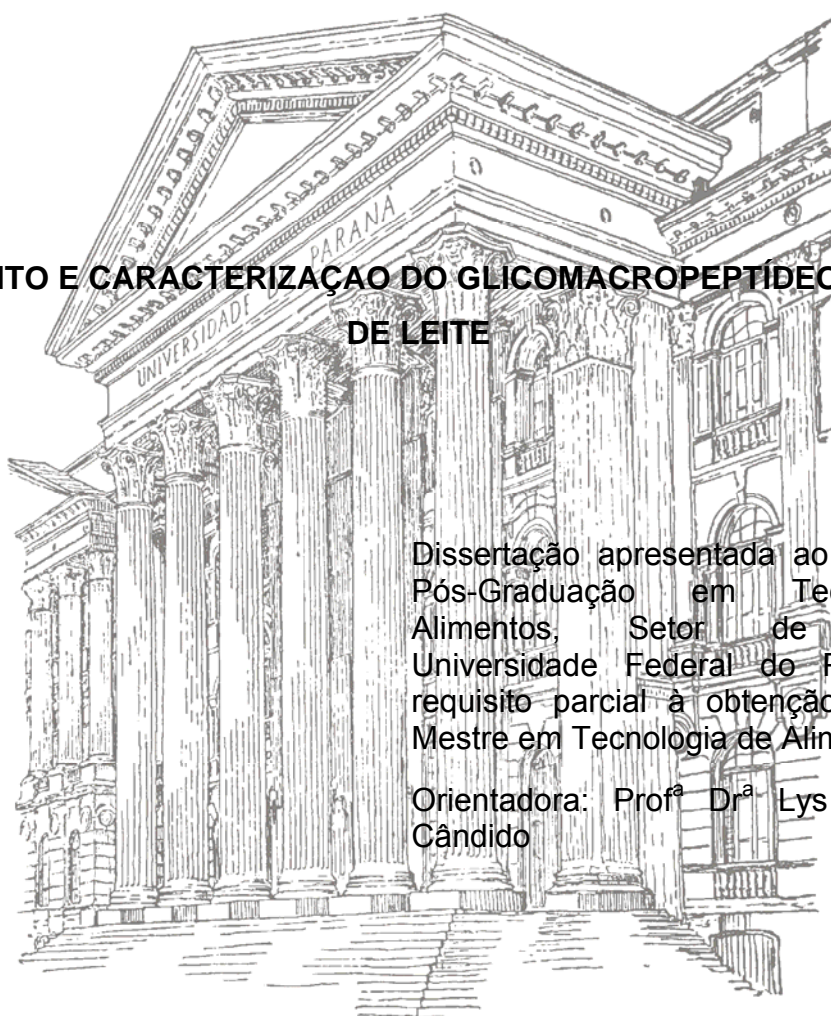


LINDAMIR TOMCZAK TULLIO

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO GLICOMACROPEPTÍDEO DO SORO
DE LEITE**



Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a Dr^a Lys Mary Bileski
Cândido

CURITIBA

2007

LINDAMIR TOMCZAK TULLIO

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO GLICOMACROPEPTÍDEO DO SORO
DE LEITE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a Dr^a Lys Mary Bileski
Cândido

CURITIBA

2007

DEUS,

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

AGRADECIMENTOS

À minha família – pais, por ter me ensinado o valor do estudo e a minhas irmãs, principalmente a Luciane que mesmo distante esteve sempre torcendo por mim.

À meu esposo Paulo pelo incentivo, carinho e compreensão sabendo entender a dedicação que foi necessária.

À Prof^ª Dr^a Lys Mary Bileski Cândido, por ter confiado a mim o desenvolvimento deste trabalho, pela amizade, conselhos e orientação sempre precisa;

Às Prof^{as} Dr^{as} Claudia C. Hecke Krüger e Agnes de Paula Scheer pelo aceite em participar da banca.

Aos Professores do Departamento de Nutrição da Universidade Federal do Paraná;

Ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos;

À Secretaria de Ciência e Tecnologia do Estado do Paraná, pelo apoio financeiro;

À Empresa Sooro, pelo fornecimento do soro utilizado;

À empresa Arla Foods Ingredients Ltda pelo fornecimento do produto denominado de Lacprodan® CGMP-10;

Ao amigo Jair José de Lima pela amizade e ajuda sempre que necessário;

A todas as pessoas que de alguma forma colaboraram com a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

***“A mente que se abre a uma nova idéia,
jamais volta ao seu tamanho original.”***

Albert Einstein

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 JUSTIFICATIVA	2
1.2 OBJETIVOS.....	3
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 SORO DE LEITE	4
2.1.1 Tipos de Soro de Leite	5
2.1.2 Composição do Soro de Leite	5
2.1.3 Aspectos Ambientais	6
2.1.4 Fracionamento do Soro	7
2.2 AS PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE.....	7
2.3 GLICOMACROPEPTÍDEO	10
2.3.1 Estrutura e Composição	10
2.3.2 Atividades Biológicas e Propriedades Nutricionais	14
2.3.3 Propriedades Funcionais Tecnológicas	16
2.3.4 Métodos de Isolamento e Purificação	18
2.3.5 Métodos de Quantificação e Caracterização	25
2.4 PROCESSOS DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS	28
2.4.1 Definição de Membrana	28
2.4.2 Classificação dos Processos de Separação por Membranas	29
2.4.3 “Fouling” e Polarização por Concentração	31
2.5 CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA	34
2.6 PRINCÍPIOS DA ELETROFORESE	34
2.7 LIOFILIZAÇÃO	35

3 MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1 MATERIA PRIMA E REAGENTES	36
3.1.1 Processo Industrial de Secagem do Soro	36
3.1.2 Reagentes	37
3.2 EQUIPAMENTOS	37
3.3 METODOLOGIA	38
3.3.1 Retenção de GMP pela Membrana de 30kDa em Função do pH	38
3.3.2 Isolamento do GMP por Ultrafiltração	38
3.3.2.1 Reconstituição do soro de leite em pó	38
3.3.2.2 Pré-tratamento do soro de leite em pó reconstituído	39
3.3.2.3 Ultrafiltração do soro de leite após tratamento térmico	40
3.3.3 Isolamento do GMP por Cromatografia de Troca-Iônica	42
3.3.4 Composição Físico-química dos Soros de Leite em Pó, do GMP Comercial e das Frações Obtidas nos Processos de Ultrafiltração e Cromatografia de Troca-Iônica	45
3.3.5 Determinação de Ácido Siálico nos Soros de Leite em Pó, no GMP comercial e das Frações Obtidas nos Processos de Ultrafiltração e Cromatografia de Troca-Iônica	46
3.3.6 Determinação de Lactose no Soro de Leite em Pó, no GMP Comercial e nos Retentados Liofilizados obtidos pelo Processo de Ultrafiltração em Membrana de 30kDa	47
3.3.7 Caracterização do GMP por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS/PAGE)	47
3.3.8 Caracterização do GMP por Cromatografia Líquida em Fase-Reversa (CLAE-FR)	48
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1 FATOR DE RETENÇÃO DO GMP PELA MEMBRANA DE 30kDa EM FUNÇÃO DO pH	49
4.2 COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS SOROS DE LEITE EM PÓ UTILIZADOS NO ISOLAMENTO DO GMP POR CROMATOLOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA E ULTRAFILTRAÇÃO	51

4.3 ISOLAMENTO DO GMP POR ULTRAFILTRAÇÃO UTILIZANDO TRATAMENTO TÉRMICO DO SORO DE LEITE A 80°C POR 15 E 30 MINUTOS	53
4.4 ISOLAMENTO DO GMP POR CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA .	65
5 CONCLUSÕES	71
CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
REFERÊNCIAS	73
ANEXO 1	81

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01	LOCAL DA AÇÃO DA QUIMOSINA NA κ -CASEÍNA	10
FIGURA 02	TÍPICO CROMATOGRAMA DO GMP	11
FIGURA 03	ESTRUTURA PRIMÁRIA DO GLICOMACROPEPTÍDEO....	13
FIGURA 04	CORRENTES NO PROCESSO DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS	29
FIGURA 05	REPRESENTAÇÃO DAS FILTRAÇÕES COM FLUXO NORMAL E COM FLUXO TANGENCIAL	33
FIGURA 06	TRATAMENTO TÉRMICO DO SORO DE LEITE	39
FIGURA 07	FLUXOGRAMA DO ISOLAMENTO DO GLICOMACROPEPTÍDEO DO SORO DE LEITE POR ULTRAFILTRAÇÃO COM TRATAMENTO TÉRMICO DO SORO POR 15 E 30 MINUTOS A 80°C	41
FIGURA 08	EQUIPAMENTO DE ULTRAFILTRAÇÃO UTILIZADO NO ISOLAMENTO DO GMP DO SORO DE LEITE	42
FIGURA 09	COLUNA UTILIZADA PARA O ISOLAMENTO DO GLICOMACROPEPTÍDEO POR CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA	43
FIGURA 10	FLUXOGRAMA DO ISOLAMENTO DO GLICOMACROPEPTÍDEO DO SORO DE LEITE POR CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA	44
FIGURA 11	FATOR DE RETENÇÃO DA MEMBRANA DE 30kDa EM DIFERENTES pHs	51
FIGURA 12	ASPECTO DAS FRAÇÕES LIOFILIZADAS OBTIDAS ATRAVÉS DO PROCESSO DE ULTRAFILTRAÇÃO EM MEMBRANAS DE 50 E 30 kDa	53
FIGURA 13	PERFIS ELETROFORÉTICOS EM SDS/PAGE DO SORO EM PÓ, DO SORO APÓS TRATAMENTO TÉRMICO E DAS FRAÇÕES LIOFILIZADAS OBTIDAS PELO MÉTODO DE ULTRAFILTRAÇÃO EM MEMBRANAS DE 50 E 30kDa.....	57
FIGURA 14	PERFIS ELETROFORÉTICOS EM SDS/PAGE DAS FRAÇÕES P50kDa, R30kDa, P ₂ 50kDa, R ₂ 30kDa LIOFILIZADAS OBTIDAS PELO MÉTODO DE ULTRAFILTRAÇÃO EM MEMBRANAS DE 50 E 30kDa E DO GMP COMERCIAL	57

FIGURA 15	PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM FASE REVERSA DA FRAÇÃO P ₂ 30kDa OBTIDA POR ULTRAFILTRAÇÃO DA FRAÇÃO P ₂ 50kDa EM MEMBRANA DE 30kDa	58
FIGURA 16	PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM FASE REVERSA DO PADRÃO DE ÁCIDO SIÁLICO	59
FIGURA 17	PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM FASE REVERSA DO GMP COMERCIAL	60
FIGURA 18	PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM FASE REVERSA DA FRAÇÃO R30kDa OBTIDA POR ULTRAFILTRAÇÃO DA FRAÇÃO P50kDa EM MEMBRANA DE 30kDa	60
FIGURA 19	PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM FASE REVERSA DA FRAÇÃO R ₂ 30kDa OBTIDA POR ULTRAFILTRAÇÃO DA FRAÇÃO P ₂ 50kDa EM MEMBRANA DE 30kDa	61
FIGURA 20	PORCENTAGEM DE RECUPERAÇÃO DE ÁCIDO SIÁLICO NAS FRAÇÕES ELUÍDAS DA COLUNA DE CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA	66
FIGURA 21	PORCENTAGEM DE RECUPERAÇÃO DE PROTEÍNA NAS FRAÇÕES ELUÍDAS DA COLUNA DE CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA	66
FIGURA 22	PERFIS ELETROFORÉTICOS EM SDS/PAGE DO GMP COMERCIAL E DA FRAÇÃO F4 OBTIDA POR CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA	68
FIGURA 23	PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM FASE REVERSA DA FRAÇÃO F4 OBTIDA POR CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA	69
FIGURA 24	PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM FASE REVERSA DO GLICOMACROPEPTÍDEO PADRÃO SIGMA	70

LISTA DE TABELAS

TABELA 01	CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DAS MAIORIAS DAS PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE	8
TABELA 02	COMPOSIÇÃO TEÓRICA DE AMINOÁCIDOS PRESENTES NO GLICOMACROPEPTÍDEO	12
TABELA 03	PROCESSOS DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS	30
TABELA 04	TEORES DE ÁCIDO SIÁLICO NOS VOLUMES TOTAIS DAS SOLUÇÕES INICIAIS DO GMP COMERCIAL, NOS RETENTADOS E PERMEADOS DA MEMBRANA DE 30kDa EM DIFERENTES pHs	49
TABELA 05	COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO SORO DE LEITE EM PÓ UTILIZADO PARA O ISOLAMENTO DO GMP POR CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA E POR ULTRAFILTRAÇÃO	52
TABELA 06	TEORES DE ÁCIDO SIÁLICO E PROTEÍNA NOS VOLUMES TOTAIS DO SORO INICIAL, DO SORO TRATADO POR 15 MINUTOS NA TEMPERATURA DE 80°C E DOS PERMEADOS E RETENTADOS DAS ULTRAFILTRAÇÕES EM MEMBRANAS DE 50kDa E 30kDa	54
TABELA 07	TEORES DE ÁCIDO SIÁLICO E PROTEÍNA NOS VOLUMES TOTAIS DO SORO INICIAL, DO SORO TRATADO POR 30 MINUTOS NA TEMPERATURA DE 80°C E DOS PERMEADOS E RETENTADOS DAS ULTRAFILTRAÇÕES EM MEMBRANAS DE 50kDa E 30kDa	55
TABELA 08	COMPOSIÇÃO CENTESIMAL EM BASE SECA DO GMP COMERCIAL E DOS RETENTADOS DE 30kDa LIOFILIZADOS DOS PROCESSAMENTOS REALIZADOS COM PRECIPITAÇÃO TÉRMICA DO SORO DE LEITE POR 15 E 30 MINUTOS	62
TABELA 09	MASSA DAS FRAÇÕES, TEOR DE ÁCIDO SIÁLICO(g/100g) E TEOR TOTAL(g) DE ÁCIDO SIÁLICO EM BASE SECA NAS FRAÇÕES R30kDa E R ₂ 30kDa	63

TABELA 10	TEORES DE ÁCIDO SIÁLICO (mg) E PROTEÍNA (g) NOS VOLUMES TOTAIS DO SORO INICIAL E DAS FRAÇÕES ELUÍDAS DA COLUNA DE CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA E RELAÇÃO ÁCIDO SIÁLICO/PROTEÍNA (mg/g)	65
-----------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E DE SIGLAS

pH	potencial hidrogeniônico
p.a.	pureza analítica
GMP	glicomacropéptido
CMP	caseinomacropéptido
CGMP	caseinoglicomacropéptido
CDP	peptídeo derivado da caseína
CMP _A	caseinomacropéptido variante A
CMP _B	caseinomacropéptido variante B
CMPs	caseinomacropéptidos
CLAE-FR	cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa
SDS/PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
κ-caseína	kappa-caseína
Asp	ácido aspártico
Thr	Treonina
Ser	Serina
Glu	ácido glutâmico
Gly	Glicina
Ala	alanina
Val	Valina
Met	Metionina
Ile	Isoleucina
Leu	Leucina
Tyr	Tirosina
Phe	Fenilalanina
His	Histidina
Lys	lisina
Arg	arginina
Pro	prolina
DBO	demanda bioquímica de oxigênio
pI	ponto isoelétrico
TCA	ácido tricloroacético
NaCl	cloreto de sódio
EDTA	ácido etileno diamino tetra acético
Gal	galactose
GalNac	n-acetilgalactosamina
NeuAc	ácido acetilneuramínico
kDa	quilo dalton
MF	microfiltração
UF	ultrafiltração
NF	nanofiltração
OI	osmose inversa
D	diálise
PG	permeação gasosa

PV	pervaporação
ED	eletrodialise
WPC	concentrado de proteína de soro
WPI	isolado de proteína de soro
t_r	tempo de retenção
mg	miligramas
μg	microgramas
Tris	tris-hidroximetilaminometano
r	fator de correlação
NNP	nitrogênio não-protéico

RESUMO

O glicomacropéptido (GMP) é um péptido de massa molecular de 7.000 daltons contendo 64 resíduos de aminoácidos (4 Asp, 11 Thr, 6 Ser, 10 Glu, 8 Pro, 1 Gly, 6 Ala, 1 Met, 7 Ile, 1 Leu e 3 Lys) e não apresenta aminoácidos sulfurados e aromáticos. Este péptido é conhecido por ser um composto bioativo e considerado um ingrediente potencial para alimentos funcionais e produtos farmacêuticos. Entre as atividades biológicas atribuídas ao GMP está a estimulação da colecistoquinina (um hormônio envolvido na ingestão de alimentos) liberado pelas células do intestino. Estudos *in vitro*, indicam que o GMP previne a adesão de bactérias cariogênicas, sugerindo a sua utilização em produtos para a higiene bucal. Devido à ausência de fenilalanina o seu uso como ingrediente em produtos alimentícios para pessoas portadoras de fenilcetonúria tem sido reportado. As características do GMP prometem não somente aplicação clínica e dietética, mas também apresenta um potencial elevado como agente estrutural do alimento, pois a sua estrutura glicosídica confere propriedades emulsificante e espumante. Os vários métodos para o isolamento e purificação do GMP utilizam, de forma isolada ou combinada, processos que podem ser classificados em três categorias: precipitação seletiva induzida por ajuste das propriedades físicas da solução; filtração por membrana baseada principalmente em diferenças de tamanho e carga; e adsorção seletiva. O objetivo principal deste trabalho foi isolar e caracterizar o GMP a partir do soro de leite, um subproduto da indústria de laticínios. Para isto foram utilizados dois métodos: ultrafiltração em membrana de 50 e 30kDa e cromatografia de troca-iônica. A fração isolada resultante da ultrafiltração apresentou teores em base seca de proteína de 60,01%±0,96; lactose 26,3%±0,75; cinzas 8,55%±0,02. A concentração de ácido siálico foi de 17µg/mg da fração obtida. O perfil eletroforético qualitativo mostrou três bandas distintas semelhantes ao GMP comercial. O perfil cromatográfico obtido por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) apresentou após os picos sobrepostos, como citado na literatura, outros três picos maiores, igualmente como no GMP comercial. O rendimento do processo foi de 63,33% se considerado o valor máximo de GMP por litro de soro (1,5g) e 79,17% se considerado o nível mais baixo reportado na literatura (1,2g), com a obtenção de 0,95g de GMP por litro de soro de leite. A fração obtida por cromatografia de troca-iônica apresentou concentração de ácido siálico de 113,50µg/mg da fração obtida. O perfil eletroforético qualitativo apresentou 3 bandas distintas, porém localizados em alturas diferentes quando comparado ao perfil eletroforético do GMP comercial. O perfil cromatográfico obtido por CLAE-FR diferiu do perfil obtido do GMP comercial, porém foi semelhante ao perfil do GMP padrão Sigma. O rendimento do processo foi de 92,67% com a obtenção de 1,39g de GMP por litro de soro de leite.

Palavras-chave: glicomacropéptido (GMP); soro doce; ultrafiltração; cromatografia de troca-iônica.

ABSTRACT

Glycomacropeptide (GMP) is a peptide with molecular weight of 7,000 daltons, presenting 64 amino acid residues (4 Asp, 11 Thr, 6 Ser, 10 Glu, 8 Pro, 1 Gly, 6 Ala, 1 Met, 7 Ile, 1 Leu and 3 Lys)) and lacking sulphurated and aromatic amino acids. This peptide is known for being a bioactive compound and is considered a potential ingredient for functional foods and pharmaceutical products. Biological activities attributed to GMP include stimulation of the release of cholecystokinin (a hormone involved in food ingestion) by enteric cells. Studies *in vitro* indicated that GMP prevents the adhesion of cariogenic bacteria, suggesting its use in products for mouth hygiene. Because of the absence of phenylalanine, its use as an ingredient in products for phenylketonuria patients has been reported. The characteristics of GMP not only promise medicinal and dietary applications, but also give the molecule a great potential as a structural agent for food, since its glycoside structure suggests emulsifying and foaming properties. The various methods for GMP isolation and purification use isolated or combined processes that can be classified into three categories: selective precipitation induced by adjustment of the physical properties of the solution; membrane filtration based mainly on differences in size and load, and selective adsorption. The main objective of this work was to isolate and characterize GMP obtained from milk whey, a by-product of the dairy industry. Two methods were used: ultrafiltration in 50 and 30kDa membranes and ion-exchange chromatography. The fraction isolated by ultrafiltration resulted in a protein content of $60.01\% \pm 0.96$, $26.3\% \pm 0.75$ of lactose and $8.55\% \pm 0.02$ ashes (all expressed in dry basis). The sialic acid concentration was of $17\mu\text{g}/\text{mg}$. The qualitative electrophoretic profile showed three distinct bands, similar to commercial GMP. The chromatographic profile, obtained by reverse phase high performance liquid chromatography, presented three higher peaks after superposed peaks, which is consistent with literature and with the profile of commercial GMP. The yield was of 63.33% when considering the maximum GMP per liter of whey (1.5g) and 79.17% when considering the lowest value reported in literature (1.2g), with obtention of 0.95g of GMP per liter of milk whey. The fraction obtained by ion-exchange chromatography presented sialic acid concentration of $113.50\mu\text{g}/\text{mg}$. The qualitative electrophoretic profile showed three distinct bands, however located in different heights when compared to commercial GMP. The chromatographic profile, obtained by reverse phase high performance liquid chromatography, differed from commercial GMP, however it was similar to the profile obtained for a GMP standard (Sigma). The yield of the process was of 92.67%, with obtention of 1.39g of GMP per liter of milk whey.

Key words: glycomacropeptide (GMP); sweet whey; ultrafiltration; ion-exchange chromatography.

1 INTRODUÇÃO

De acordo com projeções do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2007), para o agronegócio mundial e para o Brasil, entre os derivados do leite, o queijo é o que apresenta o maior volume de produção. A produção mundial deverá aumentar de 16,5 milhões de toneladas em 2005 para 19 milhões em 2015.

Consulta ao ANUÁRIO MILKBIZZ (2005) revela que o Brasil produziu 480 mil toneladas de queijo durante o ano de 2005, ficando atrás somente da União Européia e dos Estados Unidos.

A quantidade de soro gerada no processo de fabricação de queijo é função do tipo de queijo produzido e das técnicas de fabricação empregadas, mas em média, para a fabricação de um quilo de queijo necessita-se de dez litros de leite e são recuperados de nove a 12 litros de soro (RICHARDS, 1997).

Durante muito tempo o soro foi considerado um resíduo industrial ou produto com valor comercial residual, descartado em cursos de água ou incorporado em rações para animais. Felizmente, esta abordagem vem sendo abandonada e, dadas às suas excelentes propriedades biológicas, tecnológicas e nutricionais, cada vez mais o soro de leite é tratado como um produto com elevado valor agregado.

Nas três últimas décadas foram desenvolvidos processos de separação que permitiram obter ingredientes alimentares com alto teor protéico a partir do soro de leite.

As proteínas do soro de leite bovino estão entre as mais equilibradas fontes de aminoácidos da dieta humana; sendo descritas muitas atividades biológicas, essenciais para o desenvolvimento harmonioso do neonato, com repercussões benéficas também no ser humano.

As proteínas do soro podem ser usadas numa grande variedade de aplicações na indústria de alimentos por oferecerem uma série de benefícios funcionais e tecnológicos, entre os quais: solubilidade, viscosidade, emulsificação e geleificação.

As principais proteínas do soro são: α -lactalbumina, β -lactoglobulina, imunoglobulina e o glicomacropéptido (GMP). Em menor quantidade, mas com

aplicações comerciais importantes estão a lactoferrina e lactoperoxidase (DOULTANI; TURHAN; ETZEL, 2004).

O GMP, encontrado no soro doce (produzido pela coagulação enzimática da caseína), é um componente biologicamente ativo liberado a partir da κ -caseína pela ação da quimosina no elo peptídico Phe₁₀₅-Met₁₀₆, durante a fabricação do queijo. Devido às suas funções biológicas, grande atenção tem sido dada às técnicas de isolamento e purificação do GMP, sendo considerado um ingrediente potencial para o desenvolvimento de alimentos funcionais. Como o GMP contendo resíduos de aminoácidos 106-169 não contém aminoácidos aromáticos, também pode ser utilizado em alimentos para o tratamento da fenilcetonúria, um importante erro inato do metabolismo da fenilalanina, pois o GMP é uma das únicas proteínas naturais livres deste aminoácido (NAKANO et al., 2002).

O GMP pode ser isolado tendo como materiais de partida a caseína, os caseinatos tanto de cálcio como de sódio, tratados com quimosina e também o soro de queijo, produzido por coagulação enzimática. Este último constitui uma opção muito atrativa para o aproveitamento deste subproduto da indústria de laticínios.

1.1 JUSTIFICATIVA

O GMP é um peptídeo que apresenta diversas atividades biológicas e propriedades funcionais tecnológicas e pode ser obtido a partir de um subproduto da indústria de laticínios: o soro do leite. Tem seu emprego como ingrediente em formulações isenta de aminoácidos aromáticos, e no desenvolvimento de alimentos funcionais. Desta forma, o isolamento do GMP, proposto neste trabalho, pode ser visto como uma importante contribuição ao aproveitamento de resíduos industriais e para a disponibilidade de ingrediente de alto valor agregado até o momento não produzido no mercado nacional.

1.2 OBJETIVOS

Objetivo Principal:

Isolar e caracterizar o GMP do soro de leite.

Objetivos Secundários:

- Determinar a composição físico-química do soro de leite em pó (matéria-prima);
- Determinar a composição físico-química de uma amostra de GMP comercial;
- Determinar o fator de retenção do GMP pela membrana de 30kDa em pHs 3, 5 e 7;
- Isolar o GMP do soro de leite por ultrafiltração em membrana de 50 e 30kDa;
- Isolar o GMP do soro de leite por cromatografia de troca-iônica;
- Analisar físico-quimicamente o GMP obtido por ultrafiltração;
- Caracterizar o GMP isolado por ultrafiltração e cromatografia de troca-iônica por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS/PAGE), comparativamente a um GMP comercial;
- Caracterizar o GMP isolado por ultrafiltração e cromatografia de troca-iônica por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR), comparativamente a um GMP comercial.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Proteínas são componentes essenciais a todas as células vivas e estão relacionadas, praticamente, a todas as funções fisiológicas. São utilizadas na regeneração dos tecidos; funcionam como catalisadores nas reações químicas que ocorrem nos organismos vivos e que envolvem enzimas ou hormônios; são necessárias nas reações imunológicas e, com os ácidos nucleicos, são indispensáveis nos fenômenos de crescimento e reprodução. Os vegetais são capazes de sintetizar proteínas a partir de fontes inorgânicas de nitrogênio, mas os animais não possuem essa capacidade, por isso necessitam de alimentos ricos em proteínas e aminoácidos (BOBBIO e BOBBIO, 1992).

As fontes principais de proteínas que entram na alimentação humana são de duas origens: vegetal e animal. As fontes convencionais de proteína animal são o leite e seus derivados, ovos e os vários tipos de carnes. Como fontes de proteína vegetal têm-se principalmente os grãos, de cereais e leguminosas (SGARBIERI, 1996).

De acordo com SGARBIERI (2005), o leite apresenta 3,5% de proteínas as quais podem ser classificadas em quatro grupos, de acordo com suas propriedades físico-químicas e estruturais: caseínas, proteínas do soro, proteínas das membranas dos glóbulos de gordura, enzimas e fatores de crescimento. Do ponto de vista nutritivo e industrial, as caseínas e as proteínas do soro são as proteínas do leite de mais ampla aplicação e valor econômico.

2.1 SORO DE LEITE

O soro de leite é o principal subproduto da indústria de laticínios, e pode ser definido como o líquido remanescente quando a caseína é removida do leite por coagulação ácida ou enzimática (SGARBIERI, 1996).

De acordo com RICHARDS (1997), a quantidade de soro gerado no processo de fabricação de queijo é função do tipo de queijo produzido e das técnicas de fabricação empregadas, mas em média, para a fabricação de um quilo de queijo

necessita-se de dez litros de leite e, dependendo da água utilizada na fábrica, recuperam-se de nove a 12 litros de soro.

Segundo BORGES et al. (2001), devido ao elevado teor de água, o uso do soro em produtos alimentares convencionais tem sido bastante limitado, porém quando desidratado pode ser utilizado em produtos de panificação, chocolates, doces e confeitos, suplementos alimentares, leites modificados, produtos alimentares infantis, sorvetes e massas entre outros.

Dados de SOORO (2007) revelam que o consumo total nacional de soro de leite em pó é de 62 mil toneladas por ano. A produção nacional é de 22 mil toneladas por ano, sendo necessárias com isto, a importação de cerca de 40 mil toneladas de soro de leite em pó por ano.

2.1.1 Tipos de Soro de Leite

Conforme SGARBIERI (1996), quando a precipitação das caseínas é realizada em pH 4,6 o soro é denominado de ácido, mas quando a coagulação ocorre enzimaticamente, entre pH 5,9 e 6,3 - o soro produzido é chamado de doce. O soro doce contém maior quantidade de peptídeos e aminoácidos livres resultantes da ação da enzima sobre a caseína.

GIROTO (2001) relata que o soro doce provém da manufatura de queijos de coagulação enzimática, tais como: minas frescal, mussarela, prato, cheddar, suíço e outros; enquanto que o soro ácido provém de queijos de coagulação ácida (queijos tipo: cottage, quarq e requeijão cremoso).

2.1.2 Composição do Soro de Leite

Conforme SCOTT (1989) citado por FARRO (2003) o soro de leite contém quase metade dos nutrientes originais do leite, sendo rico em componentes não caseínicos, tais como proteínas do soro, vitaminas hidrossolúveis, minerais e lactose, porém não contém quantidades significativas de lipídeos ou vitaminas lipossolúveis.

O soro de leite possui em sua composição 6,9% de sólidos totais, sendo 0,6% de sais minerais, 0,3% de gordura, 0,9% de proteínas, 5% de lactose e 0,1% de ácido láctico resultante da fermentação da lactose (RICHARDS, 2002).

2.1.3 Aspectos Ambientais

A diversidade das atividades industriais ocasiona durante o processo produtivo, a geração de resíduos sólidos, líquidos e gasosos os quais podem poluir e contaminar o solo, a água e o ar, sendo preciso observar que nem todas as indústrias geram resíduos com poder impactante nesses três ambientes.

Segundo VON SPERLING (2005), a matéria orgânica é avaliada de uma maneira global, indiretamente por meio do parâmetro denominado demanda bioquímica de oxigênio (DBO), que determina a quantidade de oxigênio dissolvido necessário para degradar biologicamente certa quantidade de matéria orgânica contida em uma amostra de efluente líquido.

Conforme ALMEIDA (2004), tem havido uma preocupação cada vez maior com relação aos problemas ambientais associados às atividades industriais. Os órgãos ambientais das esferas federais, estaduais e municipais têm procurado fazer cumprir as leis de controle de emissão de poluentes pelas indústrias, e estas, por sua vez vêm buscando alternativas para se adequar às normas impostas pela legislação ambiental.

A DBO dos despejos pode ser superior à dos esgotos domésticos, caracterizando-os como despejos predominantemente orgânicos e tratáveis por processos biológicos ou inferior à dos esgotos domésticos, despejos não predominantemente orgânicos (VON SPERLING, 2005).

De acordo com RICHARDS (2002), o soro é um potente agente de poluição que pode provocar a destruição da flora e da fauna devido à sua alta DBO que é de cerca de 30.000 a 50.000mg de oxigênio por litro de soro. Este valor é aproximadamente 100 vezes superior ao de um esgoto doméstico. Uma fábrica com produção média de dez mil litros de soro por dia polui o equivalente a uma população de 5.000 habitantes.

ALMEIDA (2004) relata que no Brasil, as indústrias produtoras de queijo, em geral, são de pequeno porte, não dispendo de meios econômicos ou tecnológicos

para o aproveitamento do soro. Neste caso, este rejeito pode ser considerado um poluente extremamente problemático, devido à sua carga orgânica e grande volume gerado, devendo ser tratado antes de ser descartado.

2.1.4 Fracionamento do Soro

Hoje o desenvolvimento de mercados utilizando o soro de leite em pó e frações do soro como ingredientes nos gêneros alimentícios para consumo humano e animal, transformou o então subproduto em um produto valioso para a indústria de laticínios.

Conforme GEAFILTRATION (2006) ao invés da produção de soro comum pode-se instalar uma planta de ultrafiltração onde grandes quantidades de soro estão disponíveis. O soro pode ser separado em duas frações. O retentado da ultrafiltração, para produção de WPC (concentrado de proteínas de soro em graus diferentes de 35, 60 ou 80%) ou mesmo WPI (isolado de proteína de soro com conteúdo de proteína superior a 90% em base sólida) e um permeado. Este permeado pode ser evaporado posteriormente para produzir lactose em graus diferentes e também durante o processo é possível retirar o fosfato de cálcio.

2.2 AS PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE

O soro de leite contém uma mistura de várias proteínas (Tabela 01). São na sua maioria proteínas globulares que conferem muitas das suas propriedades funcionais. Algumas das suas funções biológicas estão identificadas, outras emergem, outras, porém ainda estão por serem descobertas.

TABELA 01 - CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DA MAIORIA DAS PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE

PROTEÍNAS DO SORO	CONCENTRAÇÃO (g/L)	MASSA MOLECULAR (Da)	PONTO ISOELÉTRICO
β -Lactoglobulina (monômero)	2,7	18.362	5,2
α -Lactalbumina	1,2	14.147	4,5 - 4,8
Imunoglobulinas	0,65	150.000-1.000.000	5,5 - 8,3
Albumina de Soro Bovino	0,4	69.000	4,7 - 4,9
Lactoferrina	0,1	78.000	9,0
Lactoperoxidase	0,03	89.000	9,5
Glicomacropéptido	1,2 - 1,5	7.000	<3,8

FONTE: Adaptado de ZYDNEY (1998).

Nos próximos parágrafos serão abordados alguns aspectos biológicos e estruturais das principais proteínas do soro de leite.

A β -lactoglobulina corresponde a aproximadamente 50% do conteúdo protéico do soro, tornando-se com isso a mais abundante do soro de leite bovino. Tem na sua estrutura primária 162 aminoácidos, ponto isoelétrico (pI) 5,2 e massa molecular de 18.362Da. SIMPSON e NICHOLAS (2002) sugeriram que a β -lactoglobulina é a responsável pelo transporte da vitamina A ao longo do trato digestivo de recém-nascidos. Em solução, com pH entre 3,5 e 5,2 esta proteína associa-se para formar octâmeros. Quando o pH é superior ao pI, a forma predominante passa a ser a dimérica. Entretanto, quando $3,5 > \text{pH} > 6,5$ as formas multiméricas começam a dissociar-se devido a repulsões eletrostáticas (PESSEN, PURCELL e FARRELL, 1985).

Conforme BURRINGTON (2002) a α -lactalbumina representa cerca de 20-25% do total das proteínas do soro. É uma pequena e compacta metaloproteína (14.147Da) com 123 aminoácidos, sendo rica em lisina, leucina, treonina, triptofano e cistina. A principal atividade biológica conhecida da α -lactalbumina é como modulador da síntese da lactose nas glândulas mamárias. A α -lactalbumina pode

ser empregada como uma fonte de proteína para alimentos infantis e para o desenvolvimento de outros produtos para pessoas com limitada ou restrita admissão de proteína.

A lactoferrina compõe aproximadamente 1 a 2% das proteínas do soro. Possui uma cadeia de 689 aminoácidos e uma massa molecular de 78.000Da. Segundo SGARBIERI (2005), entre as funções biológicas desta proteína está a capacidade de fixação do Fe^{+3} . Em virtude desta habilidade exerce atividade bacteriostática contra organismos patogênicos Fe-dependentes do leite, bem como no intestino de animais que ingerem o leite. Em nível intestinal exerce ainda função inumoestimulatória e age como fator de crescimento e maturação dos enterócitos.

A lactoperoxidase compõe aproximadamente 0,5% das proteínas do soro. Em termos estruturais trata-se de uma cadeia polipeptídica de 612 aminoácidos com uma massa molecular de 89.000Da. KUSSENDRAGER e VAN HOOIJDONK (2000), na sua revisão sobre lactoperoxidase, realçam a aplicação desta proteína como um anti-microbiano natural em produtos alimentares e não alimentares. Estudos clínicos têm sustentado a possibilidade de que o acúmulo de placa dentária, gengivite e o início da cárie podem ser reduzidos por preparações apropriadas de lactoperoxidase, inclusive com algumas preparações protegidas por patentes (TIMMER, 2004).

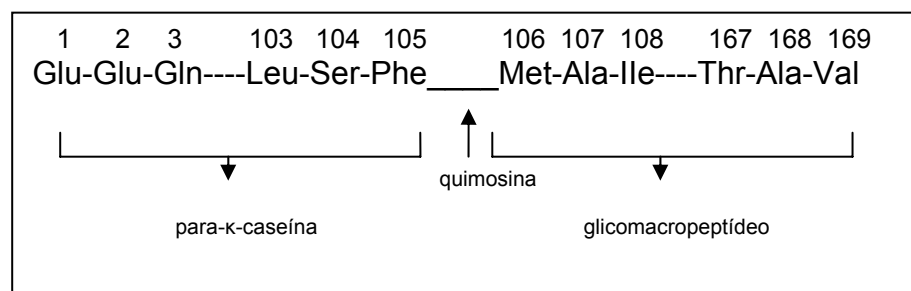
O GMP é um peptídeo terminal de 64 aminoácidos com cerca de 10% de sua massa em sacarídeos e é considerada a fração mais importante sob o ponto de vista do trabalho em questão. É inexistente no soro ácido e representa cerca de 15 a 25% das proteínas do soro doce. Por não conter fenilalanina é uma fonte desejável de nitrogênio nas dietas especiais formuladas para pacientes com fenilcetonúria (BURRINGTON, 2002). Na sua revisão sobre as atividades biológicas do GMP, BRODY (2000), destaca a proteção contra toxinas, bactérias, vírus e a regulação do sistema imunológico como as áreas mais promissoras no estudo deste peptídeo.

2.3 GLICOMACROPEPTIDEO

2.3.1 Estrutura e Composição

O GMP é um peptídeo heterogêneo de 64 aminoácidos, formado pela clivagem da caseína, por ação da quimosina durante a fabricação do queijo. A enzima ocasiona a ruptura do enlace Phe₁₀₅-Met₁₀₆, da κ -caseína, provocando a desestabilização e desnaturação das micelas de caseína, levando à formação de dois peptídeos. Um deles composto pelos resíduos de aminoácidos 1 a 105, chamado de para- κ -caseína e que permanece nas micelas de caseína; o outro formado pelos resíduos 106 a 169, que por carrear todos os açúcares da κ -caseína, é conhecido como glicomacropéptideo (NAKANO e OZIMEK, 1998, 2000). A Figura 01 representa o local da ação da quimosina na κ -caseína.

FIGURA 01 – LOCAL DA AÇÃO DA QUIMOSINA NA κ -CASEÍNA



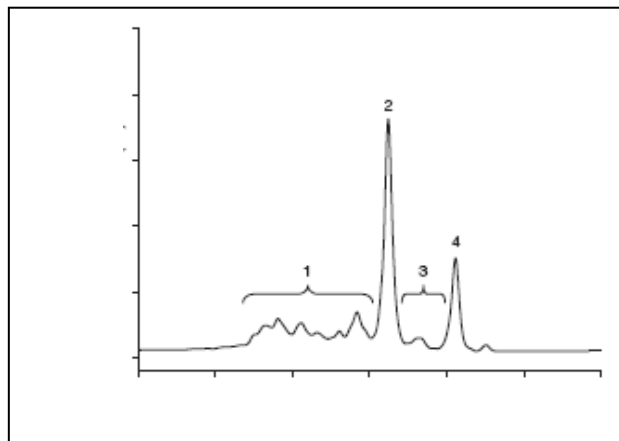
FONTE: FENNEMA (2000).

GMP é um dos inúmeros nomes para o peptídeo resultante da quebra da κ -caseína. O peptídeo é também conhecido como caseinomacropéptideo (CMP), caseinoglicomacropéptideo (CGMP) ou peptídeo derivado da caseína (CDP). Devido a este fato, nesta revisão será conservada a nomenclatura com que os autores denominam este peptídeo. Geralmente, costuma-se denominar GMP a forma glicosilada, devido a seu elevado conteúdo de carboidrato e CMP a forma não-glicosilada do peptídeo. Sua composição é variada e depende particularmente da fonte do soro e da tecnologia empregada para o seu isolamento (MARTÍN-DIANA et al., 2006).

A forma glicosilada representa entre 50-60% do CMP total e é composta por Gal (galactose), GalNAc (N-acetilgalactosamina) e NeuAc (ácido acetilneuramínico) (THOMÄ, KRAUSE e KULOZIK, 2006). Entre estes, predomina o NeuAc conhecido como ácido siálico. Segundo IJIMA et al. (2004), o ácido siálico ocupa a posição terminal de muitos glicoconjugados incluindo glicoproteínas e glicolípídeos. De acordo com MARTÍN-DIANA, PELAEZ e REQUENA (2003), o GMP purificado ao nível de 90% é altamente glicosilado com 7 a 8% de ácido siálico.

Analisando os números no cromatograma da Figura 02, os picos 2 e 4 são formas não-glicosiladas da variante A e B, respectivamente. Estas formas são predominantemente espécies monofosforiladas, mas pequenas somas de formas di e tri fosforiladas também estão presentes. O pico 3 refere-se principalmente formas monoglicosiladas da variante B dominada por tetra e trissacarídeos e o pico 1 corresponde a misturas complexas de formas mono, di e oligoglicosiladas das variantes A e B (THOMÄ-WORRINGER, SORENSEN e LÓPEZ-FANDINÕ, 2006).

FIGURA 02 – TÍPICO CROMATOGRAMA DO GMP



FONTE: THOMÄ-WORRINGER, SORENSEN e LÓPEZ-FANDINÕ, 2006

NOTAS: Pico 1 - CMP glicosilado variante A e B, Pico 2 - CMP não-glicosilado variante A, Pico 3 - CMP monoglicosilado variante B, Pico 4 - CMP não-glicosilado variante B.

O GMP está presente no soro de leite na concentração de 1,2-1,5g/L, é rico em aminoácidos de cadeia ramificada (valina e isoleucina) e livre de aminoácidos aromáticos incluindo a fenilalanina, o triptofano e a tirosina (OLIVA; ESCOBAR e PONCE, 2002).

Estes mesmos autores informam que pela característica ausência de aminoácidos aromáticos, o GMP não apresenta absorção a 280nm e sabe-se que é detectado somente na faixa de 205 a 217nm; diferenças na absorção em 210/280nm são frequentemente utilizadas para caracterizar o GMP.

Na Tabela 02 pode-se observar a composição teórica de aminoácidos encontrados no GMP.

TABELA 02 - COMPOSIÇÃO TEÓRICA DE AMINOÁCIDOS PRESENTES NO GLICOMACROPEPTÍDEO

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

FONTE: CHU; MACLEOD e OZIMEK (1996).

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

Vários trabalhos informam que a massa molecular teórica do GMP está entre 7 e 8kDa. Alguns autores sugerem que o GMP tem a habilidade de se associar/dissociar sob determinadas condições de pH. KAWASAKI et al. (1993a) propõem que o monômero de κ -caseína GMP de massa molecular 9kDa é obtido em $\text{pH} \leq 4$ e o polímero de κ -caseína GMP de massa molecular entre 45-50 kDa é obtido em pH acima de 4.

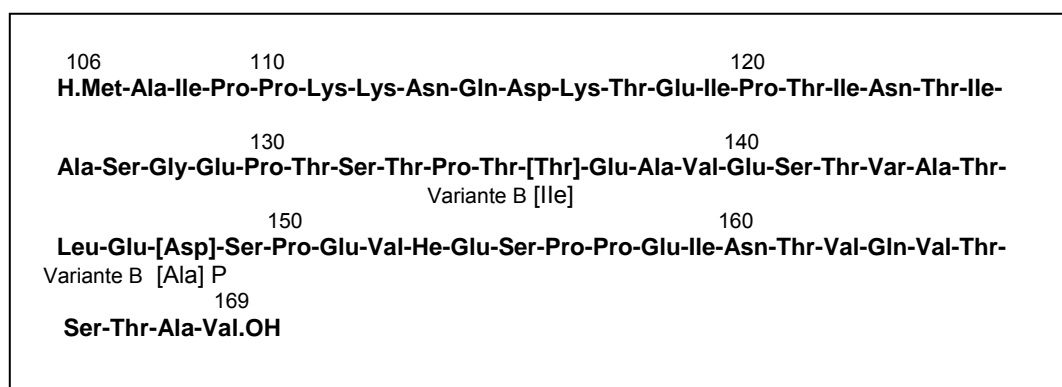
Em 1998, NAKANO e OZIMEK propuseram um estudo para estabelecer a massa molecular do GMP e se esta era influenciada pelo pH. Utilizando cromatografia em gel de Sephacryl S-200 coletaram frações que eram monitoradas

em ácido siálico. Os resultados sugeriram que o GMP compreende um agregado de três monômeros sendo que a massa molecular não era afetada pela mudança do pH.

Atualmente existe um consenso geral de que a massa molecular experimental é maior do que a massa molecular teórica. MIKKELSEN et al. (2005) demonstraram em seus estudos que a massa molecular experimental do CMP é maior que a teórica devido à agregação de monômeros de CMP de massa molecular de 7kDa. Os autores sugerem que o CMP pode se agregar em até 4 monômeros que são resistentes a mudança de pH; a formação e conformação destes agregados são influenciadas por propriedades do CMP na κ -caseína e que o CMP ligado a κ -caseína é reversivelmente influenciada pelo pH.

MOLLÉ e LÉONIL (2005) relatam que o CMP apresenta três sítios potenciais de fosforilação e seis de glicosilação e pode apresentar quatro variantes genéticas (A, B, C e E). As formas A e B são mais comuns em leite bovino e são representadas como CMP_A e CMP_B e diferem em dois aminoácidos: na posição 136 a variante A possui treonina e a B isoleucina; já na posição 148, a variante A tem um resíduo de ácido aspártico enquanto a variante B possui um resíduo de alanina (OLIVA; ESCOBAR e PONCE, 2002). Na Figura 03 é apresentada a estrutura primária do GMP.

FIGURA 03 – ESTRUTURA PRIMÁRIA DO GLICOMACROPEPTÍDEO



FONTE: BRODY (2000).

2.3.2 Atividades Biológicas e Propriedades Nutricionais

Atualmente várias atividades biológicas e fisiológicas têm sido atribuídas ao GMP, por isso muita atenção tem sido dada ao seu isolamento e purificação. Muitos estudos nos últimos dez anos têm tentado estabelecer o potencial do GMP e de sua forma não glicosilada, CMP, na regularização das funções intestinais (KORHONEN e PIHLANTO, 2006).

LIESKE, KONRAD e KLEINSCHMIDT (2004) estudando a influência do pH e do aquecimento no isolamento do CMP do soro por ultrafiltração concluíram que o CMP torna-se cada vez mais sensível ao calor em pH ácido enquanto o aquecimento em pH neutro produz negligenciáveis mudanças na ligação peptídeo-ácido siálico e assim um alto grau de atividade biológica é conseguida.

Na sua revisão sobre as atividades biológicas do GMP, BRODY (2000), destaca a proteção contra toxinas, bactérias, vírus e regulação do sistema imunológico como as áreas mais promissoras no estudo deste peptídeo.

OLIVA, ESCOBAR e PONCE (2002) relatam várias atividades biológicas atribuídas ao CMP, dentre as quais: efeito na mobilidade gastrointestinal; inibição da ligação da toxina colérica com seu receptor, inibição da hemaglutinina do vírus da gripe, efeito sobre o crescimento de bactérias ácido lácticas, efeitos sobre a digestão, promoção do crescimento de Bifidobactérias e atividade antitrombótica.

As estruturas glicosídicas do GMP são importantes para a sua atividade biológica (AIMUTES, 2004). KAWASAKI et al. (1992) concluíram em seu estudo que o efeito inibitório do GMP sobre a toxina da cólera parece ser atribuído ao ácido siálico terminal.

O GMP também tem mostrado proteção às células de infecções pelo vírus da gripe. KAWASAKI et al. (1993b) demonstraram inibição de 4 espécies de vírus humanos da gripe sendo este efeito notado com pequenas concentrações de GMP (80mg/L).

Esforços em pesquisa têm sido realizados com peptídeos bioativos do leite focalizando a inibição de cariogênicos, inibição da desmineralização do esmalte dos dentes e subsequente remineralização. AIMUTIS (2004) observou que o GMP apresentou inibição ao crescimento da bactéria cariogênica *Streptococcus mutans* e

de outras espécies. Reforça que as estruturas glicosídicas unidas ao GMP são importantes para as numerosas atividades bioativas do peptídeo, incluindo a anticariogênica. O GMP apresentou atividade inibitória da desmineralização do esmalte dos dentes e também foi observada a promoção de sua remineralização.

Este mesmo autor enaltece o uso de peptídeos bioativos na produção de produtos comerciais tais como creme dental, géis e enxaguante bucal; dentre os quais se podem citar uma formulação para remineralização dos dentes onde a mistura contendo GMP e xilitol é protegida pela patente U.S. 6.207.138; um produto para uso oral contendo o antibactericida GMP, um surfactante aniônico e um hidrolisado protéico como estabilizador é descrito na patente U.S. 5.741.773 e também a patente U.S. 5.853.704 onde uma formulação de um dentifício anticárie multicomponente composto por uma fonte de íons fluoreto e GMP que quando combinados demonstra realçar a remineralização dos dentes (ZHANG e GAFFAR, 2001, 1998a e 1998b).

Também foi evidenciado que o CMP inibiu a secreção gástrica e diminuiu as contrações estomacais. GMP diminuiu o apetite de cães (STAN et al., 1983). Autores sugerem que o CMP estimula a liberação da colecistoquinina, um hormônio envolvido no controle da ingestão e digestão de alimentos no duodeno de animais e humanos (KORHONEN e PIHLANTO, 2006). Examinando a influência do GMP no ganho de peso de ratos tratados com isolado protéico de soro (controle), isolado protéico de soro+10%GMP, isolado protéico de soro+20%GMP e caseína; resultados demonstraram uma significativa redução no ganho de peso de ratos tratados com GMP em relação ao grupo controle, com uma redução de 9% da gordura visceral nos ratos tratados com isolado protéico de soro+20%GMP em relação ao controle (MCINTOSH, ROYLE e CLIFTON, 2005). Baseado nestes estudos, produtos comerciais contendo CMP podem ser desenvolvidos para o controle do apetite e manutenção do peso.

No entanto, GUSTAFSON et al. (2001) em estudo com humanos avaliou o efeito do CMP na saciedade e satisfação pela medida da soma de alimentos consumidos na refeição e através de motivação subjetiva em um questionário alimentar. Bebidas foram preparadas contendo 0,4% de CMP; 2,0% de CMP; somente o veículo constituído dos seguintes ingredientes: aspartame, ácido cítrico, ácido málico, água, saborizante de frutas, corante vermelho e um agente para

conferir opalescência imitando a aparência da proteína naquelas bebidas que não a continham e água contendo corante e o agente. Sob as condições experimentais, os pesquisadores concluíram que o CMP não teve efeito no peso de alimentos consumidos no almoço ou durante o dia. O CMP também não teve efeito no indicador subjetivo da saciedade e a admissão de CMP antes do almoço não teve efeito no regulamento de alimentos consumidos ao longo de um curto período de tempo.

Mas, ANDERSON e MOORE (2006) sugerem que antes de concluir que o CMP não contribui para a saciedade em humanos, estudos com doses mais elevadas de CMP devem ser avaliados, já que no estudo anterior foram administradas às pessoas avaliadas bebidas contendo 0,4g ou 2,0g de CMP.

Além das atividades biológicas mencionadas acima, o GMP apresenta propriedades nutricionais especiais. É rico em aminoácidos de cadeia ramificada e pobre em metionina, podendo ser utilizado como ingrediente em dietas para pacientes que sofrem de doenças hepáticas (THOMÄ-WORRINGER, SORESEN e LÓPEZ-FANDINÓ, 2006).

Extraordinariamente, o fato do CMP não conter aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano) sugere o seu uso como ingrediente em dietas para pessoas portadoras de fenilcetonúria (OLIVA, ESCOBAR e PONCE, 2002).

O GMP também é reconhecido por aumentar a absorção de minerais como o cálcio, ferro e zinco. KELLEHER et al. (2003) em seus estudos concluíram que suplementação com GMP aumentou a absorção de zinco, permitindo com isto a redução na concentração deste mineral em fórmulas infantis.

2.3.3 Propriedades Funcionais Tecnológicas

O desenvolvimento de alimentos inovadores e com o adicional benefício à saúde é um dos alvos do processamento para a indústria alimentícia. As características do CMP prometem não somente aplicações medicinal e dietética, mas também apresentam um potencial elevado no uso como um agente estrutural do alimento, pois a sua estrutura glicosídica confere propriedades emulsificante e espumante (KULOZIK e GUILMINEAU, 2003).

O GMP é um peptídeo ácido com pI entre 4 e 5, altamente solúvel e estável ao calor (THOMÄ-WORRINGER, SORENSEN e LÓPEZ-FANDINÓ, 2006).

O GMP apresentou-se solúvel ao longo da faixa de pH estudada (1-10), com solubilidade mínima (88%) na faixa entre pH 1-5 e máxima (98%) entre pH 5-10. A atividade emulsificante foi mais pronunciada em pH ácido do que em pH alcalino. Após estocagem por 24 horas e aquecimento da emulsão, um decréscimo da atividade emulsificante (22-60%) foi observado nos pHs abaixo de 4 (CHOBERT et al., 1989).

MARTÍN-DIANNA et al. (2006) estudaram as propriedades viscoelásticas do CMP isolado do soro de leite em diferentes pHs (2, 4, 7 e 10), força iônica (0; 0,2; 0,4 e 0,7M em NaCl) e concentração de proteína (50, 100 e 200gkg⁻¹) em temperaturas de 10 a 90°C e concluíram que a melhor condição para manter valores constantes da viscosidade relativa com o aumento da temperatura acima de 75°C é em pH 7. Com alta concentração de proteína (200gkg⁻¹) mudanças reológicas ocasionadas pelo calor ocorrem em temperaturas moderadas (40-50°C) com diferença não considerável na viscosidade.

Determinando a funcionalidade, capacidade espumante e a atividade emulsificante do GMP após a conjugação com ácidos graxos, WONG, NAKAMURA e KITTS (2006) concluíram que a capacidade espumante foi perdida, mas a atividade emulsificante foi realçada.

A adição de CMP em leites fermentados de cabra favoreceu a formação de um gel mais ordenado e estruturado comparado à adição de concentrado protéico de soro (MARTÍN-DIANA, PELAEZ e REQUENA, 2003).

No entanto, VEITH e REYNOLDS (2004) em seu trabalho concluíram que a presença de CMP mostrou ser prejudicial para a força do gel e para capacidade de retenção de água.

Por outro lado, MARTÍN-DIANA, FRIAS e FONTECHA (2005) estudaram CMPs de três diferentes espécies (bovino, ovino e caprino) e concluíram que os CMPs mostraram atividade emulsificante mais estável à variação de pH em relação ao concentrado protéico de soro, sugerindo a possibilidade da utilização de CMP como emulsificante em alimentos que sofrem grande variação de pH durante o processamento, como por exemplo em produtos lácteos fermentados.

CMP obtido de leite de ovelha foi modificado com lactose através da reação de Maillard sob umidade relativa de 44% e 40°C por períodos de 0-11 dias, obtendo com isto diferentes formas de CMP lactosilados. Cerca de 55-60% do CMP foi lactosilado sob estas condições com a forma monolactosilada mais abundante, seguida pelas espécies di, tri e tetralactosilada. Solubilidade, estabilidade ao calor e capacidade emulsificante do CMP nativo e modificado foram investigadas. A lactosilação melhorou a atividade emulsificante, mas não modificou a ótima solubilidade e estabilidade ao calor do CMP nativo (MORENO, LÓPEZ-FANDINÓ e OLANO, 2002).

2.3.4 Métodos de Isolamento e Purificação

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

A seguir serão apresentados os vários métodos encontrados neste trabalho de revisão para o isolamento e purificação do GMP e que utilizam de forma isolada ou combinada processos que podem ser classificados em três categorias principais:

- 1) precipitação seletiva induzida por ajuste das propriedades físicas da solução (aquecimento, precipitação alcoólica, precipitação com ácido trifluoracético, precipitação com ácido acético);

- 2) filtração por membrana baseada principalmente em diferenças de tamanho e carga (diálise, ultrafiltração, microfiltração, osmose inversa, eletrodialise) e

- 3) adsorção seletiva (cromatografia de troca iônica).

Através da patente U.S. 4.042.575, EUSTACHE (1977) propôs um método de extração de glicoproteínas e ácido siálico do soro. Até então a ultrafiltração não era usada para separação e obtenção de proteínas específicas. A patente relata em detalhes o processo que em resumo compreende: ultrafiltração do soro, floculação térmica das proteínas do retentado da ultrafiltração, tratamento fosfotúngstico do

sobrenadante obtido da floculação térmica, hidrólise ácida do precipitado e tratamento do sobrenadante hidrolisado para a extração do ácido siálico. De acordo com este processo pode-se obter 13g de ácido siálico extremamente puro partindo de 900 litros de soro de leite.

Após isolamento por diálise, MORR e SEO (1988) purificaram o GMP a partir de caseinato de sódio e de hidrolisado de leite desnatado, utilizando três técnicas cromatográficas: a cromatografia de exclusão (coluna de Sephadex G-10 e G-25), cromatografia de troca-iônica (coluna de DEAE-Sephadex) e cromatografia de afinidade (coluna de Con A-Sepharose). Análises por cromatografia líquida de alta eficiência, mostraram um pico com massa molecular de 33kDa e a eletroforese revelou um grupo de peptídeos com tamanho heterogêneo com massa molecular menor e igual a 18kDa.

O processo descrito por TANIMOTO et al. (1991) e que consta nas patentes E.P. 0 393 850 A2 de 1990 e U.S. 5.075.424 de 1991, sustenta a produção de GMP onde a solução contendo o peptídeo é ajustada a $\text{pH} < 4$, seguido por ultrafiltração em membrana de 10-50kDa e concentração do filtrado obtido em membrana de "cut off" menor do que 50kDa para a obtenção do concentrado dessalinizado. De acordo com os inventores, o GMP assim produzido pode ser utilizado na indústria de alimentos. KAWASAKI et al. (1993a) conseguiram um produto purificado utilizando este método com um conteúdo de fenilalanina de 0,6% (p/p) e pureza de 81%.

O método patenteado por DOSAKO, NISHIYA e DEYA (1991) em U.S. 5.061.622 revela um processo eficiente para produção em escala industrial de GMP com pureza mínima de 80%, conteúdo de ácido siálico mínimo de 5% e conteúdo de cinzas acima de 10%. Qualquer material de partida como caseína ácida, caseinato de sódio ou caseinato de cálcio podem ser utilizados. A produção é realizada abaixando o pH do efluente livre das proteínas do soro e lactose para remover fosfato de cálcio por centrifugação ou filtração. Após dessalinização do efluente por troca-iônica, eletrodialise ou osmose inversa o mesmo é então concentrado utilizando evaporação a vácuo. Quando se utiliza membrana de osmose inversa a concentração e a dessalinização podem ser realizadas ao mesmo tempo, informa o autor.

De acordo com KAWASAKI e DOSAKO (1991) o método patenteado em EP0488589A1 propõe um processo para produção GMP onde o material é colocado

em contato com um trocador iônico, seguido pela coleta da fração que não é adsorvida no trocador. Após o ajuste do pH desta fração para valor inferior a 4 e tratamento por ultrafiltração com membrana de 10-50kDa é obtido o permeado. Este permeado é então ultrafiltrado em membrana abaixo da massa molecular do GMP. O produto apresenta pureza entre 55 e 88%.

Um novo método de isolamento de CMP do soro de leite foi proposto por SAITO, YAMAJI e ITOH (1991) onde os autores reconstituindo soro em pó (10% v/v) ajustaram o pH para 6 e seguiram o seu aquecimento por uma hora a 98°C. Após precipitação a frio com etanol (50% v/v) o precipitado foi separado por centrifugação. O sobrenadante foi aplicado a uma coluna de DEAE-Toyoperarl 650M. A eluição foi realizada com solução de bicarbonato de amônio 0,3mol/L e a fração obtida apresentou rendimento de 1,1g de CMP por 100g de soro em pó.

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

Na patente WO 94/159242, NIELSEN e TROMHOLT (1994) revelam um método de produção de GMP utilizando soro como material de partida usando ultrafiltração em membrana de 16-20kDa, aquecimento do retentado por 15 minutos, ajuste do pH de 4 a 5, filtração e coleta do GMP do filtrado. Com este processo a pureza do GMP foi de 70% e o conteúdo de fenilalanina é 1/3 do conteúdo do material de partida, mas a concentração exata de fenilalanina não foi informada. O autor afirma que o GMP assim produzido pode ser utilizado em alimentos para fins especiais.

Investigando a viabilidade de produzir o GMP a partir do caseinato de sódio por ultrafiltração, CHU, MACLEOD e OZIMEK (1996) testaram combinações de membranas de ultrafiltração: a) 50 e 10kDa; b) 30 e 10kDa e c) 10kDa. Os retentados das ultrafiltrações em membranas de 30 e 50kDa resultaram em uma maior recuperação de GMP, com 50,9% da proteína recuperada no retentado de 30kDa sendo GMP.

BERROCAL e NEESER (1998) no processo de produção de GMP relatado na patente U.S. 5.216.129, as proteínas do concentrado protéico de soro parcialmente

livres de lactose são floculadas, resultando em um precipitado e um primeiro sobrenadante. Este sobrenadante é coletado, concentrado por ultrafiltração produzindo um retentado. O retentado é tratado com etanol, que enriquece a solução em GMP por precipitação de quase todas as proteínas solúveis residuais. O sobrenadante é coletado e então seco. Partindo de vinte quilos de concentrado protéico de soro disperso em 180 litros de água, através deste método obteve-se 290g de GMP que contém 10,9% de ácido siálico e 8,4% de proteína.

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

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

Separação de imunoglobulina G e GMP do soro de leite foram investigadas por XU et al. (2000) através da cromatografia de troca-aniônica utilizando a resina IRA93 e a membrana Amicon YM100. Pelo fato do GMP ser eletronegativamente carregado em pH 4,7 a resina IRA93 adsorveu o GMP do soro de leite.

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

Os inventores da patente U.S. 6.462.181 B1, HOST e CHATTERTON (2002) aperfeiçoaram o processo de preparação do GMP citado em EP 0393850, dos autores TANIMOTO et al (1990), ajustando o pH do material de partida (concentrado protéico de soro), para abaixo de 4 seguido por ultrafiltração a frio e concentração do material de partida em uma membrana especial, que mostrou uma boa estabilidade mecânica, após um ano de uso com produção de 24 horas durante sete dias por semana. O processo de acordo com os presentes inventores pode ser usado em escala industrial sem problemas de “fouling”. Segundo estes autores a temperatura afeta a retenção; comprovam isto realizando dois experimentos com e sem aquecimento onde o conteúdo de NNP (=GMP+protease peptona) é aumentado de 24,6% para 30,7% quando se utilizada a filtração a frio proporcionando ainda, maior durabilidade à membrana.

Os autores DOULTANI, TURHAN e ETZEL (2003) em seu trabalho demonstraram também a viabilidade do uso de dois trocadores de íons de polaridade oposta em série para simultânea recuperação de isolado protéico de soro e GMP usando um único fluido de soro. Para recuperação do isolado protéico de soro foi utilizada uma coluna empacotada com um trocador de cátions (SP Sepharose Big Beads da Amersham Biosciences) e para a recuperação do GMP uma coluna empacotada com um trocador de ânion (Q Sepharose Big Beads da Amersham Biosciences). As colunas cromatográficas foram eluídas com tampões baratos e de grau alimentício e recuperaram 92% da maioria das proteínas do soro e 96% do GMP.

Tentando purificar o GMP a partir de solução hidrolisada de caseinato pela quimosina, NAKANO e OZIMEK (2000) utilizaram processos envolvendo: a) cromatografia de exclusão com Sephacryl S-200 em pH 7, para obter a fração bruta de GMP; b) adição de solução ácida, pH 3,5 no GMP bruto para precipitar contaminantes proteínas e/ou peptídeos e c) re-cromatografia do material solúvel na solução ácida em Sephacryl S-200 em pH 3,5. A preparação foi considerada de alta pureza com composição de aminoácidos mostrando apenas traços de arginina, histidina, fenilalanina e tirosina. No mesmo ano, os referidos autores, purificaram o GMP de frações não dialisadas de soro doce utilizando a cromatografia de interação hidrofóbica em coluna de fenil-agarose. A fração de GMP obtida foi aproximadamente 1,6 g/L de soro doce.

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

NAKANO et al. (2002) purificaram GMP do soro doce com indetectável nível de fenilalanina por desproteínização do soro doce com ácido trifluoroacético seguido por cromatografia em Sephacryl S-200. O GMP assim obtido foi considerado pelos pesquisadores de alta pureza, com análise de aminoácidos apresentando indetectáveis níveis de fenilalanina, tirosina e arginina e massa molecular correspondente a 31kDa.

VASBINDER, ROLLEMA e KRUIF (2003) utilizaram precipitação com ácido acético/acetato de sódio e precipitação com ácido tricloroacético (TCA) em concentrações de 2%, 8% e 12%, para isolar o GMP. Obtiveram cromatogramas por cromatografia líquida de alta eficiência com forma e posição idênticos tanto no sobrenadante do isolamento com ácido acético/acetato de sódio como no sobrenadante resultante da precipitação com TCA 2%. Entretanto, concentrações crescentes de TCA provocaram um decréscimo nas áreas observadas. O GMP não-glicosilado variante B desaparece completamente após precipitação com TCA 8% e 12%. Parte do GMP não-glicosilado variante A precipita quando se utiliza TCA 8% e praticamente desaparece com TCA 12%. Com o aumento da concentração de TCA, a área total diminui de 60 a 80%, quando se utiliza TCA 8% e 12%, respectivamente, comparada com TCA 2%.

Comparando o perfil cromatográfico do GMP isolado por três métodos: fracionamento com TCA, precipitação com etanol e ultrafiltração utilizando isolado protéico de soro, LI e MINE (2004) concluíram que o pré-tratamento com TCA recuperou somente GMP glicosilado e eliminou todas as outras proteínas, no entanto, a taxa de recuperação foi baixa, somente 6,7% do GMP do concentrado protéico de soro inicial foi recuperado. Precipitação etanólica recuperou 20,4% do GMP do concentrado protéico de soro inicial e desta porcentagem, 75,7% correspondendo ao GMP na sua forma glicosilada. Ultrafiltração foi o método mais efetivo para a recuperação do GMP, com taxa de 33,9% de recuperação e 81,6% de GMP recuperado apresentando-se na sua forma glicosilada.

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

Pesquisando um novo método para separar CMP das proteínas do soro, TOLKACH e KULOZIK (2005) incluíram um pré-tratamento do concentrado protéico de soro com enzima transglutaminase seguida por microfiltração. A seqüência de aminoácidos do CMP inclui dois resíduos de glutamina e três de lisina pelos quais esse peptídeo é ligado a transglutaminase, enquanto as proteínas do soro mostram menor sensibilidade em se ligar a essa enzima devido a sua estrutura globular. O CMP ligado covalentemente pode ser removido por meio de microfiltração. De seus estudos, concluíram que parece que o CMP é um bom substrato para a enzima

transglutaminase e que especificamente se liga a proteínas ou peptídeos entre seus resíduos de glutamina e lisina.

De acordo com TOLKACH e KULOZIK (2005), atualmente há dois principais métodos para separar o GMP das outras proteínas do soro por ultrafiltração. O primeiro método foi descrito por KAWASAKI et al. (1993a) e revela a heterogeneidade do GMP em relação a sua massa molecular com a variação do pH, podendo-se adequar o uso de membranas de ultrafiltração com poros de maior ou menor massa molecular, possibilitando aumentar o fluxo operacional.

O segundo método foi descrito por MARTÍN-DIANA e FONTECHA (2002) se baseia na estabilidade térmica do CMP em comparação com as outras proteínas do soro. Este processo inclui acidificação, aquecimento e ultrafiltração do soro de leite para obter um CMP em pó com conteúdo de proteínas de 75 a 79%. Estes autores recuperaram o CMP de concentrado protéico de soro de bovino, ovino e caprino em taxas que variaram de 71 a 76% e pureza de 75 a 90%. Conforme esta técnica, o tratamento a quente do soro a 90°C por 1h leva a uma completa desnaturação e agregação das proteínas do soro. As proteínas desnaturadas podem ser removidas por centrifugação a 5200g e 4°C por 15 minutos e o sobrenadante contendo o CMP pode ser concentrado por ultrafiltração com membrana de 10kDa. A desvantagem deste método é que parte das proteínas do soro perde sua funcionalidade devido à desnaturação.

2.3.5 Métodos de Quantificação e Caracterização do GMP

Conforme THOMÄ, KRAUSE e KULOZIK, (2005) o GMP é geralmente quantificado por cromatografia de alta eficiência em fase reversa e cromatografia de troca iônica, quer catiônica, quer aniônica.

THOMÄ-WORRINGER, SORENSEN e LÓPEZ-FANDINÕ (2006) informam que devido a heterogeneidade do GMP os vários métodos de cromatografia líquida de alta eficiência baseadas em exclusão molecular, troca iônica ou separação em fase reversa e os inúmeros métodos publicados de eletroforese capilar de zona que têm sido propostos para a análise de GMP, não revelam completamente a imagem do GMP, embora a cromatografia líquida em fase reversa seja capaz de oferecer um

cromatograma com várias informações detalhadas, especialmente quando é acoplada a um espectrômetro de massa.

Embora a resolução do CMP_A seja baixa quando se utiliza cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa é possível ser analisado quando se faz o acoplamento de um espectrômetro de massa com ionização eletrospray (ESI-MS) (MOLLÉ e LÉONIL, 2005).

Muitos métodos são utilizados no intuito de verificar mudanças que possam ocorrer na estrutura em determinadas condições como, por exemplo, no estudo dirigido por SMITH et al. (2002) que buscaram verificar mudanças na estrutura do CMP_A , CMP_B não glicosilado e CMP_A monoglicosilado utilizando espectroscopia de ressonância nuclear magnética em pH neutro e ácido.

Diversos métodos de determinação quantitativa indireta do CMP foram propostos, alguns destes métodos são baseados na determinação de ácido siálico.

Um destes métodos foi proposto por WARREN (1959) onde na análise com o ácido tiobarbitúrico, o ácido siálico é o primeiro a sofrer oxidação, resultando na formação de ácido β -formilpirúvico. Este reage com o ácido tiobarbitúrico formando um composto rosa com o máximo de absorvância a 549nm. O composto é instável em solução aquosa, mas com extração em ciclohexano aperfeiçoa a estabilidade e intensifica a cor. Porém, este autor discute em seu trabalho, que várias substâncias reagem com o ácido tiobarbitúrico formando cromóforos interferentes, resultando falsa leitura a 549nm.

Com a finalidade de detectar a presença de GMP como marcador de adulteração de leite com soro, o qual se passa quase imperceptível quando agregado ao leite devido as suas propriedades coligativas similares, GALINDO-AMAYA, VALBUENA-COLMENARES e ROJAS-VILLARROEL (2006) padronizaram a detecção de GMP utilizando a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio, conhecida pela sigla SDS-PAGE. O GMP foi isolado mediante precipitação com TCA em concentrações de 24 e 50%; tratamento com etanol-éter e resuspensão em tampão Tris-HCl 0,05M, EDTA 1mM, pH 7,2 em amostras de soro doce, soro ácido, leite cru recém ordenhado, misturas de leite/soro, leites pasteurizado e leite em pó. Os precipitados analisados por esta técnica evidenciaram um trímero de 20,9kDa em amostras de soro doce e misturas

de leite/soro e ausentes em amostras de soro ácido e leite cru. Os resultados obtidos indicaram que a investigação de GMP em leite, representa um parâmetro específico e sensível para detectar o grau de adulteração do leite com soro ao nível de 1%, o qual não pode ser revelado analisando os parâmetros físico-químicos do leite.

No Brasil, o Ministério da Agricultura, através da Portaria nº124 de 23/09/91 (BRASIL, 1991) aprovou dois métodos analíticos de detecção de soro em leite, um quantitativo através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação de GMP e outro qualitativo, baseado na determinação de ácido siálico, denominado de método da ninhidrina ácida.

O método da ninhidrina ácida para a determinação espectrofotométrica quantitativa do ácido siálico livre ou ligado à glicoproteína de leite fluido e do soro, na região do visível, a 470nm, se mostrou exato, preciso e sensível a pequenas variações (ao redor de 2%) (FUKUDA et al., 1994).

Em 1996, estes mesmos autores consideraram que um leite que apresentasse concentração de ácido siálico até 5,14µg/mL, poderia ser considerado sem adição de soro. Acima deste valor poderia ser suspeito (até 10,64µg/mL) ou positivo para adição de soro.

No ano de 2004, FUKUDA, ROIG e PRATA estudaram a correlação existente entre o método da ninhidrina ácida com o método de cromatografia líquida de alta eficiência, método oficial para quantificação do GMP. Em diversas circunstâncias amostrais (leite cru e leite adicionado intencionalmente com soro em diferentes proporções), os métodos se correlacionaram, apresentando, para um intervalo de confiança de 95%, um coeficiente de correlação (r) igual a 0,981, quando no método de ninhidrina ácida se utilizou a desproteinização do leite com TCA na concentração final de 12%. Quando se alterou a concentração final de TCA para 10% e 8%, foram obtidos valor de r iguais a 0,992 e 0,993, respectivamente.

2.4 PROCESSOS DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS

A história desta tecnologia começou nos anos 60, quando Maubois, Mocquot e Vassalo propuseram o uso do processo de ultrafiltração para concentrar os principais componentes do leite. Esse processo tornou-se mundialmente conhecido como MMV em razão das iniciais dos nomes de seus idealizadores.

Graças a esta tecnologia avanços significantes foram conseguidos na indústria de queijos, incluindo melhoria em eficiência da planta, aumento no rendimento do queijo, desenvolvimento de processos contínuos e criação de variedades novas de queijos (MAUBOIS, 2002).

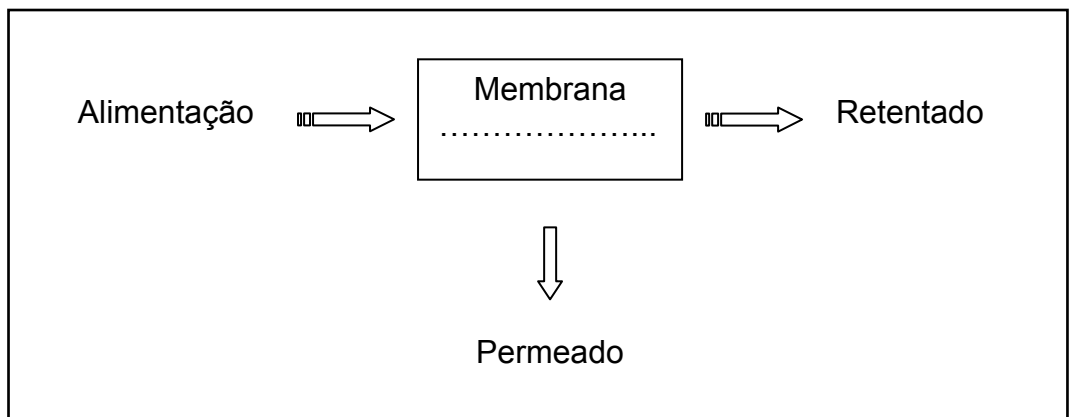
Os processos de separação por membranas desde as últimas décadas vêm sendo empregados em diferentes áreas industriais, proporcionando as seguintes vantagens: baixos consumos energéticos, não requerem aditivos químicos, são sistemas compactos e de fácil "scale-up", apresentam a possibilidade de emprego em sistemas contínuos e podem ser combinados com outros processos de separação. São exemplos de aplicações já estabelecidas a separação de proteínas, a clarificação de líquidos, a concentração de produtos e a esterilização a frio (KELLY et al., 2000).

2.4.1 Definição de Membrana

Uma membrana pode ser definida como uma barreira semipermeável, que separa duas fases e restringe o transporte de uma ou várias espécies químicas de maneira específica. O transporte de espécies selecionadas pela membrana é conseguido através da aplicação de uma força motriz através da membrana. Esta pode resultar de gradientes de pressão, concentração, potencial elétrico ou temperatura (SEADER e HENLEY, 1998).

O processo de separação por membranas é caracterizado pelo fato da corrente de alimentação originar duas correntes, a do retentado (concentrado) e a do permeado, o que implica que ou a corrente do concentrado ou a do permeado será o resultado da separação (produto). A Figura 04 ilustra o processo de separação por membranas.

FIGURA 04 – CORRENTES NO PROCESSO DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS



FONTE: A AUTORA.

As membranas normalmente são especificadas através de sua massa molecular de corte ou “cut off”. O “cut off” de uma membrana é definido como sendo a massa molecular da proteína globular que é 90% retida pela membrana (NOBLE e STERN, 1995) ou 95% como citado por GEAFILTRATION (2006).

2.4.2 Classificação dos Processos de Separação por Membranas

A classificação dos processos de separação por membranas mais importantes, assim como a força motriz que transporta a espécie selecionada pela membrana, os materiais que são retidos e os que permeiam e algumas de suas aplicações podem ser contemplados na Tabela 03.

TABELA 03 – PROCESSOS DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS

PROCESSO DE SEPARAÇÃO	FORÇA MOTRIZ	MATERIAL RETIDO	MATERIAL QUE PERMEIA	APLICAÇÕES
Microfiltração (MF)	Gradiente de pressão 01-1 bar	Material em suspensão, bactérias. PM > 0,6µm (>500kDa)	Água e sólidos dissolvidos	Clarificação. Filtração estéril.
Ultrafiltração (UF)	Gradiente de pressão 0,5-5 bar	Colóides, macromoléculas. 0,1 – 0,01µm (1.000 – 500.000Da)	Água, sais solúveis de baixa massa molecular	Fracionamento e concentração de proteínas. Recuperação de pigmentos. Recuperação de óleos.
Nanofiltração (NF)	Gradiente de pressão 1,5-40 bar	Moléculas de massa molecular média. 0,1-0,001 µm (100-1000Da)	Água, sais e moléculas de baixa massa molecular.	Separação de compostos orgânicos pequenos e sais divalentes.
Osmose Inversa (OI)	Gradiente de pressão 20-100bar	Todo material solúvel ou em suspensão. < 0,001 µm (< 100Da)	Água	Dessalinização e desmineralização de água. Concentração de suco de frutas.
Diálise (D)	Gradiente de concentração	Moléculas de PM > 5000Da	Íons e orgânicos de baixa massa molecular	Separação de micro solutos e sais monovalentes.
Permeação gasosa (PG)	Gradiente de pressão e concentração	Gás menos permeável	Gás mais permeável	Separação de misturas de gases.
Pervaporação (PV)	Gradiente de concentração	Líquido menos permeável	Líquido mais permeável	Separação de misturas de líquidos voláteis.
Eletrodialise (ED)	Gradiente de potencial elétrico	Macromoléculas e compostos não-iônicos	Íons	Separação de íons da água e solutos não iônicos.

FONTE: Adaptado de TEIXEIRA (2001).

A osmose inversa, a ultrafiltração, a microfiltração e a nanofiltração são rotineiramente utilizadas em inúmeras aplicações na da indústria de laticínios, onde se tornou parte importante do processo de produção especialmente na manufatura de ingredientes lácteos. As aplicações podem ser diferenciadas em três categorias: aplicações com leite, aplicações com soro de leite e outras aplicações lácteas (GEAFILTRATION, 2006).

A diafiltração é um processo de ultrafiltração onde o retido é diluído com água e recirculado no sistema de filtração permitindo obter um produto com maior concentração de proteínas (LIPNIZKI, 2005).

Conforme este mesmo autor, para a aplicação de ultrafiltração com diafiltração a fonte de alimentação deve ser separada em um retentado com significativo nível de solutos de alta massa molecular e um permeado que seja quase 100% livre de solutos de alta massa molecular. Para realizar isto, a ultrafiltração é comumente composta de três estágios:

- 1) Um estágio de pré-concentração realizando similar concentração do componente de baixa massa molecular no retentado e permeado;
- 2) Diafiltração para purificar o retentado por adição de água e
- 3) Concentração final para maximizar a concentração do soluto de alta massa molecular no retentado.

2.4.3 “Fouling” e Polarização por Concentração

Nos processos de separação comandados por diferenciais de pressão, é observado um declínio progressivo no fluxo do permeado com o tempo, à pressão constante. A polarização por concentração, o “fouling”, também conhecido como bolo ou torta (MOSQUEDA-JIMENEZ e HUCK, 2006) e a consolidação desta camada de “fouling” são fenômenos distintos e interligados e que limitam o transporte do solvente.

Segundo MARSHALL e DAUFIN (1995) citado por BASSETTI (2002), no início do processo a queda brusca do fluxo deve-se, basicamente, à polarização por concentração, isto é, ao desenvolvimento de um gradiente de concentração dos solutos na interface membrana/solução. A polarização por concentração não pode

ser evitada, mas seu efeito na redução do fluxo pode ser minimizado pelo aumento da velocidade de escoamento.

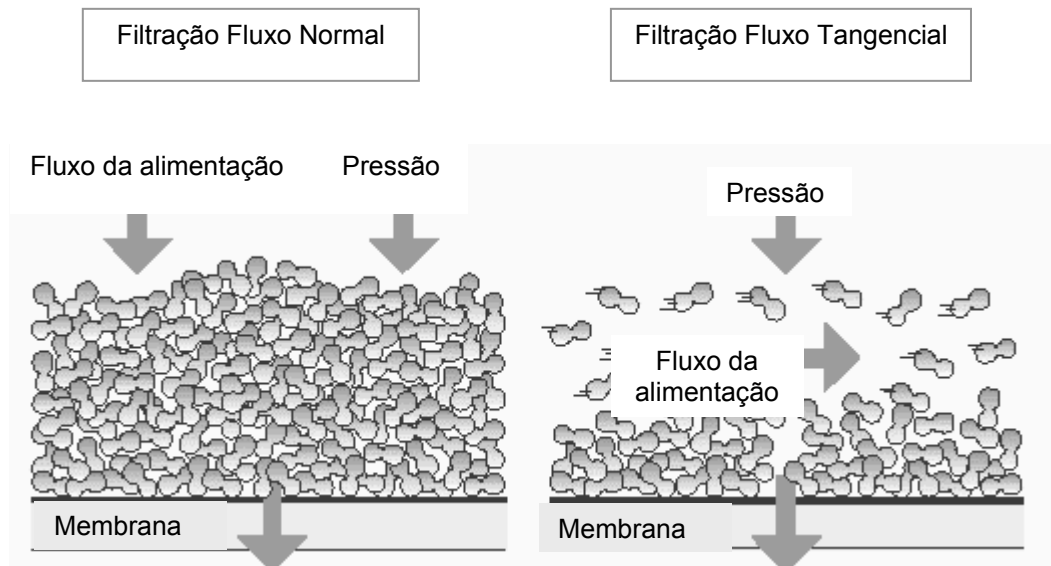
Num segundo estágio, estes mesmos autores descrevem que o declínio do fluxo continua devido ao efeito conhecido como “fouling” que é o acúmulo de materiais depositados na membrana durante a fase da polarização por concentração, que inicialmente, causa um aumento da concentração dos solutos na superfície da membrana. A redução do fluxo devido ao “fouling” é inevitável, sendo necessário interromper o processo para o procedimento de limpeza com agentes químicos.

Ao final do processo, o fluxo declina lentamente devido à deposição e acúmulo de partículas na superfície da membrana e à cristalização de solutos muito pequenos sobre a superfície e interior dos poros, levando a incrustação da membrana e conseqüentemente a consolidação do “fouling”.

Segundo PAULSON, WILSON e SPATZ (1984) citado por BASSETTI (2002) até o ano de 1970, o processo de separação por membranas só era utilizado na forma de filtração convencional (com fluxo normal), onde o fluido a ser filtrado escoava perpendicularmente à superfície filtrante. Com isso, os sólidos suspensos retidos na membrana formavam uma torta que crescia rapidamente, diminuindo a taxa de filtração. Nesse processo de separação, existem somente duas correntes, a da entrada e a de saída. Após este período, os sistemas de fluxo tangencial foram introduzidos em escala industrial, pois são mais eficientes. O escoamento do fluido é paralelo à área da membrana, minimizando a formação da torta sobre a membrana, o que a altas velocidades, possibilita o arraste dos solutos que tendem a acumular sobre a superfície. Porém, este arraste não evita a formação do efeito da polarização por concentração.

As duas formas de filtração podem ser observadas na Figura 05.

FIGURA 05 - REPRESENTAÇÃO DAS FILTRAÇÕES COM FLUXO NORMAL E COM FLUXO TANGENCIAL



FONTE: GEAFILTRATION, 2006.

Entretanto, quando o fenômeno do “fouling” é muito complexo os procedimentos existentes e que podem ser utilizados para a minimização deste problema, citados por MOSQUEDA-JIMENEZ e HUCK (2006) são: pré-tratamento da solução de alimentação, modificações no processo e limpeza da membrana.

Segundo LAWRENCE et al., (1998) substituições de membranas geralmente correspondem a 25 a 40% do custo da planta, entretanto depois de uso ininterrupto as membranas precisarão ser substituídas eventualmente. A redução do tempo e/ou da concentração de certas substâncias químicas utilizadas para a limpeza é um modo de aumentar tempo de vida das membranas assim como a introdução de pré-tratamentos da solução de alimentação.

De acordo com CARVALHO (2003) uma limpeza eficiente, primeiramente elimina os resíduos do produto pouco aderido com bastante água. Em seguida, detergentes alcalinos a base de hidróxido de sódio (0,1–0,5%) são aplicados para a remoção de resíduos orgânicos como proteínas e gorduras. Os ácidos nítrico e fosfórico são utilizados para a remoção de compostos minerais que se precipitam dentro dos poros da membrana, como os sais de cálcio. Os compostos de cloro (100-200mg/L) são utilizados como sanitizantes e agentes de dilatação dos poros da

membrana, promovendo arraste do material alojado dentro dos poros. Proteases, lípases ou detergentes enzimáticos são utilizados muitas vezes para suplementar ou substituir os detergentes alcalinos.

2.5 CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA

A cromatografia de troca iônica compreende duas etapas: a adsorção e a dessorção. Na etapa da adsorção a solução tampão contendo a proteína é aplicada à resina de troca iônica. Proteínas tendo alta afinidade com os grupos funcionais carregados da resina são adsorvidas. Moléculas não ligadas são carregadas com o tampão original e passam através da coluna. A dessorção das proteínas seletivas à resina são dessorvidas pelo aumento da força iônica ou pela alteração do pH (COLLINS, BRAGA e BONATO, 1995).

SILVA JÚNIOR (2004) informa que quando a eluição de proteínas utiliza um gradiente salino de cloreto de sódio (NaCl) o que se constata, mais corriqueiramente, é que a maioria das proteínas eluem da coluna em concentrações salinas de 0,5-0,6 M. Entretanto, glicoproteínas com significativo teor de ácidos siálicos e com predominância de resíduos expostos de aminoácidos ácidos sobre os básicos são presas firmemente às matrizes de troca aniônica forte (pH<9) e requerem concentrações salinas elevadas para serem eluídas das respectivas colunas de troca aniônica.

2.6 PRINCÍPIOS DA ELETROFORESE

Segundo FENNEMA (2000), as proteínas são macromoléculas que têm uma característica bastante importante - apresentam várias regiões (grupamentos) com cargas elétricas. Elas apresentam tanto grupamentos com cargas positivas quanto grupamentos com cargas negativas, provenientes dos aminoácidos que as constituem. A somatória das cargas de todas as regiões carregadas de uma proteína confere uma carga total à proteína.

Uma propriedade das cargas elétricas em solução é que quando uma diferença de potencial é aplicada à solução - ou seja, quando os pólos de uma bateria são conectados à solução – as cargas positivas são atraídas pelo pólo negativo e as cargas negativas, pelo pólo positivo, deslocando-se em direção a eles. Essa migração das cargas quando são submetidas a uma diferença de potencial é chamada de eletroforese (NAOUM, 1990). Quanto maior a intensidade da voltagem aplicada, maior será a velocidade com que as cargas se dirigem ao pólo de sinal oposto.

Por outro lado, se considerarmos a carga total da macromolécula, quanto maior for essa carga, maior será a atração eletrostática da molécula pelo pólo de sinal oposto. Dessa forma, quanto maior for a carga da macromolécula, maior será a sua velocidade de migração eletroforética.

O tamanho da macromolécula também influi decisivamente na sua velocidade de migração. Isso porque existe um componente friccional entre a macromolécula, o solvente, o suporte e os demais íons em solução que faz com que quanto maior a macromolécula, menor a sua velocidade de migração em direção ao pólo de sinal oposto (NAOUM, 1990).

2.7 LIOFILIZAÇÃO

A liofilização ou secagem a frio (freeze dry) é o mais nobre processo de conservação de produtos conhecido porque envolve os dois métodos mais confiáveis de conservação: o congelamento e a desidratação.

Na liofilização o produto congelado a uma temperatura inferior a -30°C é submetido a uma pressão muito baixa (alto vácuo), fazendo com que a água dos produtos que foi transformada em gelo seja sublimada, ou seja, passará diretamente do estado sólido para o estado gasoso, resultando num produto final com uma estrutura porosa e baixo teor de umidade, capaz de ser reconstituído pela simples adição de água.

Os produtos liofilizados têm suas propriedades originais conservadas - forma, cor, aroma e sabor, e quando conservados adequadamente, mesmo à temperatura ambiente, resistem intactos por muitos anos (LIOBRÁS, 2005).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATÉRIA PRIMA E REAGENTES

3.1.1 Processo Industrial de Secagem do Soro

Foram utilizadas duas amostras de soro de leite em pó fornecidas pela empresa Sooro nos meses de agosto e novembro de 2006. Esta empresa está localizada na cidade de Marechal Cândido Rondon, no Oeste do Paraná, sendo esta região grande produtora de leite, com diversos laticínios, que disponibilizam uma grande quantidade de matéria prima diária.

Com um sistema de coleta instalado nas fábricas de queijo da região em um raio de 150 km, a Sooro recolhe o soro de leite utilizando caminhões tanques isotérmicos próprios para este tipo de transporte.

Após a aprovação através de uma série de análises, o produto é filtrado, resfriado e estocado em silos, onde aguarda até ser processado.

No início do processo, o produto passa por um trocador de calor, onde é pré-aquecido a 80°C por 3 a 4 minutos.

Na seqüência, passa por um conjunto de centrífugas onde é desnatado e clarificado, gerando creme e soro desnatado.

Na etapa seguinte, inicia-se o processo de concentração através da filtração em membranas de osmose inversa, onde cerca de 2/3 da água inicial do produto é retirada através de separação molecular.

Após a fase da osmose inversa, o produto segue para uma etapa de concentração convencional em evaporadores tubulares de múltiplo estágios, onde o soro é pasteurizado e concentrado, resultando em um produto com 30 a 50% de sólidos, seguindo para secagem por “spray dryer” (SOORO, 2007).

3.1.2 Reagentes

Produto comercial denominado Lacprodan® CGMP-10 da Arla Foods Ingredients Ltda.

Resina trocadora de ânion DEAE-Sephacel® da Pharmacia Biotech.

Padrão de ácido siálico da Acros Organics, código 227040250.

Padrão de GMP da Sigma, código C-7278.

Os demais reagentes utilizados, de grau analítico, foram os disponíveis comercialmente de empresas como: Merck, J.T.Baker, Pharmacia, Sigma, Carlo Erba e outras.

3.2 EQUIPAMENTOS

Sistema de ultrafiltração com membranas de “cut-off” 50kDa e 30kDa com área de filtração de 0,5m², material do filtro polietersulfona, material da pele polipropileno e material adesivo poliuretano, na configuração cassete, da empresa Millipore Indústria e Comércio Ltda, número de catálogo P2B050A05 e P2B030A05, respectivamente e membrana de “cut-off” 5kDa com área de filtração de 0,5m², material do filtro celulose regenerada, material da pele polipropileno e material adesivo poliuretano, na configuração cassete, da empresa Millipore Indústria e Comércio Ltda, número de catálogo P2C005C05.

Cromatógrafo Líquido Varian, modelo ProStar, acoplado com detector UV/Vis, modelo ProStar (Varian) e software Varian Star Workstation versão 6.41 para registro dos cromatogramas.

Coluna OmniSpher C18 (250mm x 4,6mm x 5µm).

Liofilizador L101, da Liobrás Indústria, Comércio e Serviços de Liofilizadores Ltda.

Balança analítica; agitador magnético; banho termostático; estufa; mufla; centrífuga; cuba; banho ultrassônico (Ultrasonic Cleaner Unique); bloco digestor (unidade DK20, Velp Scientifica) e unidade de destilação automática (UDK140, Velp Scientifica); fonte de eletroforese e demais equipamentos e materiais de uso em laboratório.

3.3 METODOLOGIA

Para o isolamento do GMP do soro de leite neste trabalho foram utilizados dois métodos: o primeiro utiliza o processo de separação por membranas de ultrafiltração, baseado principalmente em diferenças de tamanho das partículas e o segundo que se baseia na adsorção seletiva (cromatografia de troca-iônica).

Estes processos foram desenvolvidos no laboratório de Pós-Graduação do Departamento de Nutrição da Universidade Federal do Paraná, sendo os parâmetros ajustados cuidadosamente para o isolamento e caracterização do peptídeo.

3.3.1 Retenção do GMP pela Membrana de 30kDa em Função do pH

Para avaliar o comportamento do GMP frente a variação do pH, foram preparadas soluções na concentração de 3,5g/L do GMP comercial em pHs 3, 5 e 7.

Após centrifugação por 20 minutos a 5200g e 4°C, o sobrenadante destas soluções assim preparadas foram submetidas a ultrafiltração em membrana 30kDa, com pressão de alimentação mantida a 1bar.

Uma repetição do processo de ultrafiltração foi realizada com a solução de GMP comercial em pH 5, com o objetivo de verificar a repetibilidade do processo.

Determinações de ácido siálico nos volumes totais foram realizadas nos retentados e permeados desta membrana nos diferentes pHs em estudo.

3.3.2 Isolamento do GMP pelo Processo de Ultrafiltração

3.3.2.1 Reconstituição do soro de leite em pó

Cerca de dois quilos de soro de leite em pó foram reconstituídos em um litro de água destilada, com homogeneização constante até sua completa dissolução.

Dado ao alto teor de lactose no soro, a mesma permaneceu na forma cristalina após a reconstituição, sendo separada por filtração em uma forma para dessoragem de queijo com furos nas laterais e no fundo, diâmetro 14,5cm e altura

de 9,5cm, sendo lavado seguidamente com água destilada até que se coletassem três litros do filtrado.

Este procedimento foi realizado em duplicata, resultando em duas soluções de soro cada uma com três litros cada.

3.3.2.2 Pré-tratamento do soro de leite reconstituído

As soluções de soro de leite reconstituído foram submetidas a um pré-tratamento que consistiu no seu aquecimento por 15 e 30 minutos em temperatura constante de 80°C. Esta condição foi conseguida através da utilização de um recipiente encamisado que manteve a temperatura constante durante todo o processo, como pode ser observado na Figura 06. A seguir, os soros de leite foram resfriados rapidamente em banho de gelo e centrifugados a 5200g e 4°C por 20 minutos.

FIGURA 06 – TRATAMENTO TÉRMICO DO SORO DE LEITE



FONTE: A AUTORA.

3.3.2.3 Ultrafiltração do soro de leite após tratamento térmico

Os sobrenadantes resultantes das centrifugações das soluções dos soros submetido aos tratamentos térmicos a 80°C por 15 e 30 minutos foram ultrafiltrados, separadamente, em membrana de 50kDa, resultando em um permeado e um retentado de 50kDa (P50kDa e R50kDa), conforme mostra o fluxograma da Figura 07. O retentado de 50kDa foi novamente submetido a ultrafiltração na mesma membrana para tentar recuperar o GMP que possa ter ficado retido nesta e assim melhorar o rendimento, resultando em um segundo permeado e retentado de 50kDa, denominado de P₂50kDa e R₂50kDa.

A seguir, tanto o primeiro como o segundo permeado de 50kDa foram ultrafiltrados separadamente em membrana de 30kDa, resultando com isso em dois permeados e dois retentados especificados respectivamente como P30kDa, P₂30kDa, R30kDa e R₂30kDa.

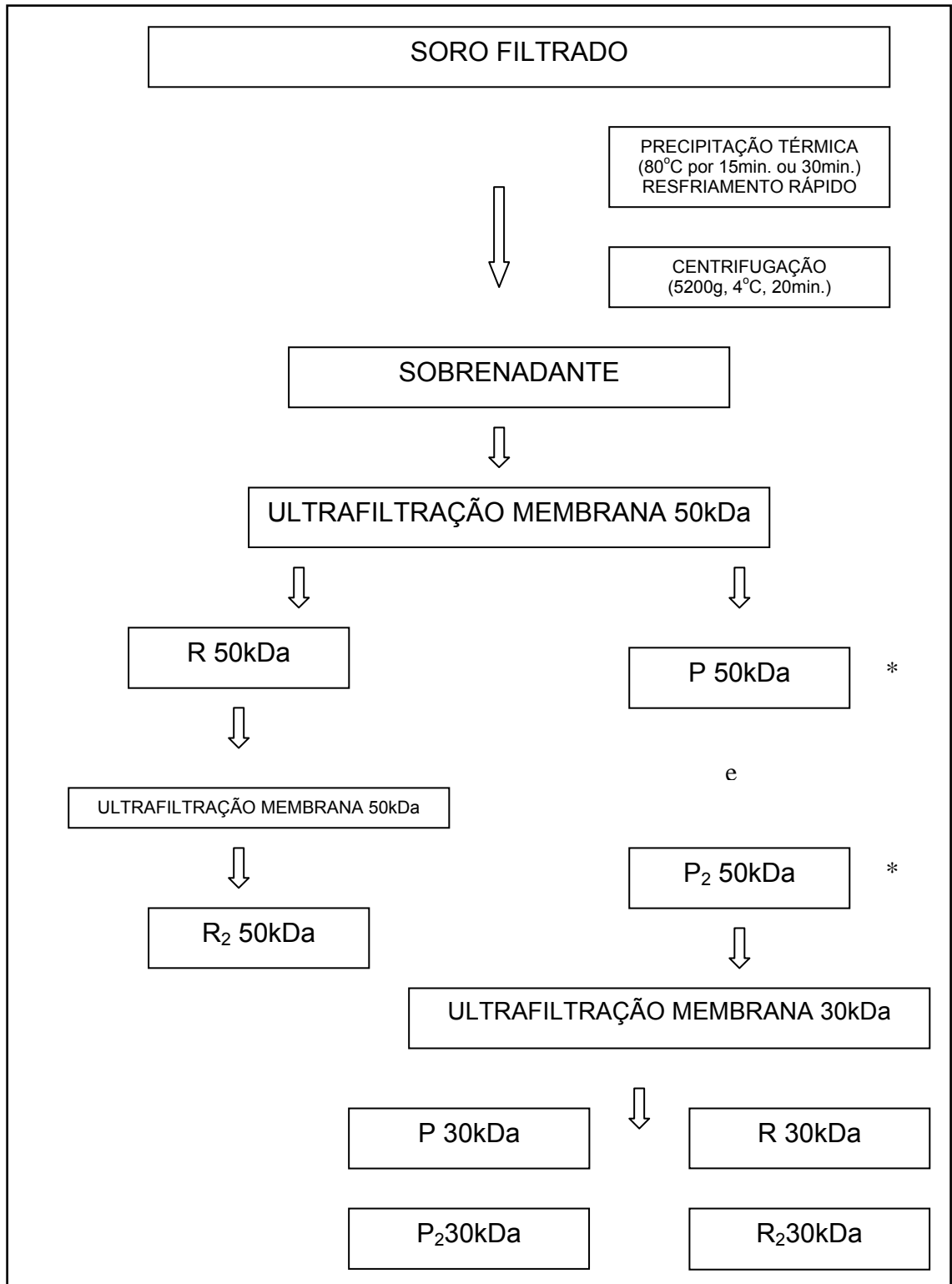
Em todas as ultrafiltrações foram realizadas diafiltrações. A diafiltração é uma modificação da ultrafiltração, na qual a água é adicionada à alimentação durante a filtração, com o objetivo de lavar os componentes da alimentação que irão passar através das membranas (basicamente lactose e minerais).

Durante as etapas de ultrafiltração a pressão de alimentação foi mantida a 1bar.

Os tratamentos apresentados na Figura 07 diferem apenas no tempo do tratamento térmico do soro de leite inicial, onde no primeiro processamento foi utilizado 15 minutos e no segundo 30 minutos.

Na Figura 08 é apresentada uma fotografia do equipamento de ultrafiltração utilizado nos processamentos do soro de leite por este método.

FIGURA 07 - FLUXOGRAMA DO ISOLAMENTO DO GLICOMACROPEPTÍDEO DO SORO DE LEITE POR ULTRAFILTRAÇÃO COM TRATAMENTO TÉRMICO DO SORO POR 15 E 30 MINUTOS A 80°C



FONTE: A AUTORA.

NOTAS: * ultrafiltração dos permeados de 50kDa (P50kDa e P₂50kDa) foram realizadas em membrana de 30kDa separadamente.

FIGURA 08 - EQUIPAMENTO DE ULTRAFILTRAÇÃO UTILIZADO NO ISOLAMENTO DO GLICOMACROPEPTÍDEO DO SORO DE LEITE



FONTE: A AUTORA.

3.3.3 Isolamento do GMP por Cromatografia de Troca-Iônica

Para o isolamento do GMP do soro de leite por cromatografia de troca-iônica foram utilizados sete gramas de soro de leite em pó dissolvidos em solução de acetato de sódio pH 3,5 com volume final ajustado para 150mL.

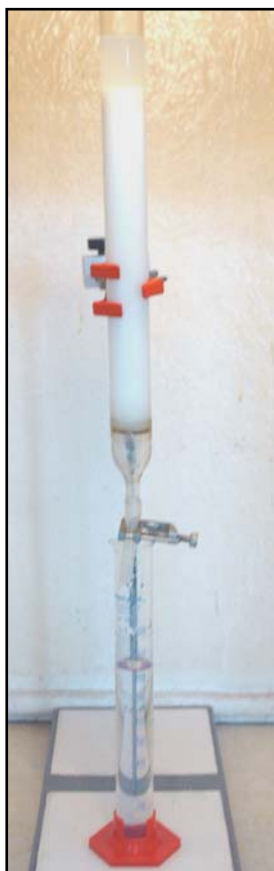
Esta solução foi aplicada em coluna com diâmetro de 1,5 cm e comprimento de 24 cm contendo a resina trocadora de ânion DEAE-Sephacel®, equilibrada com a mesma solução de acetato de sódio pH 3,5.

O GMP adsorvido na coluna foi eluído com solução de cloreto de sódio 1M. Foram coletadas quatro frações de 150mL que foram monitoradas em ácido siálico e proteína.

A fração F4, que apresentou a maior relação ácido siálico/proteína (mg/g) foi submetida a ultrafiltração e diafiltração em membrana de “cut off” 5kDa, para a eliminação do cloreto de sódio e então liofilizada para a sua caracterização.

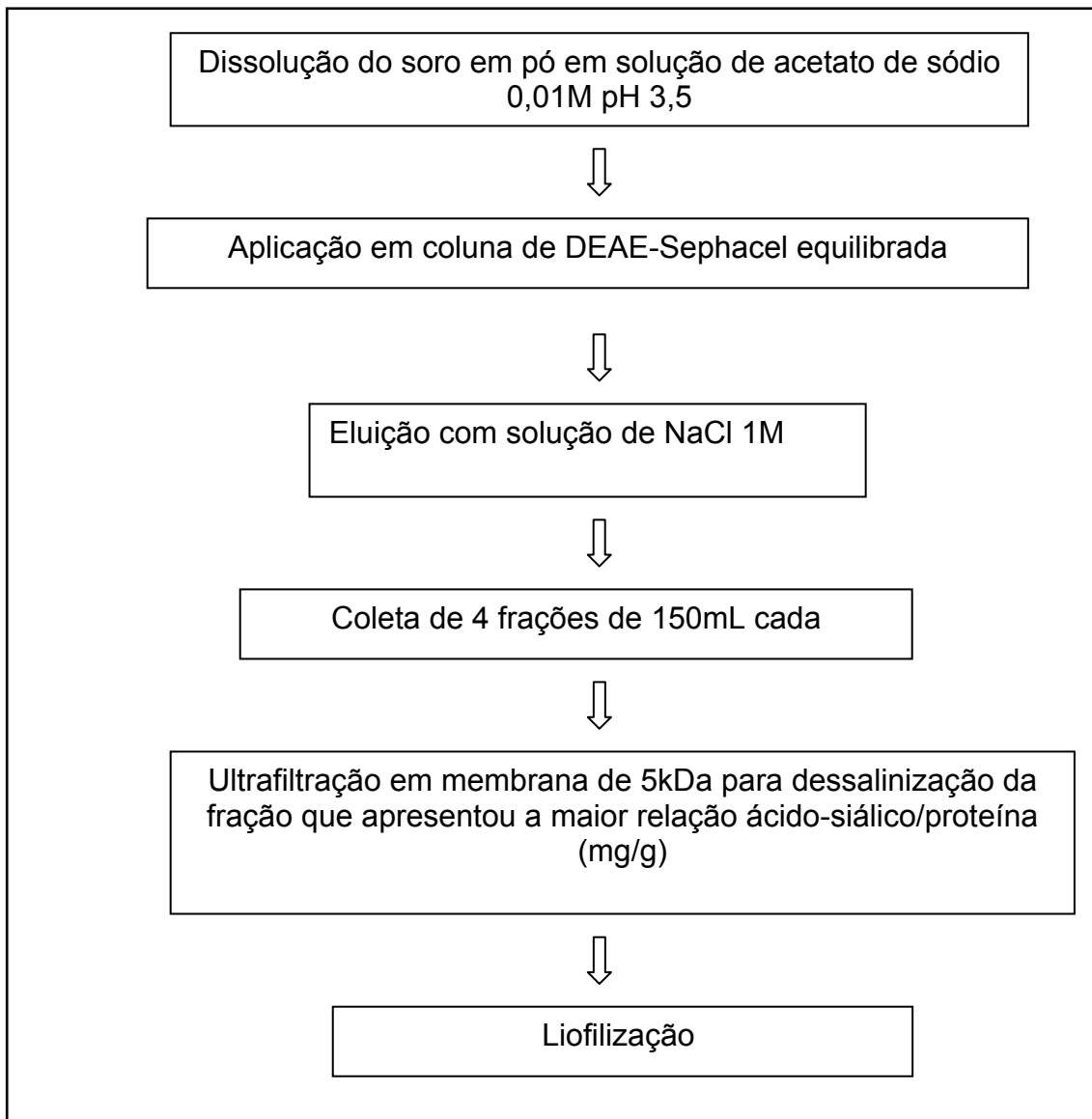
Na Figura 09 é apresentada uma fotografia da coluna utilizada para a realização deste experimento e na Figura 10 o fluxograma do processo.

FIGURA 09 - COLUNA UTILIZADA PARA O ISOLAMENTO DO GLICOMACROPEPTÍDEO POR CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA



FONTE: A AUTORA.

FIGURA 10 - FLUXOGRAMA DO ISOLAMENTO DO GLICOMACROPEPTÍDEO DO SORO DE LEITE POR CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA



FONTE: A AUTORA.

3.3.4 Composição Físico-química dos Soros de Leite em Pó, do GMP Comercial e das Frações Obtidas nos Processos de Ultrafiltração e Cromatografia de Troca-Iônica

As determinações de umidade, cinzas, proteínas e lipídeos foram realizadas em triplicata, conforme AOAC (2000).

Para determinação de umidade foram utilizadas 5g do soro de leite em pó, do GMP comercial e 1g dos retentados liofilizados de 30kDa dos dois processamentos, os quais foram pesados em pesa-filtros padronizados com tampa e levados a estufa a 105°C com circulação de ar até massa constante.

As cinzas foram determinadas utilizando-se cerca de 3g do soro de leite em pó, do GMP comercial e 1g dos retentados liofilizados de 30kDa dos dois processamentos, sendo os mesmos pesados em cadinhos de porcelana padronizados, carbonizados em chapa elétrica e incinerados em mufla a 550°C até obtenção de cinzas brancas.

A determinação de lipídeos foi realizada em 5g do soro de leite em pó e a extração pelo método de Soxhlet foi efetuada com éter de petróleo.

Proteína bruta pelo método Kjeldahl foi determinada na matéria prima (soro de leite em pó), no GMP comercial e nos retentados liofilizados de 30kDa utilizando 0,2g de amostra para a digestão.

Para os soros após os tratamentos térmicos e centrifugação, assim como em todos os retentados e permeados resultantes das ultrafiltrações em membranas de 30 e 50kDa e nos volumes totais das frações eluídas no processo de isolamento do GMP por cromatografia de troca-iônica foram utilizados volumes que variaram de 2 a 20mL.

Para titulação foram usadas soluções padronizadas de ácido sulfúrico 0,2N. Para conversão de nitrogênio em proteína foi utilizado o fator 6,38.

3.3.5 Determinação de Ácido Siálico nos Soros de Leite em Pó, no GMP comercial e nas Frações Obtidas nos Processos de Ultrafiltração e Cromatografia de Troca-Iônica

Foi utilizada e adaptada para o soro a metodologia da ninhidrina ácida utilizada por FUKUDA (2004) onde a mesma mede o conteúdo de ácido siálico em amostras de leite.

A cada 0,5mL dos soros de leite iniciais, dos soros tratados por 15 e 30 minutos a 80°C e dos permeados e retentados de todas as etapas de ultrafiltração foram acrescentados 0,5mL de ácido tricloroacético a 10%. Após homogeneização e repouso por 30 minutos, a mistura foi centrifugada a 2.000g por 20 minutos e 4°C. Foram tomadas alíquotas do sobrenadante de 0,1mL para os soros de leite iniciais e para os soros após os tratamentos térmicos e alíquotas dos sobrenadantes entre 0,3 e 0,8mL para os retentados e permeados das etapas de ultrafiltração.

Para as frações eluídas da coluna de cromatografia de troca-iônica foram tomadas alíquotas de 0,75mL que foram precipitadas com 0,25mL de ácido tricloroacético a 20%. Após homogeneização, repouso por 30 minutos e centrifugação a 2.000g por 20 minutos e 4°C, alíquotas entre 0,6 e 0,9mL dos sobrenadante foram submetidas a análise.

Para a determinação de ácido siálico no soro em pó foi pesado cerca de 0,2g de amostra, para o GMP comercial 0,04g, para R30kDa liofilizado 0,06g e para o R₂30kDa 0,04g os quais foram dissolvidos em 10mL de água sendo tomadas alíquotas de 0,5mL para a precipitação com ácido tricloroacético a 10% e alíquotas de 0,5mL dos sobrenadantes para a determinação.

Após os volumes serem completados para 1mL, adicionou-se 1mL de ácido acético glacial e 1mL do reagente de ninhidrina ácida (1g de ninhidrina, 16mL de ácido clorídrico p.a. e 24mL de ácido acético glacial p.a.). Seguida a homogeneização, submeteu-se a mistura ao banho-maria fervente por exatos 10 minutos. Houve desenvolvimento de cor variando do amarelo ao marron-amarelado. Resfriou-se a solução em banho de gelo e logo após submeteu-se a mesma à leitura espectrofotométrica, no comprimento de onda de 470nm, contra branco dos reagentes. As leituras foram transformadas em concentração de ácido siálico em microgramas por comparação com uma curva padrão de ácido siálico.

3.3.6 Determinação de Lactose no Soro de Leite em Pó, no GMP Comercial e nos Retentados Liofilizados obtidos pelo Processo de Ultrafiltração em Membrana de 30kDa

A dosagem de lactose foi realizada pelo método de FOLIN e WU (1920). Para a determinação de lactose no soro em pó pesou-se cerca de 0,1g de amostra, para o GMP comercial 1g assim como também para os produtos liofilizados R30kDa e R₂30kDa. A seguir foram adicionados 2mL de solução de tungstato de sódio 10% e então, gota a gota 2mL de solução de ácido sulfúrico 2/3N. Após mistura e descanso por cinco minutos o volume foi completado com água destilada para 100mL e procedeu-se a filtração em papel de filtro Whatmann n^o1, descartando-se os primeiros 5mL. Alíquotas de 0,5mL para o soro de leite em pó, 1mL para o GMP comercial e 0,1mL dos retentados de 30kDa foram transferidos para tubos de Folin Wu tendo seus volumes completados para 1mL com água destilada.

Em seguida, foram adicionados 2mL do reagente alcalino de cobre a cada tubo sendo os mesmos levados a banho-maria fervente por exatos oito minutos. Após resfriamento em banho de gelo foram adicionados 4mL do reativo de Folin Wu a cada tubo e o volume completado para 25mL com água destilada. Seguida homogeneização foi procedida a leitura a 520nm contra branco dos reagentes. As leituras foram transformadas em concentração de lactose em microgramas por comparação a uma curva padrão de lactose pré-estabelecida.

3.3.7 Caracterização do GMP por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS/PAGE)

A caracterização por eletroforese foi realizada utilizando o método de NAKANO e OZIMEK (2000) adaptado, em gel de poliacrilamida 12% em tampão tris-borato 1,5M pH 8,6. Cerca de 10mg do soro de leite em pó, do GMP comercial e cerca de 15mg dos permeados e retentados liofilizados obtidos em todas as etapas de ultrafiltração, assim como também da fração F4, por apresentar a maior relação ácido siálico/proteína (mg/g) obtida por cromatografia de troca-iônica, foram

dissolvidos em 0,5mL de tampão contendo para 20mL: 4mL de SDS 10%, 7,20g de uréia, 2mL de mercaptoetanol e 0,53mL de tampão tris-borato 1,5M e aquecidas por 5 minutos antes da aplicação. Alíquotas de 10µL foram aplicadas aos géis e a corrida conduzida por exatos 80 minutos sendo mantida voltagem constante de 150V. Os géis foram corados, por 1 hora com Coomassie Blue R 250 0,055% (p/v) em metanol 50% (v/v) contendo 10% de ácido acético glacial (v/v) e descorados em metanol 50% (v/v) contendo 10% de ácido acético glacial. O tampão de corrida foi composto por solução de tris 0,02M e glicina 0,2M contendo 0,1% de SDS.

3.3.8 Caracterização do GMP por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase-Reversa (CLAE-FR)

A caracterização do GMP por CLAE-FR foi realizada à temperatura de 25°C, conforme metodologia proposta por THOMA, KRAUSE e KULOZIK (2006) e adaptada para a coluna OmniSpher C18 (250mm x 4,6mm x 5µm). Foi utilizado um gradiente de solvente, formado por 0,1% de ácido trifluoracético em água destilada (solvente A) e ácido trifluoracético 0,05% em acetonitrila-água – 80:20 v/v (solvente B). A coluna foi equilibrada com 90% de A e 10% B. Após início da corrida a fase móvel foi incrementada para 49% B durante 07 minutos, seguindo para 100% de B durante 05 minutos. Esta condição foi mantida durante 02 minutos antes de retornar às condições iniciais.

Soluções com concentração de 10mg/mL das frações R30kDa, R₂30kDa e P₂30kDa provenientes do processo de ultrafiltração, da fração F4 obtida por cromatografia de troca-iônica, do GMP comercial e do GMP padrão Sigma foram dissolvidos em água destilada e filtrados em membrana de 0,22µm (Millipore). Volumes de 30µL foram utilizados para a realização das análises sendo os picos detectados a 214 e 226nm.

Os solventes foram previamente filtrados em membrana de 0,22µm (Millipore) e então desgaseificados em banho ultrassônico.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 FATOR DE RETENÇÃO DO GMP PELA MEMBRANA DE 30kDa EM FUNÇÃO DO pH

Os teores de ácido siálico nos volumes totais das soluções iniciais do GMP comercial, nos retentados e permeados em diferentes pHs obtidos por ultrafiltração em membrana de 30kDa encontram-se na Tabela 04.

TABELA 04 - TEORES DE ÁCIDO SIÁLICO NOS VOLUMES TOTAIS DAS SOLUÇÕES INICIAIS DO GMP COMERCIAL, NOS RETENTADOS E PERMEADOS DA MEMBRANA DE 30kDa EM DIFERENTES pHs

	ÁCIDO SIÁLICO NO VOLUME TOTAL* (mg)
Solução Inicial pH 3	76,27± 0,91
Permeado 30kDa pH 3	16,33 ± 0,88
Retentado 30kDa pH 3	28,14 ± 1,34
Solução Inicial pH 5	93,78 ± 0,84
Permeado 30kDa pH 5	3,37 ± 0,23
Retentado 30kDa pH 5	69,1± 0,54
Solução Inicial pH 5	93,78 ± 0,84
Permeado 30kDa pH 5	5,15 ± 0,54
Retentado 30kDa pH 5	71,6 ± 1,78
Solução Inicial pH 7	91,39 ± 1,38
Permeado 30kDa pH 7	0 ± 0
Retentado 30kDa pH 7	73,84

NOTAS: * Média de três repetições ± desvio-padrão.

Fator de retenção é a medida da capacidade da membrana de reter o soluto sob determinadas condições. Este pode ser calculado pela equação:

$$R = 1 - C_p/C_f \quad \text{EQUAÇÃO 1}$$

onde: C_p = concentração do soluto no permeado

C_f = concentração do soluto na alimentação (solução inicial)

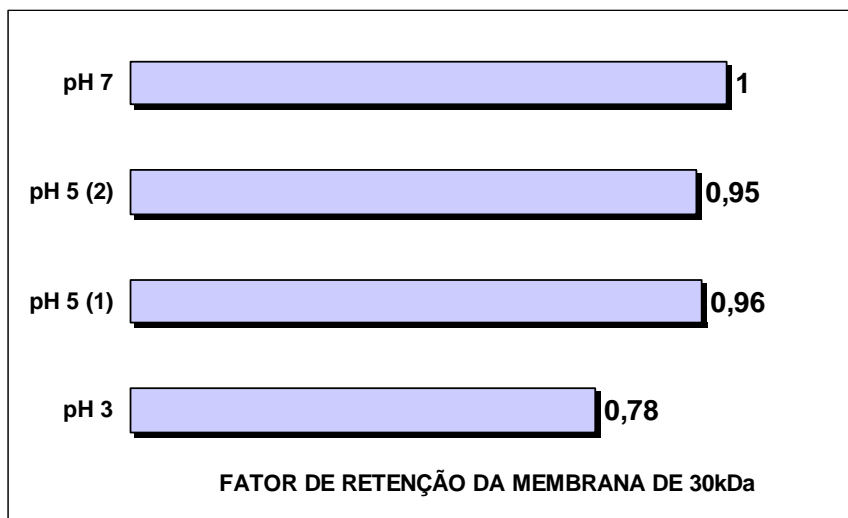
Se $R = 1$ $C_p = 0$ (retenção total)

Se $R = 0$ $C_p = C_f$ (retenção zero)

Aplicando a Equação 1 aos dados constantes da Tabela 04, pode-se obter a Figura 11. Analisando-se esta figura nota-se que as duas passagens pela membrana em pH 5 apresentaram fatores de retenção semelhantes entre si, indicando repetibilidade do processo realizado. Em pH 7 seguido pelo pH 5 foram obtidos os melhores fatores de retenção para o ácido siálico (indicativo da presença de GMP) quando se usa a membrana de 30kDa utilizada neste trabalho. Desta forma optou-se por não alterar o pH do soro de leite durante a ultrafiltração, que se encontrava em 6,2 como sugerem alguns autores citados na revisão.

O teor de ácido siálico mais baixo em pH 3 do que nos outros pHs pode ser explicado pela solubilidade do GMP. Conforme CHOBERT et al. (1989) em seu estudo sobre solubilidade do GMP em função do pH observaram que o GMP apresentou solubilidade mínima (88%) na faixa de pH 1-5.

FIGURA 11 - FATOR DE RETENÇÃO DA MEMBRANA DE 30kDa EM DIFERENTES pHs



NOTAS: (1) e (2) repetições realizadas para avaliar a repetibilidade do processo.

4.2 COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS SOROS DE LEITE EM PÓ UTILIZADOS NO ISOLAMENTO DO GMP POR CROMATOGRÁFIA DE TROCA-IÔNICA E ULTRAFILTRAÇÃO

Duas amostras de soro de leite em pó foram enviadas pela empresa Sooro, em épocas diferentes e os procedimentos de isolamento do GMP foram efetuados com os dois diferentes lotes de soros recebidos.

A composição físico-química dos soros de leite em pó utilizados para o isolamento do GMP por cromatografia de troca-iônica e por ultrafiltração encontram-se na Tabela 05.

TABELA 05 - COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS SOROS DE LEITE EM PÓ UTILIZADOS PARA O ISOLAMENTO DO GMP POR CROMATOGRÁFIA DE TROCA-IÔNICA E POR ULTRAFILTRAÇÃO

	SORO 1* (g/100g)	SORO 2* (g/100g)
Umidade	2,47 ± 0,02 ^a	2,45 ± 0,05 ^a
Proteína	8,72 ± 0,18 ^a	6,84 ± 0,06 ^b
Gordura	0,71 ± 0,02 ^a	0,62 ± 0,05 ^b
Cinzas	7,08 ± 0,05 ^a	4,77 ± 0,04 ^b
Lactose	75,41 ± 0,39 ^a	87,52 ± 1,27 ^b

NOTAS: SORO 1* – utilizado para o isolamento do GMP por cromatografia de troca-iônica.
 SORO 2* – utilizado para o isolamento do GMP por ultrafiltração.
 Os dados representam média de três repetições ± desvio-padrão.
 Médias seguidas de letras diferentes entre as colunas 2 e 3 mostram diferença estatisticamente significativa pelo teste T de Student.

Análise estatística realizada pelo teste T de Student (software Statistica-StatSoft), mostrou diferença estatisticamente significativa nos teores de proteína ($p=6 \times 10^{-5}$), gordura ($p=0,03$), cinzas ($p=3 \times 10^{-7}$) e lactose ($p=9 \times 10^{-5}$) e não-significativa no teor de umidade dos soros de leite em pó utilizados para o isolamento do GMP por cromatografia de troca-iônica e por ultrafiltração (Tabela 05), pois a umidade é a variável controlada no processo de secagem do soro.

O soro utilizado neste trabalho é a soma de coletas realizadas em vários estabelecimentos sendo recebidas duas remessas de soro, uma no mês de agosto e outra em novembro/2006.

Por isto, estas diferenças podem ser atribuídas à composição do leite utilizado para a fabricação do queijo. Fatores que podem interferir na composição do leite são: raça das vacas, alimentação, temperatura ambiente, manejo e intervalo entre as ordenhas, produção de leite, infecção da glândula mamária e o estágio de lactação.

Segundo FURLANETTI e PRATA (2003), no caso das proteínas do soro de leite, não só a concentração total pode variar como também a concentração

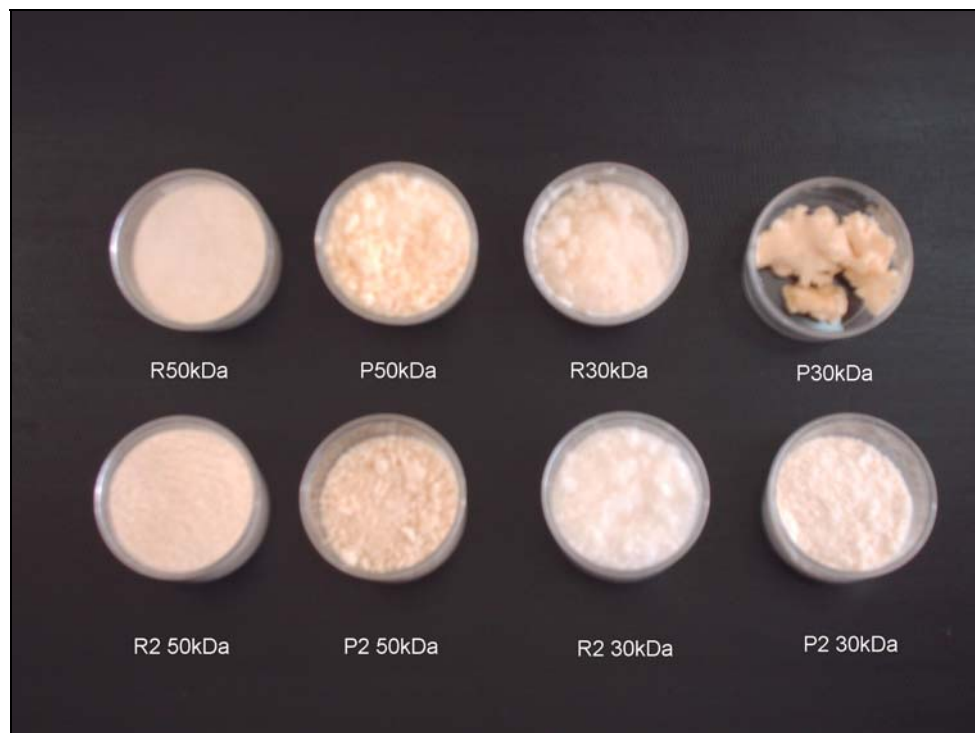
individual de cada proteína. Estes autores concluíram em seus estudos que a concentração de GMP variou durante o período de lactação, sendo cerca de dez vezes maior perto do período colostrado e durante a terceira fase da lactação.

O baixo teor de lipídeos é explicado porque o soro é desnatado previamente à secagem.

4.3 ISOLAMENTO DO GMP POR ULTRAFILTRAÇÃO UTILIZANDO TRATAMENTO TÉRMICO DO SORO DE LEITE A 80°C POR 15 E 30 MINUTOS

A Figura 12 mostra o aspecto de todas as frações liofilizadas obtidas ao longo do processo para a obtenção do GMP por ultrafiltração.

FIGURA 12 - ASPECTO DAS FRAÇÕES LIOFILIZADAS OBTIDAS ATRAVÉS DO PROCESSO DE ULTRAFILTRAÇÃO EM MEMBRANAS DE 50 E 30kDa



As Tabelas 06 e 07 apresentam os teores de ácido siálico e proteína nos volumes totais desde o soro inicial utilizado para o isolamento do GMP por ultrafiltração, assim como em todas as frações obtidas por este método.

TABELA 06 - TEORES DE ÁCIDO SIÁLICO E PROTEÍNA NOS VOLUMES TOTAIS DO SORO INICIAL, DO SORO TRATADO POR 15 MINUTOS NA TEMPERATURA DE 80°C E DOS PERMEADOS E RETENTADOS DAS ULTRAFILTRAÇÕES EM MEMBRANAS DE 50kDa E 30kDa

	ÁCIDO SIÁLICO NO VOLUME TOTAL* (mg)	PROTEÍNA NO VOLUME TOTAL* (g)
Soro Inicial	2578 ± 34,81	110,00 ± 3,97
Soro Tratado (15min. 80°C)	2322 ± 11,55	68,40 ± 3,11
R50kDa	1437 ± 17,52	44,54 ± 1,78
P50kDa	878 ± 7,18	17,45 ± 0,32
R30kDa	84 ± 1,24	2,41 ± 0
P30kDa	801 ± 6,81	13,68 ± 0
R ₂ 50kDa	933 ± 20,44	36,87 ± 0
P ₂ 50kDa	326 ± 8,68	10,97 ± 0,32
R ₂ 30kDa	97 ± 1,11	4,41 ± 0
P ₂ 30kDa	119 ± 3,84	1,15 ± 0

NOTAS: *Média de três repetições ± desvio-padrão.

Para compreensão das siglas da coluna 1, ver o fluxograma da Figura 07.

TABELA 07 - TEORES DE ÁCIDO SIÁLICO E PROTEÍNA NOS VOLUMES TOTAIS DO SORO INICIAL, DO SORO TRATADO POR 30 MINUTOS NA TEMPERATURA DE 80°C E DOS PERMEADOS E RETENTADOS DAS ULTRAFILTRAÇÕES EM MEMBRANAS DE 50kDa E 30kDa

	ÁCIDO SIÁLICO NO VOLUME TOTAL* (mg)	PROTEÍNA NO VOLUME TOTAL* (g)
Soro Inicial	2976 ± 21,53	126,21 ± 1,85
Soro Tratado (30min. 80°C)	2173 ± 22,60	56,18 ± 0
R50kDa	1171 ± 12,48	31,77 ± 0,85
P50kDa	867 ± 9,74	17,30 ± 0,25
R30kDa	72 ± 0,77	2,41 ± 0
P30kDa	552 ± 12,48	8,31 ± 0,59
R ₂ 50kDa	836 ± 0	22,00 ± 0,16
P ₂ 50kDa	178 ± 1,67	3,90 ± 0,27
R ₂ 30kDa	55 ± 0,26	1,67 ± 0,11
P ₂ 30kDa	73 ± 3,08	0,64 ± 0

NOTAS: *Média de três repetições ± desvio-padrão.

Para compreensão das siglas da coluna 1, ver o fluxograma da Figura 07.

Analisando os dados constantes das Tabelas 06 e 07 pode-se observar que as duas dissoluções do soro utilizado para o isolamento do GMP apresentaram teores de proteína de 110,00 e 126,21g e ácido siálico de 2578mg e 2976mg, no volume total, respectivamente.

O tratamento térmico realizado a 80°C por 30 minutos levou à maior desnaturação das proteínas (55,49% das proteínas do soro inicial) do que o realizado por 15 minutos (38,18% das proteínas do soro inicial), pois conforme FENNEMA (2000) a desnaturação das proteínas do soro ocorre a temperaturas superiores a 70°C. As imunoglobulinas são as proteínas do soro menos estáveis ao

calor, sendo em ordem crescente maior a estabilidade da albumina de soro bovino, β -lactoglobulina e a α -lactalbumina.

A perda de ácido siálico também pode ser atribuída aos tratamentos térmicos utilizados, conforme LIESKE, KONRAD e KLEINSCHMIDT (2004) estudando a influência do pH e do tratamento térmico por 5 minutos a 95°C na perda de ácido siálico, concluíram que em pH neutro a porcentagem de perda foi menor (2%), contra 10,4% em pH 5,2 e 21,4% em pH 3,8. Entretanto, neste trabalho o tratamento térmico foi realizado em intervalos de tempo mais prolongados (15 e 30 minutos) e apesar da temperatura ser inferior (80°C) do que a utilizada por estes autores poderia explicar as perdas ocorridas em termos de ácido siálico. O pH do soro neste processo foi de 6,2.

Quando se observa o conteúdo de ácido siálico no volume total das frações obtidas nos dois processamentos realizados (Tabelas 06 e 07), os dados sugerem que o GMP encontra-se nas frações P30kDa e P₂30kDa, por apresentarem teores de ácido siálico superiores. Entretanto analisando o perfil eletroforético destas frações (Figura 13) pode-se notar que não há a formação de bandas nítidas destas frações. Bandas bem definidas foram obtidas das frações R30kDa e R₂30kDa. Ao longo do processo pode-se verificar a eliminação das demais proteínas do soro.

Através da Figura 14 observam-se melhor os perfis eletroforéticos qualitativos das frações P50kDa, R30kDa, P₂50kDa e R₂30kDa, obtidos pelo processo de separação por membranas, com três bandas distintas podendo compará-las com o perfil eletroforético do GMP comercial.

FIGURA 13 - PERFIS ELETROFORÉTICOS EM SDS/PAGE DO SORO EM PÓ, DO SORO APÓS TRATAMENTO TÉRMICO E DAS FRAÇÕES LIOFILIZADAS OBTIDAS PELO MÉTODO DE ULTRAFILTRAÇÃO EM MEMBRANAS DE 50 E 30kDa

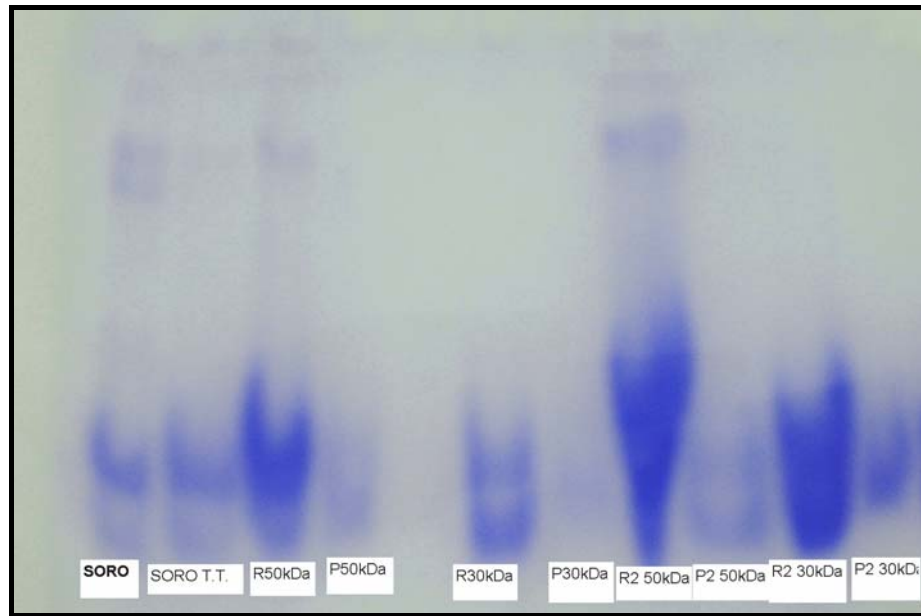
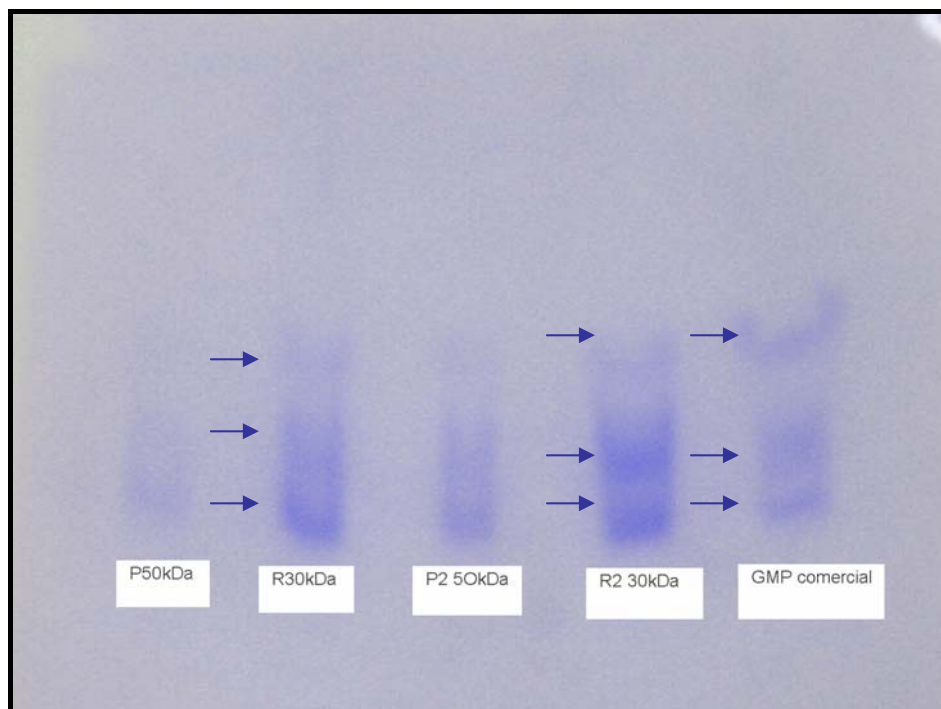


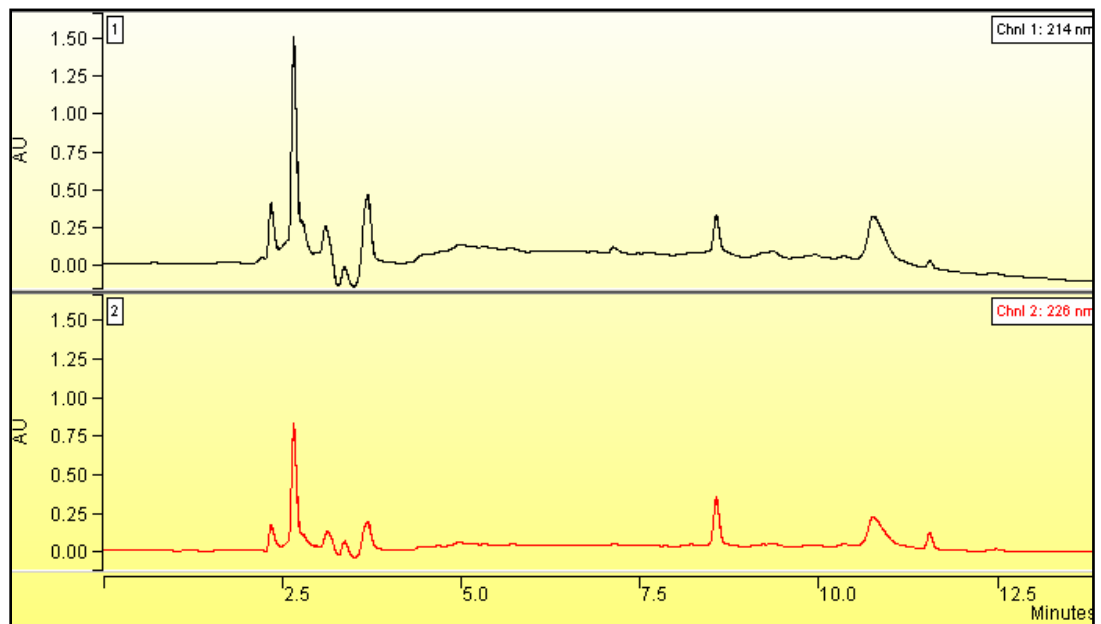
FIGURA 14 - PERFIS ELETROFORÉTICOS EM SDS/PAGE DAS FRAÇÕES P50kDa, R30kDa, P₂50kDa, R₂30kDa LIOFILIZADAS OBTIDAS PELO MÉTODO DE ULTRAFILTRAÇÃO EM MEMBRANAS DE 50 E 30kDa E DO GMP COMERCIAL



Os altos teores de ácido siálico encontrados nas frações P30kDa e P₂30kDa podem ser explicados pelo fato que o método da ninhidrina ácida, utilizada para a determinação de ácido siálico, não medir somente ácido siálico ligado a glicoproteínas, mas também medir ácido siálico livre, que pode ter sido gerado no tratamento térmico do soro de leite e que por apresentar massa molecular inferior a massa molecular de corte da membrana de 30kDa permeia pela mesma sendo concentrado desta forma nestas frações. LIESKE, KONRAD e KLEINSCHMIDT (2004) em seu trabalho comentam sobre a delicada natureza das formas glicosiladas do CMP que podem ser susceptíveis a mudanças de pH e tratamento térmico.

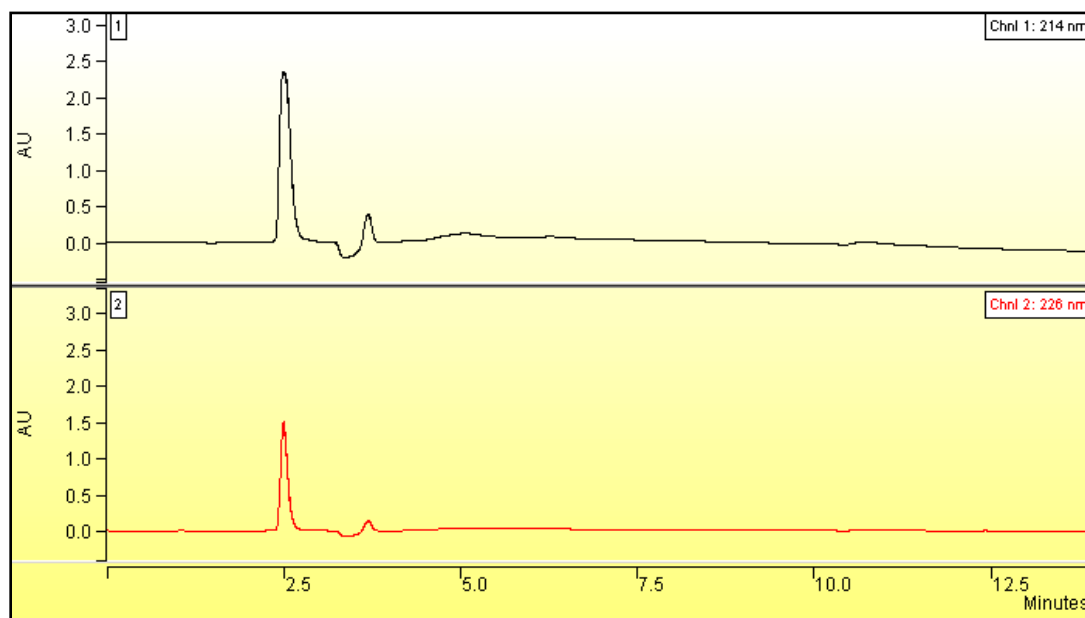
Com a finalidade de comprovar esta hipótese, foram obtidos sob as mesmas condições de análise, perfis cromatográficos através da CLAE-FR da fração P₂30kDa e do padrão de ácido siálico, os quais podem ser observados nas Figuras 15 e 16.

FIGURA 15 - PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM FASE REVERSA DA FRAÇÃO P₂30kDa OBTIDA POR ULTRAFILTRAÇÃO DA FRAÇÃO P₂50kDa EM MEMBRANA DE 30kDa



NOTAS: 1 – absorbâncias a 214nm; 2 – absorbâncias a 226nm

FIGURA 16 - PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM FASE REVERSA DO PADRÃO DE ÁCIDO SIÁLICO

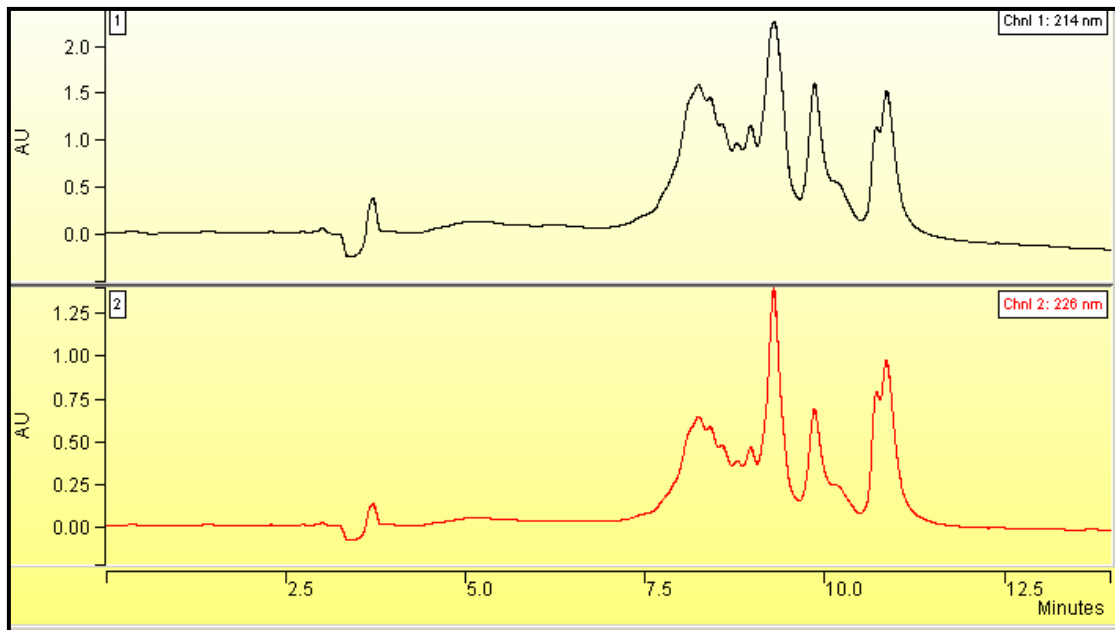


NOTAS: 1 – absorbâncias a 214nm; 2 – absorbâncias a 226nm

Analisando a Figura 16 pode-se observar que o padrão de ácido siálico eluiu em um pico bem definido com tempo de retenção (t_r) aproximadamente de 2,5 minutos. O perfil cromatográfico obtido por CLAE-FR da fração P₂₃₀kDa (Figura 15) apresenta, entre outros, um pico com as mesmas características e t_r semelhante ao t_r do ácido siálico, o que pode confirmar a hipótese acima sugerida.

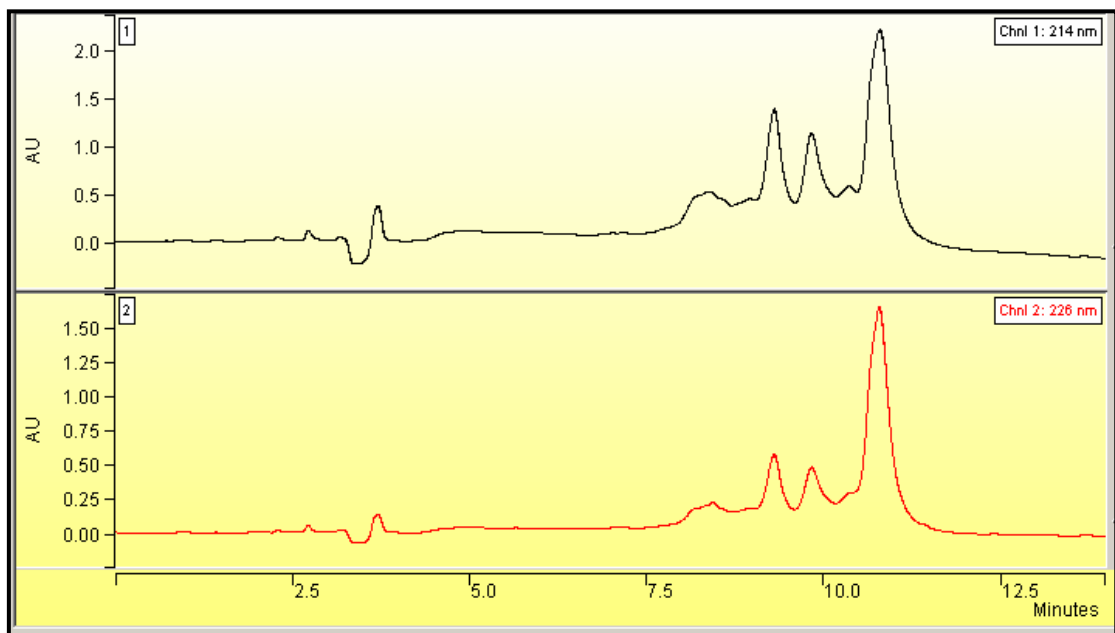
As leituras das absorbâncias por CLAE-FR foram efetuadas em dois comprimentos de onda (214 e 226nm) por ocorrerem divergências na literatura quanto ao comprimento de onda que seria mais indicado para determinar o perfil cromatográfico do GMP. Nas condições utilizadas neste trabalho, pode-se concluir pelas Figuras 17, 18 e 19 que as melhores leituras de absorbâncias foram obtidas a 214nm.

FIGURA 17 - PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM FASE REVERSA DO GMP COMERCIAL



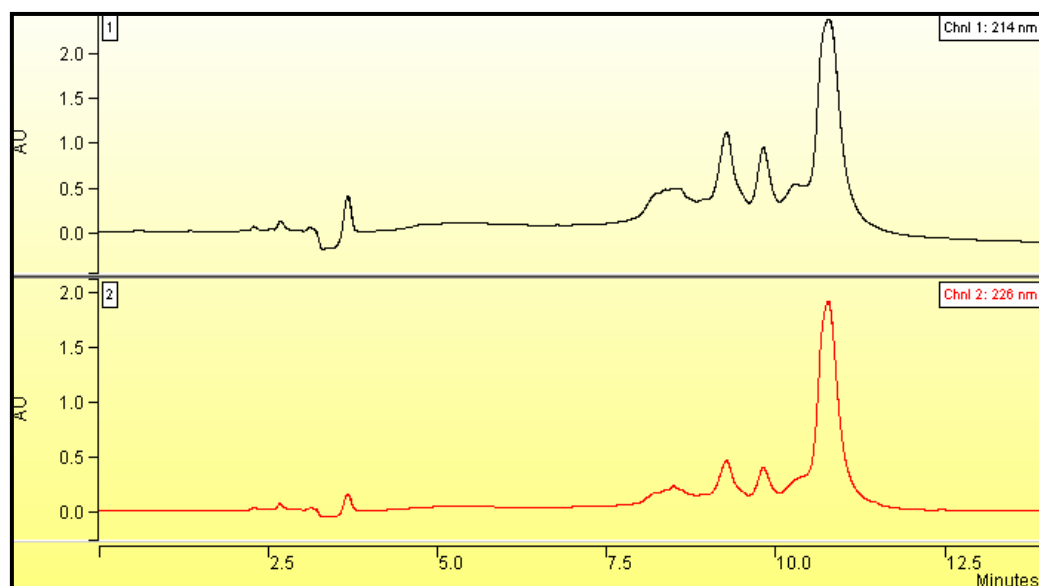
NOTAS: 1 – absorvâncias a 214nm: 2 – absorvâncias a 226nm.

FIGURA 18 - PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM FASE REVERSA DA FRAÇÃO R30kDa OBTIDA POR ULTRAFILTRAÇÃO DA FRAÇÃO P50kDa EM MEMBRANA DE 30kDa



NOTAS: 1 – absorvâncias a 214nm: 2 – absorvâncias a 226nm.

FIGURA 19 - PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM FASE REVERSA DA FRAÇÃO R₂30kDa OBTIDA POR ULTRAFILTRAÇÃO DA FRAÇÃO P₂50kDa EM MEMBRANA DE 30kDa



NOTAS: 1 – absorvâncias a 214nm; 2 – absorvâncias a 226nm

Conforme THOMÄ, KRAUSE e KULOZIK (2006) a ordem de eluição dos compostos do CMP é: a fração glicosilada elui primeiro com cerca de 8-10 picos sobrepostos, seguido por dois picos maiores dos componentes não-glicosilados variantes A e B.

Comparando-se os perfis cromatográficos obtidos por CLAE-FR dos retentados de 30kDa (Figuras 18 e 19) obtidas das frações de P50kDa e P₂50kDa com o perfil cromatográfico obtidos por CLAE-FR do GMP comercial (Figura 17) nota-se que os três perfis apresentam-se bastante semelhantes entre si, entretanto, em desacordo com os autores acima citados, e como na Figura 02, com eluição de três picos maiores após eluição dos picos sobrepostos.

A composição centesimal em base seca das frações R30kDa e R₂30kDa está apresentada na Tabela 08 comparativamente ao GMP comercial. A análise estatística realizada pelo teste T de Student (software Statistica-StatSoft), revelou diferença estatisticamente significativa na composição final dos retentados de 30kDa em decorrência do tempo de aquecimento (15 ou 30 min).

TABELA 08 - COMPOSIÇÃO CENTESIMAL EM BASE SECA DO GMP COMERCIAL E DOS RETENTADOS DE 30kDa LIOFILIZADOS DOS PROCESSAMENTOS REALIZADOS COM PRECIPITAÇÃO TÉRMICA DO SORO DE LEITE POR 15 E 30 MINUTOS

	GMP COMERCIAL (g/100g)	R30kDa 15min. (g/100g)	R30kDa 30min. (g/100g)	R ₂ 30kDa 15min. (g/100g)	R ₂ 30kDa 30min. (g/100g)
Proteína*	83,23 ± 0,07	20,88 ^a ± 0,27	19,06 ^b ± 0,20	63,41 ^a ± 0,19	60,01 ^b ± 0,96
Lactose*	2,05 ± 0,17	65,10 ^a ± 0,25	66,00 ^b ± 0,03	28,57 ^a ± 0,49	26,3 ^b ± 0,75
Cinzas*	5,82 ± 0,21	11,04 ^a ± 0,14	12,47 ^b ± 0,03	7,49 ^a ± 0,13	8,55 ^b ± 0,02
Ácido Siálico*	6,95 ± 0,08	0,67 ^a ± 0,01	0,84 ^b ± 0,01	1,27 ^a ± 0,01	1,70 ^b ± 0,03

NOTAS: * Média de três repetições ± desvio-padrão.

Médias seguidas de letras diferentes entre as colunas 3 e 4 e colunas 5 e 6, respectivamente, mostram diferença estatisticamente significativa pelo teste T de Student.

Dados constantes da Tabela 08 indicam teores de lactose das frações R30kDa e R₂30kDa elevados, principalmente na fração R30kDa, quando comparado ao GMP comercial.

Este problema pode ser resolvido de acordo com BORGES et al. (2001) promovendo uma maior concentração das proteínas, combinando a ultrafiltração com a diafiltração, que consiste em adicionar água destilada ao concentrado, fazendo-o recircular no sistema, para se retirar o máximo de lactose e outros compostos de baixa massa molecular, ao mesmo tempo concentrando e purificando ainda mais as proteínas. Conforme descrito na metodologia, durante o isolamento do GMP por ultrafiltração foram realizadas diafiltrações, entretanto, analisando os dados verifica-se que o volume de água adicionada foi insuficiente, principalmente na fração R30kDa, para concentrar as frações em proteína e retirar a lactose.

Teores de cinzas elevados nos produtos isolados em comparação com o GMP comercial, também foram obtidos por TANIMOTO et al. (1992), KAWASAKI, et al. (1993a) e CHOW e HARPER (2001).

O soro utilizado para o isolamento do GMP por ultrafiltração apresentou 2,45% de umidade, conforme a Tabela 05. Em 2kg de soro com teor de proteínas de 7% em peso seco teríamos que ter 136,65g de proteínas no volume total (3L da solução de soro em pó dissolvido). Conforme Tabelas 06 e 07 os soros iniciais utilizados nos dois processamentos apresentaram teores de proteína nos volumes totais de 110,00g e 126,21g nas duas dissoluções. Com isto pode-se afirmar que durante as dissoluções dos soros e filtração para eliminar a lactose cristalina ocorreram perdas de 19,50% e 7,64%, respectivamente da proteína contida no soro em pó.

TABELA 09 - MASSA DAS FRAÇÕES (g), TEOR DE ÁCIDO SIÁLICO(g/100g) E TEOR TOTAL(g) DE ÁCIDO SIÁLICO EM BASE SECA NAS FRAÇÕES R30kDa E R₂30kDa

	MASSA DAS FRAÇÕES EM BASE SECA (g)	TEOR DE ÁCIDO SIÁLICO EM BASE SECA* (g/100g)	TEOR TOTAL DE ÁCIDO SIÁLICO NAS FRAÇÕES (g)
R30kDa	117,76	0,84 ± 0,01	0,99
R ₂ 30kDa	4,01g	1,70 ± 0,03	0,07
Total			1,06

NOTAS: * Média de três repetições ± desvio-padrão.

Pode-se afirmar que a solução inicial utilizada para o isolamento do GMP por ultrafiltração contendo 126,21g de proteína é equivalente a 14 litros de soro, pois conforme RICHARDS (2002) o soro contém 0,9% de proteínas.

Após liofilização foram obtidas 117,76g da fração R30kDa e 4,01g da fração R₂30kDa, em base seca. De acordo com a Tabela 09 estas frações apresentaram teores de ácido siálico em base seca de 0,84g/100g e 1,70g/100g, respectivamente. Valores estes correspondem a teores de ácido siálico de 8,4µg e 17,0µg por mg do produto em pó obtido. Estes teores encontram-se entre os obtidos por alguns autores, que tentando isolar o GMP, conseguiram valores de 80,3µg/mg (KAWASAKI et al.,1992); 1,9µg/mg (NAKANO e OZIMEK, 1999) e 77,5µg/mg (NAKANO e OZIMEK, 2000). Estes teores (µg/mg) de ácido siálico baixos obtidos nestas frações, novamente podem ser explicados pelos elevados teores de lactose e baixos teores de proteína obtidos nestas frações (Tabela 08) e que podem ser resolvidos, conforme discussão acima, com o processo de diafiltração mais eficiente, e especialmente porque o GMP obtido está distribuído em duas frações. O objetivo da segunda etapa de ultrafiltração foi aumentar o rendimento do GMP.

Conforme MARTÍN-DIANA, PELAEZ e REQUENA (2003), a porcentagem de ácido siálico no GMP está entre 7 e 8%. De acordo com esta afirmação 0,99g do teor total de ácido siálico da fração R30kDa correspondem a 12,37g de GMP provenientes desta fração. A fração R₂30kDa corresponde da mesma forma a 0,87g de GMP, totalizando 13,25g de GMP. Estes 13,25g de GMP são provenientes de 14 litros de soro, o que nos leva a ter 0,95g de GMP por litro de soro. Conforme OLIVA, ESCOBAR e PONCE (2002), o GMP está presente no soro na concentração de 1,2-1,5g/L de soro de leite. Desta forma temos um rendimento do processo de 63,33% se consideramos o valor máximo de 1,5g de GMP por litro de soro de leite ou 79,17% se consideramos o nível mais baixo reportado na literatura.

4.4 ISOLAMENTO DO GMP POR CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA

Os teores de ácido siálico e proteínas nos volumes totais tanto do soro inicial como nas frações eluídas e coletadas da coluna de cromatografia de troca-iônica encontram-se listados na Tabela 10 e a porcentagem de recuperação de ácido siálico e proteína nas frações nas Figuras 20 e 21.

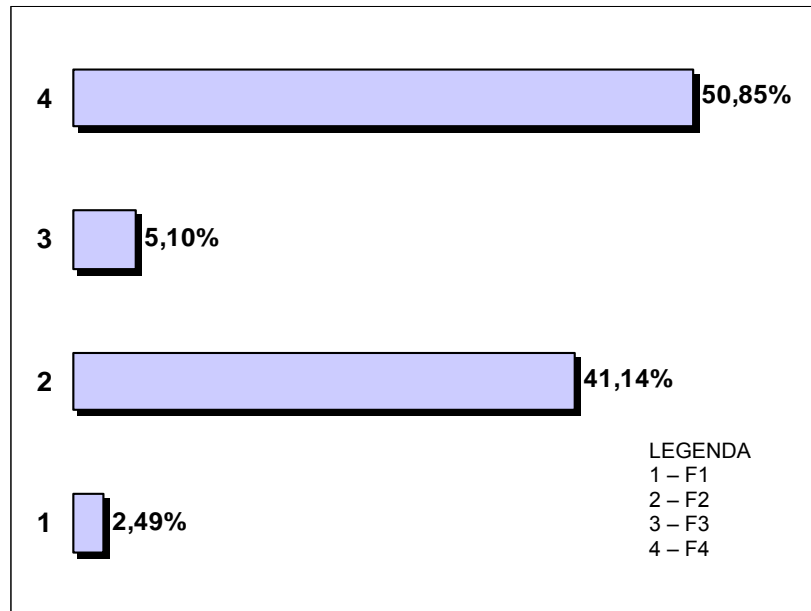
TABELA 10 - TEORES DE ÁCIDO SIÁLICO (mg) E PROTEÍNA (g) NOS VOLUMES TOTAIS DO SORO INICIAL E DAS FRAÇÕES ELUÍDAS DA COLUNA DE CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA E RELAÇÃO ÁCIDO SIÁLICO/PROTEÍNA (mg/g)

	ÁCIDO SIÁLICO NO VOLUME TOTAL* (mg)	PROTEÍNA NO VOLUME TOTAL* (g)	RELAÇÃO ÁCIDO SIÁLICO/PROTEÍNA (mg/g)
Soro Inicial	15,28 ± 0,13	0,63 ± 0	24,25
F1	0,38 ± 0,03	0,17 ± 0	2,23
F2	6,33 ± 0,03	0,34 ± 0	18,62
F3	0,78 ± 0,03	0,01 ± 0	78
F4	7,77 ± 0,05	0,04 ± 0	194,25

NOTAS: F1, F2, F3 e F4 – frações eluídas da coluna de cromatografia de troca-iônica.

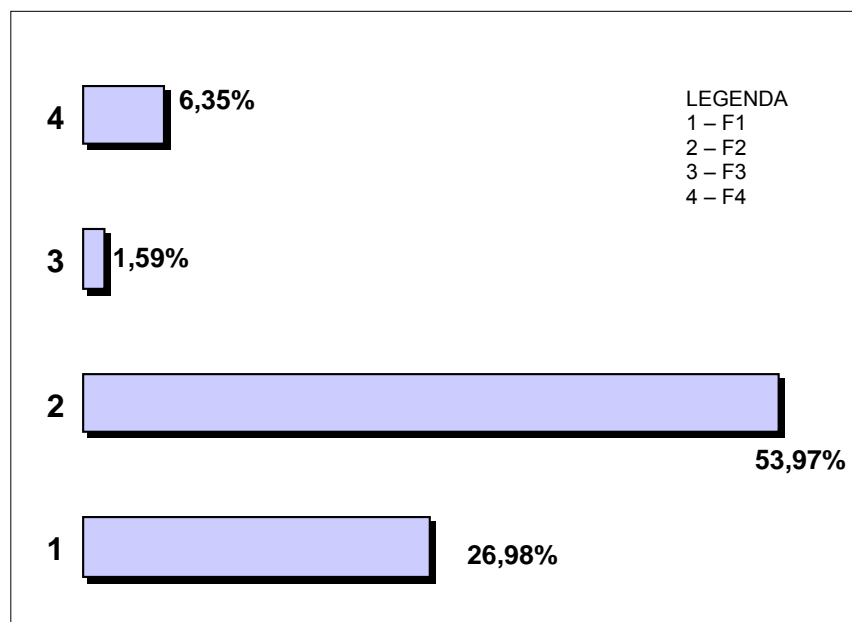
*Média de três repetições ± desvio-padrão.

FIGURA 20 - PORCENTAGEM DE RECUPERAÇÃO DE ÁCIDO SIÁLICO NAS FRAÇÕES ELUÍDAS DA COLUNA DE CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA



NOTAS: F1, F2, F3 e F4 - frações eluídas da coluna de cromatografia de troca-iônica DEAE-Sephacel em pH 3,5.

FIGURA 21 - PORCENTAGEM DE RECUPERAÇÃO DE PROTEÍNA NAS FRAÇÕES ELUÍDAS DA COLUNA DE CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA



NOTAS: F1, F2, F3 e F4 - frações eluídas da coluna de cromatografia de troca-iônica DEAE-Sephacel em pH 3,5.

Os dados constantes da Tabela 10 e analisando as Figuras 20 e 21 podemos verificar que a recuperação de ácido siálico, que é um indicativo da presença de GMP, foi maior na fração F4 com o percentual de 50,85% do inicial sendo encontrado nesta fração. Entretanto, 99,58% do ácido siálico e 88,89% da proteína iniciais foram recuperados nas frações coletadas (F1, F2, F3 e F4).

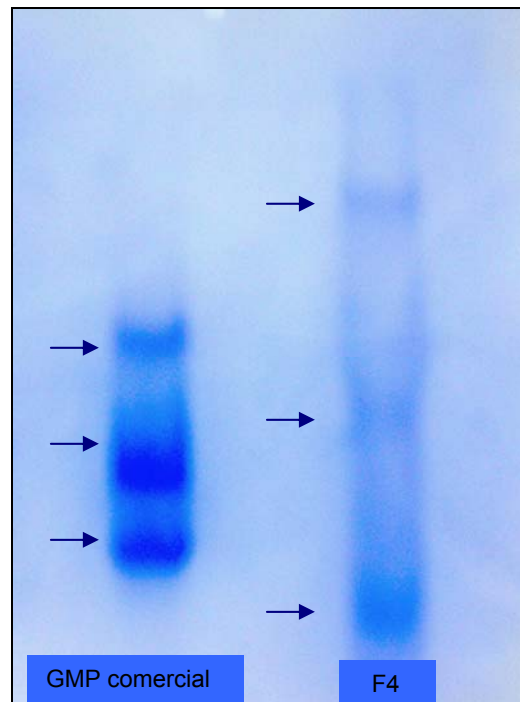
Após liofilização da fração F4 (por apresentar a maior relação ácido-siálico/proteína) foram obtidos 68,4mg do produto. De acordo com a Tabela 10 esta fração apresentou teor de ácido siálico de 7,77mg, correspondente a 113,50µg de ácido siálico por mg do produto obtido em pó. Este valor é superior ao relatado por alguns autores que tentando isolar o GMP conseguiram teores de 80,3µg/mg (KAWASAKI et al., 1992); 1,9 µg/mg (NAKANO e OZIMEK, 1999) e 77,5µg/mg (NAKANO e OZIMEK, 2000).

Comparando-se o produto obtido através do método de cromatografia de troca-iônica com os produtos obtidos utilizando ultrafiltração, este apresentou concentração 13 vezes mais elevada de ácido siálico por mg do produto quando comparado a fração R30kDa e cerca de seis vezes comparando-se à fração R₂30kDa.

O teor inicial de proteína contida na solução de soro utilizada para o isolamento do GMP por cromatografia de troca-iônica (0,63g) corresponde a 0,07 litro de soro, pois conforme RICHARDS (2002) o soro contém 0,9% de proteínas. Desta forma 7,77mg do ácido siálico contido na fração F4 são provenientes de 0,07 litros de soro, o que nos leva a 111mg de ácido siálico por litro de soro.

Conforme MARTÍN-DIANA, PELAEZ e REQUENA (2003), a porcentagem de ácido siálico no GMP está entre 7 e 8%. De acordo com esta afirmação 111mg de ácido siálico por litro de soro correspondem a 1387,3mg ou 1,39g de GMP por litro de soro, proveniente desta fração. Conforme OLIVA; ESCOBAR e PONCE (2002), o GMP está presente no soro na concentração de 1,2-1,5g/L de soro de leite. Desta forma temos um rendimento do processo de 92,67% se consideramos 1,5g de GMP por litro de soro de leite.

FIGURA 22 - PERFIS ELETROFORÉTICOS EM SDS/PAGE DO GMP COMERCIAL E DA FRAÇÃO F4 OBTIDA POR CROMATOLOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA



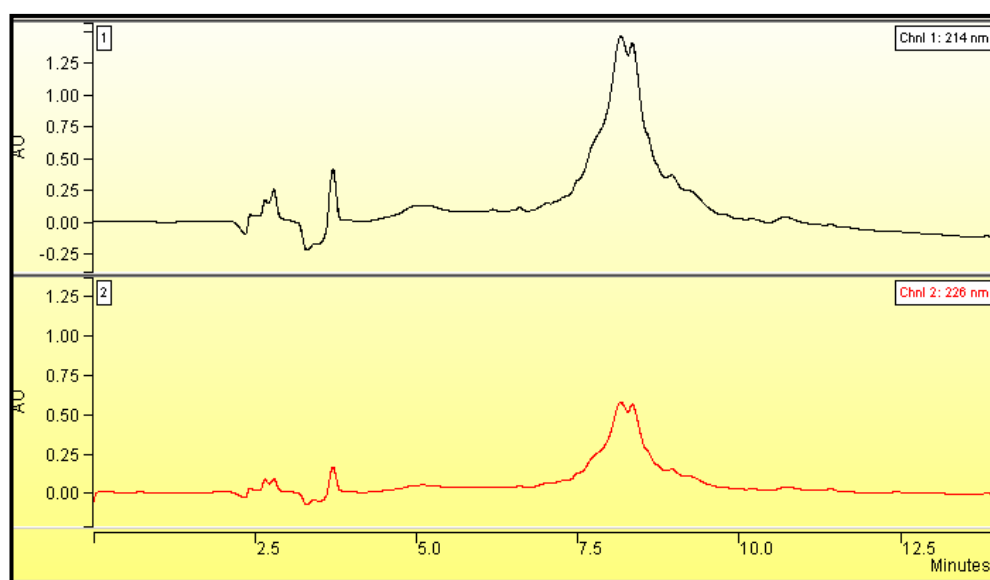
NOTAS: F4 - fração eluída da coluna de cromatografia de troca-iônica DEAE-Sephacel.

Na Figura 22 é apresentado o perfil eletroforético da fração F4 e do GMP comercial onde se pode notar três bandas distintas, porém comparando-se os dois produtos verifica-se que estas bandas não se apresentam na mesma altura umas das outras, o que pode indicar massas moleculares diferentes. Contudo, estes resultados são similares aos obtidos por MIKKELSEN et al. (2005). Segundo estes autores, diferentes valores de pH (2,5 – 3,4 e 6,6) produzem agregados de CMP de diferentes massas moleculares, ou promovem o aumento do volume hidrodinâmico do peptídeo.

Deve-se ressaltar que para o isolamento do GMP por cromatografia de troca iônica empregou-se pH 3,5, enquanto que no sistema de ultrafiltração o pH foi mantido em 6,2.

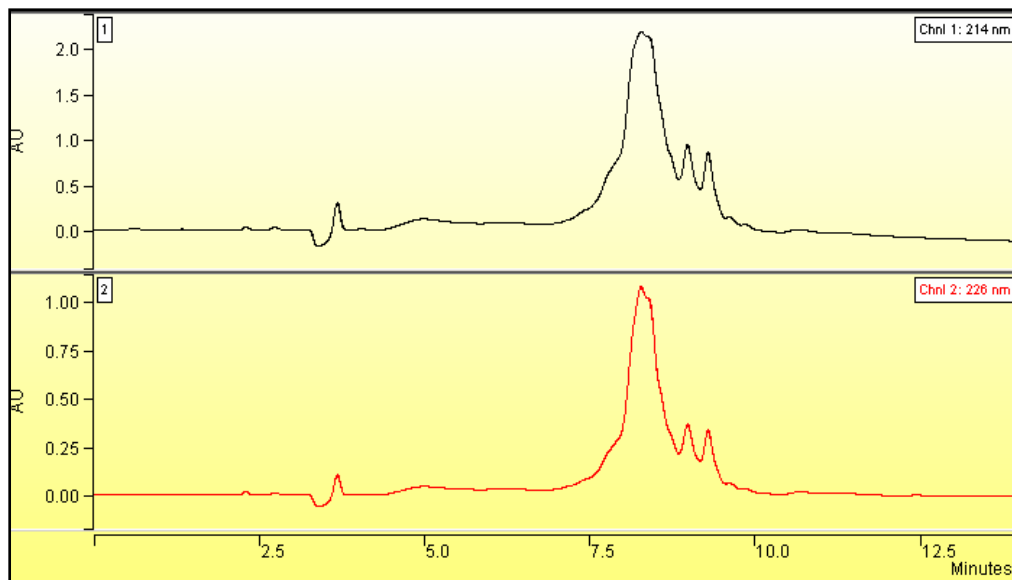
A Figura 23 é o perfil cromatográfico obtido por CLAE-FR da fração F4 que quando comparado com o perfil cromatográfico obtido do GMP comercial (Figura 17) nota-se diferenças em seus perfis o que pode explicar o aparecimento de bandas na eletroforese em alturas diferentes. Porém quando se compara com o perfil cromatográfico obtido por CLAE-FR do GMP padrão Sigma (Figura 24) pode-se perceber semelhanças em seus perfis.

FIGURA 23 - PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM FASE REVERSA DA FRAÇÃO F4 OBTIDA POR CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA



NOTAS: 1 – absorbâncias a 214nm; 2 – absorbâncias a 226nm.

FIGURA 24 - PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM FASE REVERSA DO GMP PADRÃO SIGMA



NOTAS: 1 – absorbâncias a 214nm; 2 – absorbâncias a 226nm.

Estas diferenças também são discutidas por MARTÍN-DIANA et al., 2006 onde os autores em seu trabalho concluem que a composição do GMP é variada e depende particularmente da fonte do soro e da tecnologia empregada para o seu isolamento.

Isto pode explicar a diferença nos perfis cromatográficos da fração F4 e rica em ácido siálico, obtida por cromatografia de troca iônica com o GMP comercial, que conforme descrição do produto (Anexo I) é obtido por ultrafiltração.

Pode-se também concluir que provavelmente, devido às semelhanças entre os perfis cromatográficos obtidos por CLAE-FR da fração F4 (Figura 24) isolada por cromatografia de troca-iônica com o perfil do GMP padrão Sigma (Figura 25), que o mesmo possa ser obtido também por este método.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos e apresentados neste trabalho permitem concluir que:

- 1 – O fator de retenção para o GMP utilizando membrana de ultrafiltração de 30kDa foi maior em pH7 seguido pelos pHs 5 e 3;
- 2 – O menor fator de retenção para o GMP obtido utilizando membrana de ultrafiltração de 30kDa em pH3 pode ser explicado pela solubilidade do GMP mínima neste pH;
- 3 - Análise estatística conduzida através do teste-T, para variáveis independentes, mostrou diferença estatisticamente significativa nos teores de proteína, gordura, cinzas e lactose dos soros de leite em pó utilizados para o isolamento do GMP por cromatografia de troca-iônica e por ultrafiltração;
- 4 – O tratamento térmico a 80°C por 30 minutos levou a uma maior desnaturação de proteínas do que o tratamento por 15 minutos nesta mesma temperatura;
- 5 – O perfil eletroforético das frações R30kDa e R₂30kDa foi semelhante ao perfil eletroforético do GMP comercial;
- 6 – Leituras realizadas a 214nm apresentaram-se mais sensíveis para a determinação dos perfis cromatográficos por CLAE-FR dos produtos obtidos;
- 7 – Os perfis cromatográficos obtidos por CLAE-FR das frações R30kDa e R₂30kDa foram semelhantes ao perfil cromatográfico do GMP comercial, entretanto diferem da literatura;
- 8 – Os teores de ácido siálico em µg por mg das frações obtidas por ultrafiltração foram inferiores aos da fração obtida por cromatografia de troca-iônica, porém encontraram-se dentro da faixa reportada por alguns autores;
- 9 – O rendimento do processo realizado por ultrafiltração foi de 63,33% se considerado o valor máximo de 1,5g de GMP por litro de soro de leite ou 79,17% se considerado o nível mais baixo reportado na literatura, com 0,95g de GMP sendo obtido por litro de soro de leite;
- 10 - A análise estatística pelo teste-T, para variáveis independentes, revelou diferença significativa na composição final dos retentados de 30kDa em decorrência do tempo de aquecimento (15 ou 30 min).

11 – Três bandas foram observadas examinando o perfil eletroforético da fração isolada por cromatografia de troca-iônica, porém encontradas em alturas diferentes em relação ao GMP comercial;

12 – O perfil cromatográfico obtido por CLAE-FR da fração isolada por cromatografia de troca-iônica apresentou diferenças quando comparado ao GMP comercial, porém apresenta semelhanças quando comparado ao perfil cromatográfico do GMP padrão Sigma;

13 – O rendimento do processo realizado por cromatografia de troca-iônica foi de 92,67% com 1,39g de GMP sendo obtido por litro de soro de leite.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho teve como objetivos o isolamento e a caracterização do GMP obtido a partir do soro de leite.

Pode-se sugerir que após o ajuste do método de isolamento do GMP por ultrafiltração, com a junção das frações R30kDa e R₂30kDa e concentração destas frações em proteína e retirada da lactose, através de diafiltrações adicionais em membrana de menor “cut off”, poder-se-ia obter um produto mais apropriado aumentando o rendimento do processo. Esta observação aponta para a necessidade da continuidade do trabalho.

O produto assim obtido pode ser empregado para o estudo de suas propriedades tecnológicas, nutricionais e atividades biológicas citados por diversos autores, assim como ser utilizado para o desenvolvimento de produtos para os mais diversos fins.

Do ponto de vista do agronegócio, a metodologia proposta para o isolamento do GMP a partir do soro de leite, contribui para a agregação de valor a este subproduto da indústria de laticínios.

REFERÊNCIAS

- AIMUTES, W. R. Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticariogenesis. **The Journal of Nutrition**, v.134, p.989-995, 2004.
- ALMEIDA, E.S. **Tratamento do efluente da indústria de queijos por processos biológicos e químicos**. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas, 2004.
- ANDERSON, G. H.; MOORE, S. E. Dietary proteins in the regulation of food intake and body weight in humans. **The Journal of Nutrition**, v.134, p.974-979, 2004.
- ANUÁRIO MILKBIZZ. São Paulo: Editora Milkbizz Ltda, 2005.
- AOAC (2000) **Official Methods of Analysis of AOAC Internacional**. 17th ed. Gaithersburg, MD: Association of Official Analytical Chemists.
- AYERS, J.; COOLBEAR, K.; ELGAR, D.; PRITCHARD, M. **Process for isolating glycomacropeptide from dairy products with a phenylalanine impurity of 0,5% w/w**. World Patent WO 98/14071, 1998.
- BASSETTI, F.J. **Preparação, caracterização e aplicação de membranas poliméricas microporosas assimétricas**. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas, 2002.
- BERROCAL, R; NEESER, J.R. **Production of kappa-caseino-glycomacropeptide**. United States Patent 5.216.129, 1993.
- BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. **Introdução à química de alimentos**. São Paulo: Varela; 1992.
- BORGES, P.F.Z.; SGARBIERI, V.C.; DIAS, N.F.G.P.; JACOBUCCI, H.B.; PACHECO, M.T.B.; BALDINI, V.L.S. Produção piloto de concentrados de proteínas de leite bovino: composição e valor nutritivo. **Brazilian Journal of Food Technology**. v.4, p.1-8, 2001.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Portaria nº124 de 23 de setembro de 1991. Aprova método analítico qualitativo e quantitativo de detecção de soro em leite. **Diário Oficial da União**, Brasília, 20 de novembro de 1991.
- BRODY, E.P. Biological activities of bovine glycomacropeptide. **British Journal of Nutrition**, v. 84, suppl.1, p.39-46, 2000.
- BURRINGTON, K. J. The whey to nutrition. **Dairy Pipeline**, v.14, n.2, p.01-03, 2002.
- CARVALHO, J.D.G. **Avaliação da qualidade de queijo tipo minas frescal elaborados por diferentes processos tecnológicos e comercializados em Campinas–SP**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas, 2003.

CASAL, E.; CORZO, N.; MORENO, F.J.; OLANO, A. Selective recovery of glycosylated caseinmacropeptide with chitosan. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.1201-1204, 2005.

CHOBERT, J.; TOUATI, A.; BERTRANDHARB, C.; DALGALARRONDO, M. NICOLAS, M. Solubility and emulsifying properties of kappa-casein and its caseinomacropeptide. **Journal of Food Biochemistry**, v.13, p.457-473, 1989.

CHU, L.; MACLEOD, A; OZIMEK, L. Isolation of glycomacropeptide from sodium caseinate hydrolysate solution by ultrafiltration. **Milchwissenschaft**, v.51, n.6, p.303-306, 1996.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 1995.

DOSAKO, S.; NISHIYA, T.; DEYA, E. **Process for the production of kappa-casein glycomacropeptide**. United States Patent 5.061.622, 1991.

DOUTANI, S.; TURHAN, K.N.; ETZEL, M.R. Whey protein isolate and glycomacropeptide recovery from whey using ion exchange chromatography. **Journal of Food Science**, v.68, n.4, p.1389-1395, 2003.

DOULTANI, S.; TURHAN, N.; ETZEL, M.R. Fractionation of proteins from whey using cation exchange chromatography. **Process Biochemistry**, v.39.p.1737-1743, 2004.

ETZEL, M.R. **Production of k-casein macropeptide for nutraceutical uses**. United States Patent 5.968.586, 1999.

ETZEL, M.R. **Production of substantially pure kappa casein macropeptide**. United States Patent 6.168.823 B1, 2001.

EUSTACHE, J.M. **Extraction of glycoproteins and siálico acid from whey**. United States Patent 4.042.575, 1977.

FARRO, P.C.A. **Ultrafiltração de soro de queijo minas frescal pré-tratado e microfiltrado: efeitos da vazão volumétrica e da pressão transmembrana no fluxo de permeado**. Campinas, 2003. 148p. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. 2003.

FENNEMA, O.R. **Química de los Alimentos**. Espanhã: Editora Acribia S.A., 2000.

FOLIN, O.; WU, H. A simplified e improved method for the determination of sugar. **Journal Biol. Chemistry**, v.41, p.367-374, 1920.

FUKUDA, S.P. **Estudo de metodologia quantitativa para determinação espectrofotométrica de ácido siálico em leite**. Campinas, 1994. 142p. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. 1994.

FUKUDA, S.P.; ROIG, S.M.; PRATA, L.F. Correlation between acidic ninhydrin and HPLC methods to evaluate fraudulent addition of whey in milk. **Lait.**, v.84, p.501-512, 2004.

FURLANETTI, A.M.; PRATA, L.F. Free and Total GMP (Glycomacropeptide) contents of milk during bovine lactation. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v.23, p.121-125, 2003.

GALINDO-AMAYA, L.M.; VALBUENA-COLMENARES, E.; ROJAS-VILLARROEL, E. Estandarización de la detección del glicomacropéptido por PAGE-SDS como índice de adulteración de leche. **Revista Científica, FCV-LUZ**, v.XVI, n.3, p.308-314, 2006.

GEAFILTRATION. Disponível em: <http://www.geafiltration.com/index.html>. Acesso em 27 de janeiro de 2006.

GIROTO, J.M. **Soro de leite nos laticínios do estado do Paraná: potencial, oportunidades e restrições**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná, 2001.

GUSTAFSON, D. R.; MCMAHON, D. J.; MORREY, J.; NAN, R. Appetite is not influenced by a unique milk peptide: caseinomacropeptide (CMP). **Appetite**, v.36, p.157-163, 2001.

HOLST, H. H.; CHATTERTON, D. E. W. **Process for preparing a kappa-caseino glycomacropeptide or a derivative thereof**. United States Patent 6.462.181 B1, 2002.

IJIMA, R; TAKAHASHI, H; NAMME, R. IKEGAMI, S.; YAMAZAKI, M. Novel biological function os siálico acid (N-acetylneuraminic acid) as a hydrogen peroxide scavenger. **FEBS Letters**, v.561, p.163-166, 2004.

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

KAWASAKI, Y.; ISODA, H.; TANIMOTO, M.; DOSAKO, S. IDOTA, T.; AHIKO, K. Inhibition by lactoferrin and kappa-casein glycomacropeptide of binding of cholera toxin to its receptor. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.56, n.2, p.195-198, 1992.

KAWASAKI, Y; KAWAKAMI,H.; TANIMOTO, M.; DOSAKO, S.; TOMIZAWA, A.; KOTAKE, M.; NAKAJIMA, I. pH-independent molecular weight changes of κ -casein glycomcacropeptide and its preparation by ultrafiltration. **Milchwissenschaft**, v.48, n.4, p.191-195, 1993a.

KAWASAKI, Y., ISODA, K., SHINMOTO, H., TANIMOTO, M., DOSAKO, S., IDOTA, T.; NAKAJIMA, I. Inhibition by κ -casein glycomacropeptide and lactoferrin of influenza virus hemagglutination. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.57, p.1214-1215, 1993b.

KELLEHER, S.L.; CHATTERTON, D.; NIELSEN, K.; LONNERDAL, B. Glycomacropeptide and α -lactalbumin supplementation of infant formula affects growth and nutritional status in infant rhesus monkeys. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.77, p.1261-1268, 2003.

KELLY, P.M.; KELLY, J.; MEHRA, R.; OLDFIELD, D.J.; RAGGETT, E.; O'KENNEDY, B.T. Implementation of integrated membrane processes for pilot scale development of fractionated milk components. **Lait**, v.80, p.139-153, 2000.

KORHONEN, H.; PIHLANTO, A. Bioactive peptides: production and functionality. **International Dairy Journal**, v.16, p.945-960, 2006.

KULOZIK, U.; GUILMINEAU, F. Food process engineering and dairy technology at the Technical University of Munich. **International Journal of Dairy Technology**, v.56, n.4, p.191-198, 2003.

KUSSENDRAGER, K.D.; VAN HOOIJDONK, A.C.M. Lactoperoxidase: physico-chemical properties, occurrence, mechanism of action and applications. **British Journal of Nutrition**, v.84, p.S19-S25, 2000.

LAWRENCE, N.D.; LYER, M.; MICKEY, M.W.; STEVENS, G.W.; PERERA, J.M. Cleaning and storage of UF membrane. **Australian Journal of Dairy Technology**, v.53, n.2, p.134, 1998.

LI, E.W.Y.; MINE, Y. Comparison of chromatographic profile of glycomacropeptide from cheese whey isolated using different methods. **Journal Dairy Science**, v.87, p.174-177, 2004.

LIESKE, B.; KONRAD, G.; KLEINSCHMIDT, T. H. Isolation of caseinmacropeptide from rennet whey by a multi-stage ultrafiltration process. Influence of pH and heating on the carbohydrate moiety of glycomacropeptide. **Milchwissenschaft**, v.59, p.291-294, 2004.

LIOBRÁS. Manual de instruções: Liofilizador L101. Disponível em www.liobras.com.br. Acesso: março de 2005.

LIPNIZKI, F. Industrial applications of ultrafiltration in pharmaceutical biotechnology. **Eng. Life Science**, v.5, n.1, p.81-83, 2005.

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

MARTÍN-DIANA, A.B.; PELAEZ, C.; REQUENA, T. Rheological and structural properties of fermented goat's milk supplemented with caseinmacropeptide and whey protein concentrate. **Journal of Dairy Science**, v.86, n.5, p.1535-1540, 2003.

MARTIN-DIANA A. B. ; FRIAS J. ; FONTECHA J. ; Emulsifying properties of whey protein concentrate and caseinomacropeptide of cow, ewe and goat. **Milchwissenschaft**, v.60, n.4, p.363-366, 2005.

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

MAUBOIS, J.L. Membrane microfiltration: a tool for a new approach in dairy technology. **Australian Journal of Dairy Technology**, v.57, n.2, p.92-95, 2002.

MCINTOSH, G.H.; ROYLE, P.J.; CLIFTON, P. Whey proteins-GMP, body fat reduction and altered insulin status in rats. **Asia Pac. Journal of Clinical Nutrition**, v.14, p.S67, 2005.

MIKKELSEN, T.L.; FROKIAER, H.; TOPP, C. BONOMI, F.; IAMETTI, S.; PICARIELLO, G. Caseinomacropeptide self-association is dependent on whether the peptide is free or restricted in κ -caseína. **Journal Dairy Science**, v.88, p.4228-4238, 2005.

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

MOLLÉ, D; LÉONIL, J. Quantitative determination of bovine κ -casein macropeptide in dairy products by Liquid chromatography/Electrospray coupled to mass spectrometry (LC-ESI/MS) and Liquid chromatography/Electrospray coupled to tandem mass spectrometry (LC-ESI/MS/MS). **International Dairy Journal**, v.15, p.419-428, 2005.

MORENO, F.J.; LÓPEZ-FANDIÑO, R.; OLANO, A. Characterization and functional properties of lactosyl caseinomacropeptide conjugates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.18, p.5179-5184, 2002.

MORR, C.V.; SEO, A. Fractionation and characterization of glycomacropeptide from caseinate and skim milk hydrolysates. **Journal of Food Science**, v.53, n.1, p.80-87, 1988.

MOSQUEDA-JIMENEZ, D.B.; HUCK, M. Fouling analysis of ultrafiltration and nanofiltration membranes. **Water Practice and Technology**, v.1, n.4, p.85-92, 2006.

NAKANO, T.; OZIMEK, L. Gel chromatography of glycomacropeptide (GMP) from sweet whey on Sephacryl S-200 at different pH's and on Sephadex G-75 in 6M guanidine hydrochloride. **Milchwissenschaft**, v.53, n.11, p.629-632, 1998.

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

NAKANO, T.; OZIMEK, L. Purification of glycomacropeptide from caseinate hydrolysate by gel chromatography and treatment with acidic solution. **Journal of Food Science**, v.65, n.4, p.588-590, 2000.

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

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

NAOUM, P.C. **Eletroforese – Técnicas e Diagnósticos**. São Paulo: Livraria e Editora Santos, 1990.

NIELSEN, P.; TROMHOLT, N. **Method for production of a kappa-casein glycomacropeptide and use of a kappa-casein glycomacropeptide**. World Patent WO 94/15952, 1994.

NOBLE, R.D.; STERN, S.A. **Membrane Separations Technology – Principles and Applications**. Elsevier Science B.V.: Amsterdam, 718p., 1995.

OLIVA, Y.; ESCOBAR, A.; PONCE, P. Caseinomacropéptido bovino: una alternative para la salud. **Rev. Salud Anim.**, v.24, n.2, p.73-81, 2002.

PESSEN, H.; PURCELL, J.M.; FARREL, H.M. Proton relaxation rates of water in dilute solutions of β -lactoglobulin. Determination of cross relaxation and correlation with structural changes by use of two genetic variants of a self-associating globular protein. **Biochimica et Biophysic Acta**, v.828, p.1-12, 1985.

RICHARDS, N.S.P.S. Uso racional de soro lácteo. **Revista Indústria de Laticínios**, v.2, n.9, p. 67-69, 1997.

RICHARDS, N.S.P.S. Soro Lácteo: Perspectivas Industriais e Proteção ao Meio Ambiente. **Food Ingredients**, v.3, n.17, p.20-27, 2002.

RODRIGUES, S.L.C.; MOREIRA, R.L.S.; CARDOSO, H.C.; MERÇON, F. Avaliação de parâmetros de ultrafiltração de suco de banana. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v.23, p.98-101, 2003.

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

SEADER, J.D.; HENLEY, E.J. **Separation Process Principles**. Ed. John Wiley & Sons, Inc.: New York, 886p., 1998.

SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos: Propriedades, Degradações e Modificações**. São Paulo: Livraria Varela, 1996.

SGARBIERI, V.C. Revisão: Propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 8, n. 1, p.43-56, 2005.

SILVA JÚNIOR, J. G. da. **Cromatografia de Proteínas – Guia Teórico e Prático**. Rio de Janeiro: Editora Interciência Ltda, 2004.

SIMPSON, K.J.; NICHOLAS, K.R. The comparative biology of whey proteins. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v.7, p. 313-326, 2002.

SMITH, M.; EDWARDS, P.J.B.; PALMANO, K.T.; CREAMER, L.K. Structural features of bovine caseinomacropeptide A and B by ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Journal of Dairy Research**, v.69, p.85-94, 2002.

SOORO. A Dádiva do Soro de Leite. Disponível em: <http://www.sooro.com.br/new/index.html>. Acesso em janeiro de 2007.

STAN, E.Y. GROISMAN, S.D.; KRASIL'SHCHIKOV, K.B.; CHERNIKOV, M.P. Effect of k-casein glicomacropeptide on gastrointestinal motility. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v.96, n.1, p.889-891, 1983.

TANIMOTO, M.; KAWASAKI, Y.; SHINMOTO, H.; DOSAKO, S.; TOMIZAWA, A. **Process for producing kappa-casein glycomacropeptides**. European Patent 0393850A2, 1990.

TANIMOTO, M.; KAWASAKI, Y.; SHINMOTO, H.; DOSAKO, S.; TOMIZAWA, A. **Process for producing kappa-casein-glycomacropeptide**. United States Patent 5.075.424, 1991.

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

TEIXEIRA, M.M.C.G.R. **Ultrafiltração no tratamento de água para consumo humano**. Dissertação de mestrado. Universidade Nova de Lisboa, 2001.

THOMÄ, C; KRAUSE, I.; KULOZIK, U. Precipitation behaviour of caseinomacropeptides and their simultaneous determination with whey proteins by RP-HPLC. **International Dairy Journal**, v.16, p.285-293, 2006.

THOMÄ-WORRINGER, C.; SORENSEN, J.; LÓPEZ-FANDINÓ, R. Health effects and technological features of caseinomacropeptide. **International Dairy Journal**, v. 16, p.1324-1333, 2006.

TIMMER, C.J. **Dental care product**. European Patent Application 1449513, 2004.

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

VASBINDER, A.J.; ROLLEMA, H.S.; KRUIF, C.G. Impaired rennetability of heated milk; study of enzymatic hydrolysis and gelation kinetics. **Journal Dairy Science**, v.86, p.1548-1555, 2003.

VEITH, P.D.; REYNOLDS, E.C. Production of a high gel strength whey protein concentrate from cheese whey. **Journal Dairy Science**, v.87, n.4. p.831-840, 2004.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade e ao tratamento de esgotos**. Editora UFMG: Belo Horizonte, v.1, 3^aed., 2005.

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

WARREN, L. The thiobarbituric acid assay of sialic acids. **The Journal Biological and Chemistry**, v. 234, n. 8, p. 1971-1975, 1959.

WONG, P.Y.Y.; NAKAMURA, S.; KITTS, D.D. Functional and biological activities of casein glycomacropeptide as influenced by lipophilization with medium and long chain fatty acid. **Food Chemistry**, v. 97, p. 310-317, 2006

ZHANG, Y. P.; GAFFAR, A. **Fluoride free dental remineralization**. United States Patent 6.207.138, 2001.

ZHANG, Y. P.; GAFFAR, A. **Storage stable dentrifice composition containing an antibacterial casein glycomacropeptide adjuvant**. United States Patent 5.741.773, 1998a.

ZHANG, Y. P.; GAFFAR, A. **Fluoride dentifrices of enhanced efficacy**. United States Patent 5.853.704, 1998b.

ZYDNEY, A.L. Protein separations using membrane filtration: New opportunities for whey fractionation. **International Dairy Journal**, v.8, p.243-250, 1998.

ANEXO 1 - INFORMAÇÃO NUTRICIONAL DO GLICOMACROPEPTÍDEO
COMERCIAL

LACPRODAN® CGMP-10

CASEINO GLYCO MACRO PEPTIDES

Description

Lacprodan® CGMP-10 has a very high content of caseino glyco macro peptides (CGMP) obtained by ultrafiltration and fractionation. The component is a bioactive milk fraction and is also useful for nutrition to phenylketoneurics.

Chemical Specifications

Protein (N x 6.38) d.m.	85±2 %
as is	82±2 %
Lactose	max. 2.0 %
Fat	max 0.5 %
Ash	approx. 6.5 %
Moisture	max. 5.5 %

CGMP content (of protein)	80±5 %
Sialic acids	approx. 4.2 %

Minerals (approx. values)

Sodium	Na	0.4 %
Magnesium	Mg	0.2 %
Phosphorus	P	0.5 %
Chloride	Cl	0.05 %
Potassium	K	0.1 %
Calcium	Ca	1.7 %

Physical Specifications

pH (10% solution)	6.4-6.9 %
Solubility index	max. 1.0 ml
Scorched particles	disc A

Microbiological Specifications

Total plate count	< 5000/g
Bacillus cereus	< 10/g
Coliform	< 10/g
Staph.aureus coag.+	neg. in 1 g
Mould/Yeast	< 10/g
Salmonella	neg. in 100 g

Packaging

Bags containing 10 kg net.

Storage

Store in closed bags under cool, dry conditions, away from strong odours.

Shelf Life

Minimum two years if kept under the prescribed storage conditions.

Application Areas

1. PKU.
2. Clinical foods.
3. Oral hygiene.
4. Cosmetics products.
5. Weight management.

Amino Acids

Typical amino acid composition
mg amino acid/g protein

Alanine	51
Arginine	8
Aspartic acid (asparagine)	92
Cysteine (cystine)	7
Glutamic acid (glutamine)	196
Glycine	13
Histidine	* 4
Isoleucine	* 101
Leucine	* 44
Lysine	* 68
Methionine	* 18
Phenylalanine	11
Proline	99
Serine	* 67
Threonine	* 137
Tryptophan	* 5
Tyrosine	7
Valine	* 77

Total BCAA/TAA: 22.2 %

* Essential amino acids

Product Information - Nutrition

PI 10 000 E 08-03 0062

Arla Foods Ingredients a.m.b.a.
Head Office:
Skanderborgvej 277, DK-8260 Viby J.
Denmark
Tel.: +45 89 38 15 00
Fax: +45 88 28 18 38

Arla Foods Ingredients
The essence of quality

