químicas e, em particular, o alto ponto isoelétrico, estas proteínas apresentam vantagens diante das demais, quando separadas por processos de cromatografia de troca catiônica. A cromatografia de troca catiônica é a mais utilizada em larga escala para purificação da lactoferrina (DOULTANI, 2004).

A cromatografia de troca catiônica pode ser aplicada na purificação da lactoferrina quando se utiliza soluções tampão com pH menor que o pI da LF. Nessas condições, a molécula de LF apresenta carga líquida positiva, de forma que é adsorvida pelas cargas negativas no trocador catiônico (KILIKIAN, 2008).

Nóbrega *et al* (2000) realizaram estudos sobre o processo de adsorção utilizando dois diferentes tipos de resinas de troca catiônica: SP-Sepharose FF e a SP-Sepharose XL, com tampão fosfato 50 mM e pH 6,5. As frações de lactoperoxidase e lactoferrina adsorvidas foram eluídas pela variação da força iônica com adição de NaCl e analisadas por eletroforese SDS-PAGE. Os resultados mostraram que a SP-Sepharose FF apresentou bons rendimentos enquanto a SP-Sepharose XL maior pureza.

Fidelis (2011) estudou a recuperação de lactoferrina de soro do leite, em coluna de troca catiônica supermacroporosa de criogel de poliácridamida. A coluna foi ativada com resíduos de ácido 2-acrilamida-2-metil-1-propanosulfônico (AMPSA), definido como criogel pAAm-SO₃. O número de sítios ativos e as isoterms de adsorção para a lactoferrina demonstram que esse criogel pode ser usado para separações cromatográficas baseadas em troca catiônica. A pureza média de lactoferrina na alimentação foi de 2,22 % (m/m) e no eluído 25 % (m/m), indicando

que a adsorção gerou um aumento na pureza da lactoferrina no eluído em relação à proporção originalmente encontrada no soro.

Liang *et al* (2011) estudaram a recuperação simultânea da lactoferrina e da lactoperoxidase por cromatografia de troca catiônica utilizando uma resina SPEC 70SLS. As capacidades de ligação da resina SPEC 70SLS para adsorção de lactoferrina e lactoperoxidase simultaneamente foram 7,60 mg/g resina e 6,89 mg/g resina, respectivamente. Esses resultados foram superiores a adsorção por troca catiônica utilizando as resinas CM Sepharose FF ou SP Sepharose F.F. nas mesmas condições. A resina SPEC 70SLS foi considerada como uma candidata para a purificação direta e econômica de lactoferrina e lactoperoxidase do soro de queijo.

3.4.2.2. Troca aniônica

O trocador aniônico contém grupos carregados positivamente e adsorve proteínas com carga líquida negativa. Os contra íons, negativos, neutralizam essas cargas, mantendo o sistema em equilíbrio. Quando a matriz entra em contato com solução contendo as proteínas, há uma perturbação do sistema. Para restabelecer o equilíbrio, as proteínas com carga negativa são adsorvidas (KILIKIAN, 2008). A Figura 4 apresenta as etapas da cromatografia de troca aniônica.

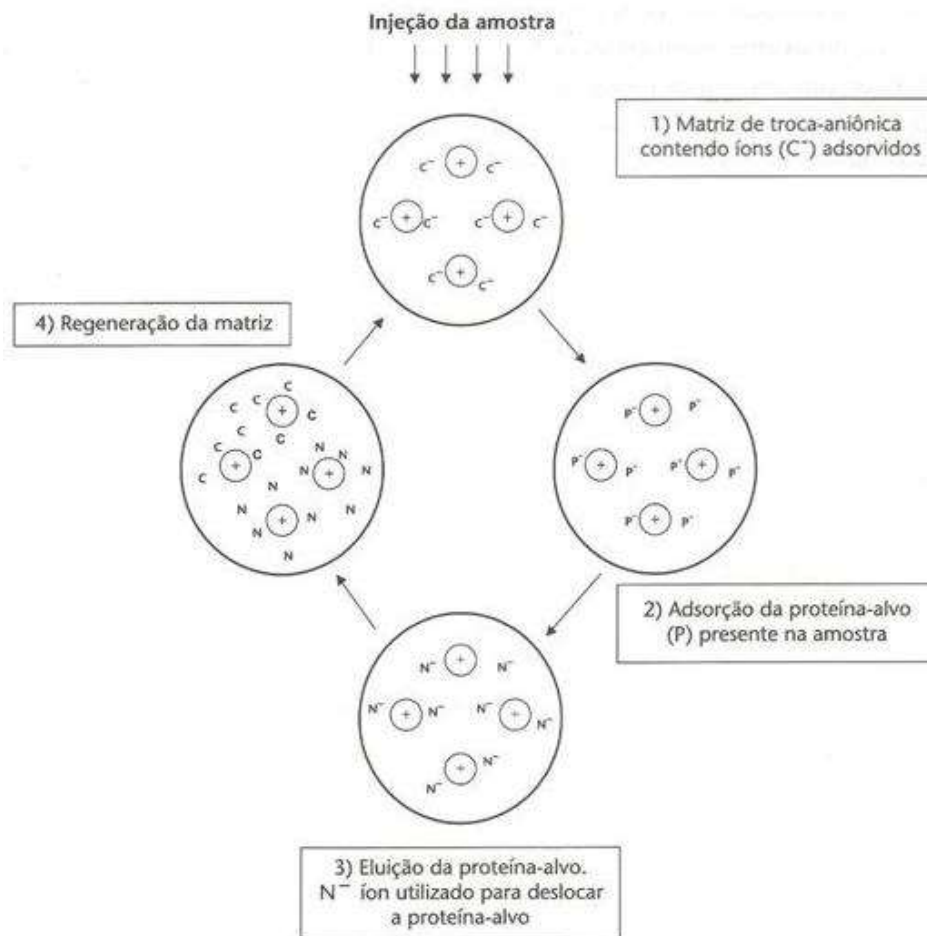


Figura 5 - Etapas da cromatografia de troca aniônica. Fonte: Kilikian, 2008.

Cavalcanti (2010) estudou a adsorção de proteínas do soro por troca aniônica, através da utilização da resina Streamline DEAE. Através da análise por eletroforese SDS-PAGE pôde ser observada diversas bandas, incluindo 3 bandas protéicas de massa molar entre 66 e 97 kDa, que provavelmente referem-se a albumina (69 kDa), lactoferrina (78 kDa) e lactoperoxidase (89 kDa). Porém, não houve total purificação da molécula de lactoferrina, uma que vez que outras proteínas foram adsorvidas. Para total recuperação da LF deve-se combinar outros métodos de adsorção.

3.4.2.3. Troca catiônica e aniônica simultâneas

O conceito de adsorção em uma membrana de matriz mista (MMM) foi introduzido para superar os problemas com a modificação química de membranas para cromatografia. Este tipo de adsorção fornece um procedimento simples e produz um desempenho cromatográfico que é competitivo com membranas adsorventes modificados quimicamente, em termos de capacidade de adsorção e dinâmica. Diversas proteínas podem ser adsorvidas simultaneamente e eluídas em diferentes condições (SAUFI, 2011).

Saufi (2011) realizou estudos da interação de uma membrana de matriz mista para extrair todas as principais proteínas de soro de leite bovino. Foi sintetizada uma única membrana através da incorporação de 42,5% em peso de uma resina aniônica e 7,5% em peso de uma resina catiônica. Ambas as proteínas, básicas e ácidas, foram ligadas simultaneamente. A capacidade de adsorção das proteínas foi de 85 mg de proteína total por g de membrana. A adsorção da lactoferrina foi de $11,40 \pm 0,73$ mg de lactoferrina por g de membrana.

3.4.3. Adsorção por pseudo afinidade

A cromatografia de pseudo afinidade baseia-se nas propriedades biológicas ou funcionais das proteínas e da fase estacionária. A separação depende das interações altamente específicas entre os pares de materiais, o ligante e o material a ser adsorvido. Essa técnica possui alta seletividade, alta capacidade dependente do ligante e alta velocidade (NOPPE *et al*, 2006).

O ligante é imobilizado em um suporte insolúvel, a matriz porosa, e o outro componente é adsorvido neste ligante. Para eluir a proteína, adiciona-se uma solução que enfraqueça as interações entre os componentes. Essa técnica possibilita a separação de uma proteína de uma mistura complexa, baseada no reconhecimento e na ligação da molécula alvo às estruturas específicas (KILIKIAN, 2008).

As características desse método são a alta especificidade, utilização de grande volume da amostra, purificação de proteínas a partir de misturas biológicas complexas em uma única etapa, separação entre formas nativas e formas desnaturadas, remoção de pequenas quantidades da proteína de interesse a partir de grandes quantidades de outras proteínas contaminantes (KILIKIAN, 2008). A Figura 5 apresenta as etapas do processo de adsorção por afinidade.

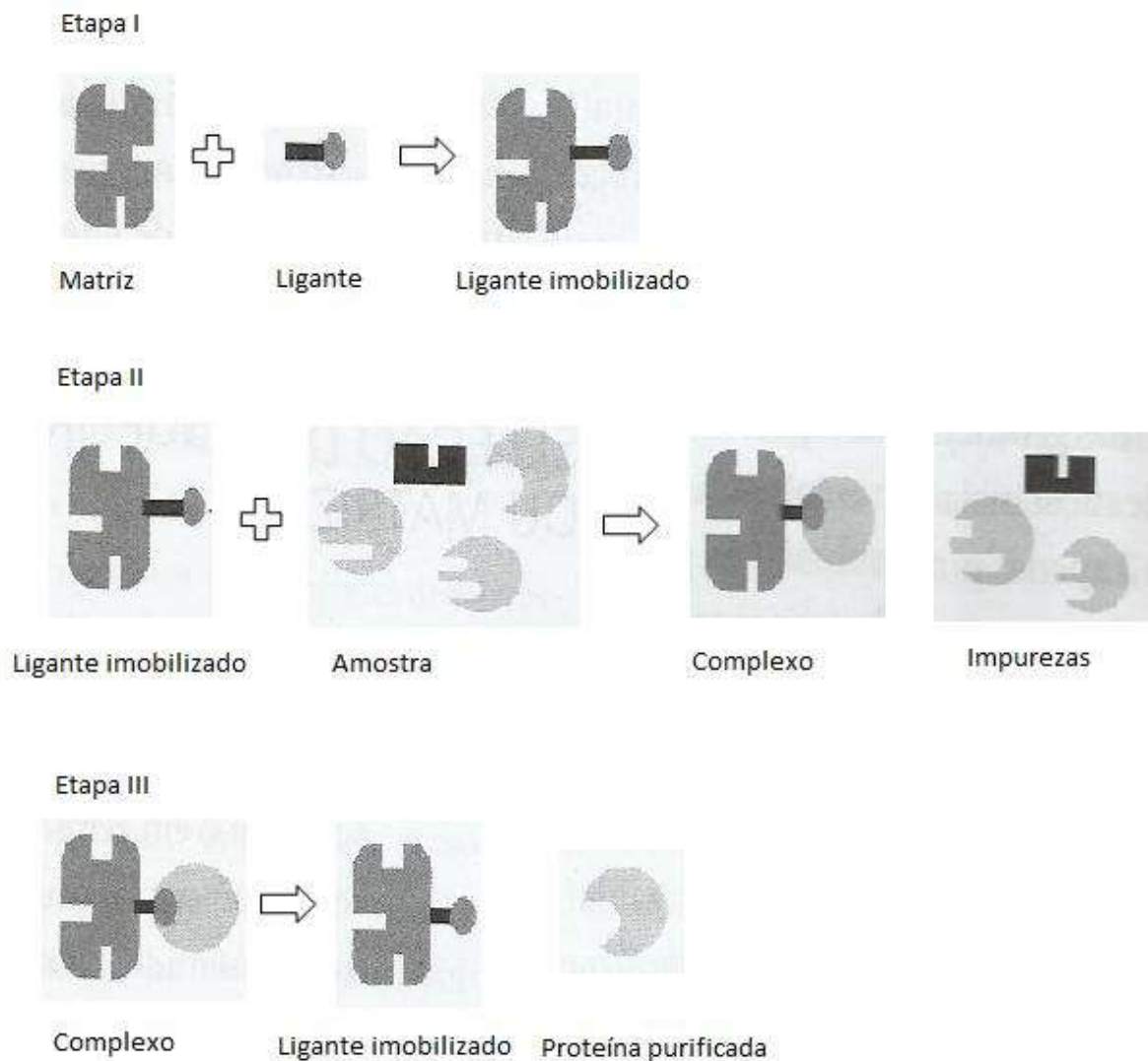


Figura 6 – Etapas da cromatografia de afinidade. Fonte: Kilikian, 2008.

Wolman *et al* (2007) estudaram a utilização de membranas de fibra oca derivatizada com o corante RED HE-3B para purificação da lactoferrina a partir de soro de leite. O comportamento cromatográfico das membranas de afinidade na adsorção da lactoferrina foi caracterizado pelo equilíbrio através das isotermas de adsorção e sob condições dinâmicas. A produtividade das membranas de fibra oca operadas na taxa de 5 mL/min (501,5 μg LF/h.mL) foi mais de 500% do que o alcançado com a membrana de Sepharose (82,8 μg LF/h.mL). Nos processos operados a 5 e 0,4 ml/min (taxas de fluxo combinados) a produtividade é de 200% mais elevado (252,9 μg LF/h.ml), porém a recuperação da proteína foi mais elevada. A cromatografia de afinidade utilizando como ligante o corante RED HE-3B permitiu a recuperação de LF de soro de leite em apenas um passo com uma alta produtividade (61% de recuperação da LF).

Carvalho (2010) estudou a adsorção de lactoferrina em coluna supermacroporosa de criogel de poliacrilamida ativada com íons de cobre. A cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados explora a afinidade entre íons metálicos imobilizados em uma matriz sólida e grupamentos situados na superfície de uma determinada proteína. Na presença de íons metálicos imobilizados, os resíduos dos aminoácidos histidina, cisteína e triptofano presentes na superfície da proteína são fortemente adsorvidos devido às ligações de coordenação formadas entre os íons metálicos e os grupos doadores de elétrons. Os dados obtidos a partir de análises de proteína total, eletroforese SDS-PAGE e cromatografia por exclusão molecular evidenciaram a alta afinidade de interação entre a lactoferrina e os íons de cobre imobilizados na matriz, devido a presença dos resíduos de histidina em sua superfície. A semelhança entre os tempos de retenção da lactoferrina padrão (250s) e dos eluídos (248s) obtidos do processo cromatográfico implica na presença de lactoferrina nos eluídos coletados.

4. Conclusão

A demanda do mercado em expansão para lactoferrina, baseado em seus valores nutricionais e fisiológicos tem incentivado pesquisas sobre a purificação desta molécula.

Os processos que mais se destacam são os de cromatografia de troca iônica, em que as proteínas carregadas são ligadas em trocadores de íons com carga oposta, e a cromatografia de afinidade, que explora as interações específicas que podem ocorrer entre proteínas e ligantes imobilizados. Cada processo possui características próprias de resolução e grau de pureza, que são dependentes das condições utilizadas durante a purificação. A utilização de processos integrados também tem se mostrado eficiente na purificação desta molécula.

A escolha do método de purificação da lactoferrina do soro de queijo deve ser baseada nas condições de processo e no grau de recuperação da mesma, relacionados à análise de suas propriedades e do custo do processo.

5. Referências Bibliográficas

- ALMECIJA, M.C.; IBANEZ, R.; GUADIX, A.; GUADIX, E.M. **Effect of pH on the fractionation of whey proteins with a ceramic ultrafiltration membrane.** Science Direct 288:28–35. 2007.
- AUDIC, J.; CHAUFER, B.; DAUFIN, G. **Non-food applications of milk components and dairy co-products: A Review.** Lait. 2003: 83; 417-438.
- ANTUNES, A.J. **Funcionalidade de proteínas do soro de leite bovino.** São Paulo: Ed Manole, 2003.
- AQUARONE, E.; LIMA, U.A.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia na produção de alimentos.** Vol. 4. Editora Blücher, São Paulo, 2001.
- BALDASSO, C. **Concentração, purificação e fracionamento das proteínas do soro lácteo através da tecnologia de separação por membranas.** Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. UFRGS. Porto Alegre, 2008.
- BEUX, S. **Apostila De Tecnologia De Leite E Derivados.** Universidade Tecnológica Federal Do Paraná. Pato Branco, 2013.
- BOSHI, J.R. **Concentração e purificação das proteínas do soro de queijo por ultrafiltração.** Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. UFRGS. Porto Alegre, 2006.
- BROCK, J.H. **The physiology of lactoferrin** Biochem. Cell Biol. 2002: 80; 1–6.
- CARVALHO, B.M.A. **Adsorção de lactoferrina em coluna supermacroporosa de criogel de poliacrilamida ativada com íons de cobre.** Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. UFV. Viçosa, 2010.
- CAVALCANTI, J.S. **Recuperação e purificação de proteínas do soro de queijo “tipo coalho” usando cromatografia de troca iônica e interação hidrofóbica em leito na forma expandida.** Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. UFRN. Natal, 2010.
- CHASE, H.A.; EL-SAYED, M.M.H. **Trends in whey protein fractionation.** Biotechnol Lett. Springer Science + Business Media B.V. 2011.
- DOULTANI, S.; TURHAN, K.N.; ETZEL, M.R. **Fractionation of proteins from whey using cation exchange chromatography.** Process Biochemistry, 39. 1737–1743. 2004.

FERREIRA, R.C. **Separação de α -lactoalbumina e β -lactoglobulina de proteínas de soro de queijo por adsorção em colunas de leito fixo.** Tese de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. UFV. Viçosa, 2001.

FIDELIS, P.C. **Desenvolvimento de um adsorvente contínuo supermacroporoso de troca catiônica para recuperação de lactoferrina de soro de leite.** Tese de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. UFV. Viçosa, 2011.

KILIKIAN, B. V.; PESSOA JÚNIOR, A. **Purificação de produtos biotecnológicos.** Barueri: Manole, 2008.

LIANG, Y.; WANG, X.; WU, M.; ZHU, W. **Simultaneous isolation of lactoferrin and lactoperoxidase from bovine colostrum by SPEC 70 SLS cation exchange resin.** Int. J. Environ. Res. Public Health, 8, 3764-3776. 2011.

MACEDO, A.T.Z.N. **Fracionamento de Lactossoro de Ovelha por Tecnologias de Membranas e Estudo das Possíveis Utilizações dos Concentrados Obtidos.** Tese de Doutorado – Engenharia Agro-Industrial. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa, 2010.

MIZUBUTI, I.Y. **Soro de leite: composição, processamento e utilização na alimentação.** Semina: Ci. Agr., v. 15. Londrina, 1994.

MONTOYA, I.A.G. Cendón, T.S. Gallegos, S.A. Cruz, Q.R. **Lactoferrin a multiple bioactive protein: An overview.** ScienceDirect. Biochimica et Biophysica Acta. 2011: 1820; 226-236.

NÓBREGA, E. S.; VEREDAS, V.; OLIVEIRA, L. S.; SANTANA, C. C. **Separação e purificação da lactoperoxidase e da lactoferrina do soro do leite bovino por cromatografia de troca iônica em leito fixo.** In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 12, 2000.

NOPPE, W.; PLIEVA, F.M.; GALAEV, I.Y.; VANHOORELBEKE, K.; MATTIASSON, B.; DECKMYN, H. **Immobilised peptide displaying phages as affinity ligands Purification of lactoferrin from defatted milk.** Journal of Chromatography A, 1101, 79–85. 2006.

ORDÓÑEZ, J. A.; RODRIGUEZ, M. I. C; ALVAREZ, L. F.; SANZ, M. L. G.; MINGUILLON, G. D. G. F.; PERALES, L. De La H. P.; CORTECERO, M. D. S. **Tecnologia de Alimentos – Alimentos de origem animal.** Editora Artmed, Vol. 2. São Paulo, 2007.

PEREIRA, I.O. **Análise e otimização do processo de ultrafiltração do soro de leite para produção de concentrado proteico.** Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. UESB. Itapetinga, 2009.

RODRIGUES, E.; CASTAGNA, A. A.; DIAS, M. T.; ARONOVICH, M. **Qualidade do leite e derivados: processos, processamento tecnológico e índices.** Manual Técnico, 37. Niterói: Programa Rio Rural, 2013.

SAUFI, S.M.; FEE, C.J. **Simultaneous anion and cation exchange chromatography of whey proteins using a customizable mixed matrix membrane.** Journal of Chromatography A, 1218. 2011: 9003– 9009.

SAXENA, A.; TRIPATHI, B.P.; KUMAR, M.; SHAHI, V.K. **Membrane-based techniques for the separation and purification of proteins: An overview.** Advances in Colloid and Interface Science, 145. 2009: 1-22.

TOMITA, M.; WAKABAYASHI, H.; SHIN, K.; YAMAUCHI, K.; YAESHIMA, T.; IWATSUKI, K. **Twenty-five years of research on bovine lactoferrin applications.** ScienceDirect. Biochimie. 2009: 91; 52-57.

VEREDAS, V. **Purificação da α -lactoalbumina a partir do soro do leite em leite fixo e expandido de resinas.** Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia Química. UNICAMP. Campinas, 2000.

WOLMAN, F.J.; MAGLIO, D.G.; GRASSELLI, M.; CASCONI, O. **One-step lactoferrin purification from bovine whey and colostrum by affinity membrane chromatography.** Journal of Membrane Science, Vol. 288, No. 1-2, pp. 132-138. 2007