

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DOS ALIMENTOS**

**ISOLAMENTO DA β -LACTOGLOBULINA DO SORO
DO LEITE POR CROMATOGRAFIA IÔNICA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Susana Berleze de Pelegrini

**Santa Maria, RS, Brasil
2013**

ISOLAMENTO DA β -LACTOGLOBULINA DO SORO DO LEITE POR CROMATOGRAFIA IÔNICA

Susana Berleze de Pelegrini

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Área de Concentração em Qualidade de Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**.

Orientador: Prof. Dr. José Laerte Nörnberg

**Santa Maria, RS, Brasil
2013**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Pelegriani, Susana Berleze de
ISOLAMENTO DA BETA-LACTOGLOBULINA DO SORO DO LEITE
POR CROMATOGRAFIA IÔNICA / Susana Berleze de Pelegriani.-
2013.
56 p. ; 30cm

Orientador: Prof. Dr. José Laerte Nörnberg
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 2013

1. Cromatografia 2. Leite humano 3. Proteínas do leite
4. Substitutos do leite humano I. Nörnberg, Prof. Dr.
José Laerte II. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos
Alimentos**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de
Mestrado

**ISOLAMENTO DA β -LACTOGLOBULINA DO SORO DO LEITE POR
CROMATOGRÁFIA IÔNICA**

elaborada por:
Susana Berleze de Pelegrini

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos

Comissão Examinadora

José Laerte Nörnberg, Dr.
(Presidente/Orientador)

Viviani Ruffo de Oliveira, Dr.^a (UFRGS)

Cláudia Severo da Rosa, Dr.^a (UFSM)

Santa Maria, 28 de junho de 2013.

Aos meus pais, Irene Berleze de Pelegrini e Élvio O. B. de Pelegrini, pelo amor incondicional e exemplo de vida e família!

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradecer parece ser tão fácil, mas ao expressar, em poucas palavras, toda a gratidão que sinto por pessoas tão especiais que, de uma forma ou de outra, colaboraram para a realização deste trabalho torna-se uma tarefa difícil. Abaixo deixo registrado o meu MUITO OBRIGADA:

A Deus, pela vida.

A meus pais, por tudo o que eles representam para mim, pelo exemplo, pelo apoio e incentivo constantes, pela luta de cada dia para poder me proporcionar a melhor formação possível.

A toda minha família, por todos os momentos compartilhados, saibam que tenho muito orgulho de fazer parte desta família, pois foi com todos vocês que aprendi o que significa amor e união.

A UFSM e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos pela oportunidade de crescimento técnico-científico.

Ao meu orientador, Professor Dr. José Laerte Nörnberg, pela paciência, conhecimento, confiança e acima de tudo pela oportunidade de tornar este sonho realidade.

Ao CPQBA/UNICAMP especialmente a Divisão de Microbiologia, pela disposição dos laboratórios.

Ao Professor Alexandre Nunes Ponezi, por ter sido meu “anjo da guarda” na realização de todo este trabalho, pelo conhecimento compartilhado e pela paciência de ensinar como um Doutor que realmente és.

A toda equipe do CPQBA/UNICAMP, pela acolhida durante os dias que passei em Campinas, podem ter certeza que tornaram meus dias muito mais agradáveis com a companhia de vocês.

A Ana, ao Diego e a Mariana, que muito me ajudaram nas análises físico-químicas.

As minhas amigas Camila, Carla, Deise, Denise e Mari Ane, minhas colegas de profissão e amigas para toda a vida, pelo companheirismo, pelas conversas e conselhos que ajudaram a diminuir meus momentos de estresse.

A toda equipe do Serviço de Nutrição e Dietética do Hospital Universitário de Santa Maria que me fazem ter a certeza de ter realizado a escolha da profissão certa e me dão o prazer de exercê-la em um meio de amizade e respeito. A minha chefe Sabrina, pela liberação da redução de carga horária, pela compreensão, apoio e por tornar as minhas batalhas as suas batalhas também. As minhas colegas “NUTRIS DO HUSM” Aline, Andréa, Camila, Lori, Lúcia, Maria Amália, Michelle, Sabrina, Silvia, Taiana, Thaís e Vanessa que além de colegas também são minhas amigas, companheiras de choro e de muitas risadas, agradeço pela paciência, apoio e incentivo, quero dizer que admiro muito todas vocês profissionais de alto gabarito tanto profissional quanto pessoal.

*“Quando você acha que sabe todas as respostas,
vem a vida e muda todas as perguntas.”*

Bob Marley

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos
Universidade Federal de Santa Maria

ISOLAMENTO DA β -LACTOGLOBULINA DO SORO DO LEITE POR CROMATOGRAFIA IÔNICA

AUTORA: SUSANA BERLEZE DE PELEGRINI

ORIENTADOR: José Laerte Nörnberg

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 28 de junho de 2013.

A alergia à proteína do leite de vaca atinge 2 a 5% dos lactentes e desencadeia sintomas que podem variar de leve a risco de vida. A β -lactoglobulina é a fração protéica mais alergênica do soro do leite. Vários processos foram desenvolvidos para a separação e purificação protéica, dentre eles a cromatografia de troca iônica. O objetivo deste trabalho foi realizar a separação da β -lactoglobulina do concentrado protéico do soro do leite através de cromatografia de troca iônica, visando aplicação em fórmulas lácteas. Foram realizadas análises físico-químicas do concentrado protéico, separação da β -lactoglobulina por cromatografia de troca iônica, análise do perfil de aminoácidos e da quantidade final de β -lactoglobulina no produto obtido e em duas fórmulas lácteas hipoalergênicas. A partir dos resultados encontrados no presente estudo, pode-se verificar que foi possível separar a fração protéica de β -lactoglobulina do concentrado protéico do soro do leite através do processo de cromatografia iônica. A proteína obtida através deste processo demonstrou possuir uma ótima fonte de aminoácidos ao ser comparada com as fórmulas lácteas hipoalergênicas.

Palavras-chave: Cromatografia. Leite humano. Proteínas do leite. Substitutos do leite humano.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Post-Graduate Program in Food Science and Technology
Federal University of Santa Maria

ISOLATION OF β -LACTOGLOBULIN FROM WHEY BY ION CHROMATOGRAPHY

AUTHOR: SUSANA BERLEZE DE PELEGRINI

ADVISOR: José LaerteNörnberg

Date and Place of Defense: Santa Maria, June 28th 2013

The allergy to the cow's milk protein affects 2 to 5% from the infants and its symptoms can vary from minor to life threatening. β -lactoglobulin is the protein fraction more allergenic from the whey. Many processes were developed for the separation and purification of proteins and among them is the ion exchange chromatography. The objective of this work was to obtain the separation of β -lactoglobulin from the whey protein concentrate by ion exchange chromatography, aiming the application in milk formulas. Physical-chemical analysis of the protein concentrate, separation of β -lactoglobulin by ion exchange chromatography, analysis of amino acids profile and of the final amount of β -lactoglobulin in the resulting product and in two hypoallergenic infant formulas were performed. From the results in this study, it is possible to ascertain that it was feasible to separate the protein fractions of β -lactoglobulin by the ion chromatography process. The protein obtained by this process was proven to be a great amino acid source compared to the hypoallergenic infant formulas.

Keywords: Chromatography. Human milk. Milk proteins. Human milk substitutes.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO

- Figura 1 – Fracionamento das proteínas do soro do leite por cromatografia de troca iônica. Amostra do concentrado protéico do soro do leite aplicado em coluna preparativa com resina Q Sepharose fast flow em sistema FPLC (Pharmacia) previamente equilibrada com tampão Tris-HCl pH 7,0. A coluna foi submetida a um gradiente linear de NaCl..... 42
- Figura 2 – Perfil eletroforético (SDG PAGE) da α -lactalbumina obtida por cromatografia iônica a partir do CPS. Linha 1 padrão Sigma (mistura de proteínas incluindo 6 bandas de referência: 20,7, 28,8, 34,3, 50, 77, 103 kD), Linha 2 fração protéica 1 de α -lactalbumina em 5 mg, Linha 3 repetição da fração protéica 1 em 5 mg, Linha 4 concentrado protéico do soro do leite em 5 mg, Linha 5 fração protéica 1 de α -lactalbumina em 10 mg, Linha 6 repetição da fração protéica 1 em 10 mg e Linha 7 concentrado protéico do soro do leite em 10 mg..... 43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentração das principais proteínas no leite humano e no leite de vaca.....	19
Tabela 2 – Composição de aminoácidos do leite humano.....	21
Tabela 3 – Requerimento de proteínas e aminoácidos para lactentes, crianças e adolescentes.....	21

ARTIGO

Tabela 1 – Composição Centesimal do Concentrado Protéico do Soro do Leite.....	44
Tabela 2 – Perfil de aminoácidos do concentrado protéico após remoção da β -lactoglobulina e das fórmulas lácteas hipoalergênicas NAN HA e Aptamil HA.....	45
Tabela 3 – Valores médios de aminoácidos em relação aos diferentes grupos..	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

β -LG – β -lactoglobulina

α -LA – α -lactalbumina

CPS – Concentrado protéico do soro do leite

AA – Alergia alimentar

IgE – Imunoglobulina E

APLV – Alergia à proteína do leite de vaca

FPLC – *Fast Protein Liquid Chromatography*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Alergia à proteína do leite de vaca (APLV).	16
2.2 Fórmulas lácteas	18
2.3 Necessidades protéicas no primeiro ano de vida	20
2.4 Proteínas do soro do leite	21
2.4.1 β -Lactoglobulina	22
2.4.2 α -Lactalbumina	23
2.5 Cromatografia de troca iônica	24
3 RESULTADOS CIENTÍFICOS	26
3.1 Artigo	27
Resumo	28
Introdução.	29
Parte Experimental	31
Resultados e Discussão	35
Conclusão	38
Referências Bibliográficas	39
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

1 INTRODUÇÃO

O leite de vaca contém mais de vinte proteínas que podem causar reações alérgicas, as principais são as caseínas e as proteínas do soro do leite. A fração de caseína constitui 80% das proteínas totais e é fracionada em α S1-, α S2-, β - e κ -caseína. As proteínas do soro do leite são menos abundantes (20% do total) e incluem a β -lactoglobulina (β -LG), a α -lactalbumina (α -LA), a albumina sérica bovina e as imunoglobulinas (EL-AGAMY, 2007; RESTANI et al., 2009).

A alergia à proteína do leite de vaca (APLV) é uma reação adversa a esse alimento, com envolvimento do sistema imune por mecanismos imunológicos mediados ou não pela imunoglobulina E (IgE) afetando diversas crianças nos primeiros anos de vida. Essas reações ocorrem em crianças geneticamente predispostas, ocasionando o aparecimento de manifestações cutâneas (urticária, prurido, angioedema, eritema), gastrointestinais (prurido dos lábios, boca e língua, náuseas, vômitos, diarreia), respiratórias (rinoconjuntivite, espirros, respiração ofegante, tosse) e sistêmica (anafilaxia com angústia respiratória e choque), após a ingestão deste alimento e/ou de seus derivados (SKRIPAK et al., 2007; MENDONÇA et al., 2012).

Em comum com outras alergias alimentares, a predisposição genética, infecções, alteração da microflora intestinal, a idade na primeira exposição ao alérgeno, a dieta materna, a transmissão do antígeno por meio do aleitamento materno, a natureza, quantidade e frequência de carga de antígeno são fatores que promovem a tolerância oral ou a sensibilização ao leite de vaca (FIOCCHI et al., 2010).

A β -LG, uma das principais proteínas do soro do leite, não se encontra no leite humano, esta proteína tem sido demonstrada por ser uma das principais fontes de alergia infantil e com isto acaba limitando a utilização do leite de vaca na produção de fórmulas lácteas (LUCENA et al., 2006).

Diversas tentativas foram realizadas para reduzir a alergenicidade das proteínas do leite de vaca e uma grande variedade de processos tecnológicos foi aplicada a fim de dispor de uma melhor utilização do leite de vaca em lactentes (EL-AGAMY, 2007). A indústria de laticínios tem realizado muitos esforços para desenvolver eficientes tecnologias de separação e purificação de proteínas que

permitam a produção de novos produtos. Dentre estes processos a cromatografia de troca iônica é a técnica de alta resolução mais apropriada para separação e purificação de proteínas (BHATTACHARJEE, S.; BHATTACHARJEE, C.; DATTA, 2006; SANTOS; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2012).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi realizar a separação da β -lactoglobulina do concentrado protéico do soro do leite (CPS) através de cromatografia de troca iônica visando aplicação em fórmulas lácteas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Alergia à proteína do leite de vaca (APLV)

A prevalência de doenças alérgicas em crianças e adultos jovens aumentou consideravelmente nas últimas décadas e a alergia alimentar é uma preocupação crescente de saúde no Brasil e no mundo, pois aproximadamente 4 a 6% de crianças possuem alergia alimentar documentada (ZEIGER, 2003; FERREIRA; SEIDMAN, 2007; KOLETZKO et al., 2012).

Em 2003, a Organização Mundial de Alergia propôs uma nova nomenclatura para as definições de alergia onde a hipersensibilidade é um termo utilizado para descrever sinais ou sintomas reproduzíveis causados pela exposição a um estímulo definido em uma dose tolerada por pessoas normais. A intolerância sugere uma resposta fisiológica anormal a um agente que não é imunomediada. O termo atopia foi sugerido para designar uma característica que torna um indivíduo suscetível ao desenvolvimento de várias alergias, enquanto que alergia é uma reação de hipersensibilidade desencadeada por mecanismos imunológicos específicos (FERREIRA; SEIDMAN, 2007).

A alergia alimentar (AA) é definida como um efeito adverso para a saúde decorrente de uma resposta imune que ocorre após a exposição a um determinado alimento. Essa reação imunológica pode ser mediada pela Imunoglobulina (Ig) E, não mediada por IgE ou mista. Dentre as alergias alimentares destaca-se a proteína do leite de vaca como a principal causa de alergia alimentar de crianças menores de três anos (KOLETZKO et al., 2012).

A incidência de alergia à proteína do leite de vaca é de aproximadamente 2 a 5% dos quais 60% são IgE mediadas, porém esta prevalência não é totalmente confiável devido a falta de critérios padronizados para o diagnóstico desta doença e pelo fato de muito dados serem coletados por auto-relato (KATZ et al., 2010).

A alergia à proteína do leite de vaca (APLV) pode induzir a uma grande variedade de sintomas com diferentes graus de intensidade em lactentes. As reações imediatas ocorrem de minutos até duas horas após a ingestão do alérgeno e possuem maior probabilidade de ser mediada por IgE, enquanto que as reações tardias manifestam-se até 48 horas ou uma semana após o consumo do alimento

com o alérgeno. Combinações de reações imediatas e tardias ao mesmo alérgeno também podem ocorrer no mesmo paciente (KOLETZKO et al., 2012).

As manifestações são variáveis e incluem sintomas gastrintestinais (vômitos, diarreia e cólicas) encontrados em 50 a 75% das crianças, respiratórios (asma e rinite alérgica) e cutâneos (urticária, angioedema e eczema atópico) aparecem em uma faixa de 10 a 50% e 50%, respectivamente, além disto existe um risco elevado de anafilaxia (EL-AGAMY, 2007).

Um diagnóstico confiável requer a análise de várias questões, dentre estas a história clínica e familiar, exame físico e exames laboratoriais, testes cutâneos de hipersensibilidade imediata (*prick test*), testes sanguíneos de pesquisa de IgE específica (ImmunoCAP) e testes considerados “padrão ouro” de provocação oral, que devem ser realizados através de estudo duplo-cego placebo-controlado (SOLÉ et al., 2007).

Estratégias propostas para diminuir a incidência de APLV em crianças em situação de risco concentram-se na eliminação dos alérgenos, amamentação, diversidade alimentar tardia e uso de fórmulas com proteínas hidrolisadas (MORISSET et al., 2011).

O controle de alérgenos pode ser instituído em qualquer um dos três estágios de prevenção da alergia (primário, secundário ou terciário). A prevenção primária é a intervenção realizada na fase anterior ou durante a exposição aos alérgenos, busca diminuir a possibilidade de sensibilização inicial e desenvolvimento de sintomas em indivíduos de risco. A prevenção secundária situa-se entre a sensibilização e o desenvolvimento dos sistemas alérgicos, tem a finalidade de suprimir a expressão da doença após a sensibilização e, por último a medida de prevenção terciária refere-se ao tratamento das doenças alérgicas após sua instalação, neste estágio de tratamento tenta-se evitar a recorrência dos sintomas e susceptibilidade a outras proteínas antigênicas (CHAPMAN et al., 2006).

Se o lactente diagnosticado com APLV for amamentado com leite materno, as mães devem ser encorajadas a continuar a amamentar, pois o leite materno possui propriedades nutricionais, bioquímicas e imunológicas que o tornam a nutrição padrão ouro para o lactente, porém devem ser excluídos da dieta materna leite e produtos lácteos. Se a criança recebe alimentação complementar, deve-se ter o cuidado de não oferecer alimentos com a proteína do leite de vaca (TRABULSI et al., 2011; KOLETZKO et al., 2012).

Em lactentes amamentados com fórmula láctea a base de leite de vaca onde a proteína não for modificada, esta fórmula deve ser estritamente evitada. Uma dieta de eliminação em crianças alimentadas com fórmula, geralmente, começa com uma fórmula láctea com proteína extensamente hidrolisada. Em recém-nascidos com sinais e sintomas graves ou risco de vida, uma fórmula com aminoácidos livres deve ser a primeira escolha (KOLETZKO et al., 2012).

O prognóstico para APLV na infância é bom, uma vez que aproximadamente 50% das crianças afetadas desenvolvem tolerância com a idade de 1 ano, mais de 75% até a idade de 3 anos e mais de 90% tornam-se tolerantes até os 6 anos de idade (KOLETZKO et al., 2012).

2.2 Fórmulas lácteas

A composição do leite materno é utilizada para estimar as necessidades nutricionais do lactente e orientar a composição das fórmulas lácteas infantis, que na impossibilidade do aleitamento materno são o substituto mais adequado para todo o primeiro ano de vida da criança (CARRATÙ et al., 2003; BERSETH et al., 2009; TRABULSI et al., 2011). A fórmula láctea é desenvolvida procurando assemelhar-se ao máximo a composição do leite humano, para reproduzir respostas fisiológicas semelhantes à de crianças amamentadas (LIEN, 2003).

A maioria das fórmulas lácteas é produzida com leite de vaca ou seus derivados como base padrão, pois há semelhanças entre o leite humano e o leite de vaca. Devido à diferença de digestibilidade de proteínas e aminoácidos, biodisponibilidade e eficiência de utilização entre o leite humano e a fórmula láctea, a quantidade de proteína por conteúdo energético tem sido maior na fórmula láctea do que no leite humano, para atender o requerimento de proteínas e aminoácidos de lactentes (até 2,5g/100Kcal para fórmula, isto é, até 40% mais do que as proteínas do leite humano) (LUCENA et al., 2006; CHATELAIS et al., 2011).

No que diz respeito ao perfil protéico, a α -LA está presente em ambos os leites, esta proteína tem um elevado valor biológico e qualidade nutricional com taxa de eficiência protéica de 4,0 em comparação com 3,6 do soro do leite e 2,9 da caseína e em pH 4,0, a α -LA é suscetível a digestão pela pepsina no estômago (WIT, 1998).

Embora existam algumas semelhanças entre a composição protéica do leite de vaca e o leite humano, há diferenças substanciais entre os tipos de proteínas como apresentado na tabela 1 (CRITTENDEN; BENNETT, 2005).

Tabela 01 – Concentração das principais proteínas no leite humano e no leite de vaca

Proteína	Leite humano (mg/mL)	Leite de vaca (mg/mL)
α -lactalbumina	2,2	1,2
α -s1-caseína	0	11,6
α -s2-caseína	0	3,0
β -caseína	2,2	9,6
K-caseína	0,4	3,6
γ -caseína	0	1,6
Imunoglobulinas	0,8	0,6
Lactoferrina	1,4	0,3
β -lactoglobulina	0	3,0
Lisozima	0,5	Traços
Albumina sérica	0,4	0,4
Outras	0,8	0,6

Fonte: CRITTENDEN; BENNETT, 2005.

Os fatores que determinam a escolha da fórmula láctea utilizada incluem potencial residual de alérgenos, composição da fórmula, custos, disponibilidade, aceitação da criança e a presença de dados clínicos mostrando sua eficácia (KOLETZKO et al., 2012).

Fórmulas lácteas hidrolisadas são preparações em que as proteínas sofreram hidrólise com o objetivo de reduzir a alergenicidade de seus componentes. Essa hidrólise pode alcançar graus variáveis, dependendo da finalidade terapêutica a que serão destinadas (prevenção ou tratamento). Para o tratamento da alergia à proteína do leite de vaca, utilizam-se fórmulas extensamente hidrolisadas, as quais devem conter mais de 90% dos peptídeos com peso molecular menor que 3.000 Daltons (BAKER et al., 2000).

Enquanto que para a prevenção podem ser utilizadas fórmulas parcialmente hidrolisadas, estas contêm pequenas quantidades de peptídeos menores e uma quantidade significativa de peptídeos com peso molecular entre 3.000 e 10.000 Daltons, que podem ser potencialmente alergênicos e, por isto sua indicação se restringe à prevenção da APLV (BAKER et al., 2000).

Fórmulas parcialmente hidrolisadas com base na proteína do leite de vaca ou outras proteínas de mamíferos não são recomendadas para o tratamento de crianças com alergia a proteína do leite de vaca, embora possam ser utilizadas na prevenção primária da alergia, até mesmo porque uma alergenicidade residual

poderia contribuir para a gradativa indução de tolerância nos lactentes (KOLETZKO et al., 2012).

Fórmulas a base de proteína de soja podem ser uma opção para crianças com mais de seis meses de idade que não aceitam o gosto amargo de uma fórmula hidrolisada, ou em casos onde o custo de outras fórmulas é o fator limitante. Costumam ser bem toleradas pela maioria das crianças, mas 10% a 14% desenvolvem reações à proteína da soja, além disto, devido ao teor de fitatos da soja pode ocorrer má absorção de minerais e oligoelementos (KOLETZKO et al., 2012).

A fórmula infantil a base de soja está atualmente adaptada a proporcionar crescimento e desenvolvimento normais em lactentes, a toxicidade das isoflavonas pode ocasionar desenvolvimento de maturidade precoce, porém os dados epidemiológicos sobre fórmula a base de proteína de soja são insuficientes para fornecer informações baseadas em evidências sobre a ocorrência ou não de efeitos adversos (VANDENPLAS, 2011).

2.3 Necessidades protéicas no primeiro ano de vida

A exigência dietética é por definição maior do que as necessidades biológicas, uma vez que as dietas não são 100% biodisponíveis em nutrientes. A necessidade biológica é dividida na deposição de proteínas e na manutenção do equilíbrio de aminoácidos, sendo afetada por fatores como taxa de crescimento, digestibilidade, estresse e infecção (AGOSTINI et al., 2005).

Não há um padrão para a composição protéica do leite materno, este varia consideravelmente em função da duração da lactação, fornecendo aproximadamente mais de 2g/Kg de proteína para o lactente nas primeiras semanas e 1,15g/Kg aos quatro meses de vida, isto significa que as necessidades nutricionais de proteínas do lactente vão alterando continuamente no decorrer do seu crescimento (DUPONT, 2003).

Os valores de exigências estimados de aminoácidos (de acordo com a tabela 2) e de proteínas (de acordo com a tabela 3) tendem a orientar as formulações infantis. No entanto, há diferenças na disponibilidade da proteína dietética, na biodisponibilidade e na eficiência da utilização entre o leite humano e as fórmulas lácteas (WHO/FAO, 2007).

Tabela 2 – Composição de aminoácidos do leite humano.

Aminoácido	Aminoácido/g de proteína	Desvio Padrão
Lisina	69	9
Treonina	44	6
Metionina	16	3
Leucina	96	12
Isoleucina	55	8
Valina	55	8
Fenilalanina	42	14
Triptofano	17	3
Histidina	21	5
Tirosina	52	8
Arginina	23	3
Prolina	80	11
Cisteína	17	3
Glicina	23	3
Glutamina	178	19
Asparagina	90	11
Alanina	38	5
Serina	50	7

Fonte: FAO/WHO, 2007.

Uma fórmula com baixa concentração de proteínas é aceitável se a ingestão de todos os aminoácidos constituintes não for menor do que a necessidade do lactente. A quantidade mínima de proteínas deve ser de 1,8g/100Kcal (12g/L) em uma fórmula com 670 Kcal, apesar de que maiores quantidades de proteínas são necessárias para a hidrólise (2,25g/100Kcal ou 15g/L) (DUPONT, 2003).

Tabela 3 – Requerimento de proteínas e aminoácidos para lactentes, crianças e adolescentes.

Idade (anos)	Proteínas (g/Kg/dia)		Aminoácidos (mg/Kg/dia)								
	Manutenção	Crescimento	Histidina	Isoleucina	Leucina	Lisina	SAA	AAA	Treonina	Triptofano	Valina
0,5	0,66	0,46	22	36	73	64	31	59	34	9.5	49
1 a 2	0,66	0,2	15	27	54	45	22	40	23	6.4	36
3 a 10	0,66	0,07	12	23	44	35	18	30	18	4.8	29
11 a 14	0,66	0,07	12	22	44	35	17	30	18	4.8	29
15-18	0,66	0,04	11	21	42	33	16	28	17	4.5	28
>18	0,66	0	10	20	39	30	15	25	15	4.0	26

SAA- Aminoácidos sulfurados AAA- Aminoácidos aromáticos

Fonte: FAO/WHO, 2007.

2.4 Proteínas do soro do leite

O soro do leite é caracterizado como o líquido que se separa do coalho do queijo durante sua fabricação. Existem dois tipos de soro do leite: doce e ácido. O soro ácido é obtido a partir da fabricação do queijo onde as caseínas são removidas

por precipitação a um pH de 4,6; as proteínas e os outros componentes que permanecem denominam-se soro ácido. Enquanto o soro doce é produzido quando as caseínas são enzimaticamente coaguladas a um pH de 5,9 a 6,3 (GERBERDING; BYERS, 1998).

É composto basicamente de 94 a 95% de água, 3,8 a 4,2% de lactose, 0,8 a 1,0% de proteínas e 0,7 a 0,8% de minerais. O componente mais valioso do soro são as proteínas, mas sua concentração neste líquido é reduzida e para realçar suas propriedades funcionais são necessárias etapas de concentração (PAGNO et al., 2009).

Os processos de processamento do soro do leite têm sido desenvolvidos há muitos anos, com o objetivo de reduzir a eliminação de efluentes e de obter vantagens das propriedades das frações protéicas. Assim pode-se dizer que durante as últimas décadas ocorreu um aumento significativo no interesse da indústria alimentícia pelas proteínas do soro do leite bovino para a produção de produtos especiais tais como: fórmulas lácteas, fórmulas para alimentação enteral e produtos dietéticos (WIT, 1998; MULLER, 2003).

As proteínas do soro do leite têm sido reconhecidas como valiosos ingredientes alimentares com importantes propriedades nutricionais e funcionais, que possuem elevada quantidade de aminoácidos sulfurados, os quais apresentam funções antioxidantes (SINHA et al., 2007).

As proteínas do soro do leite apresentam alto valor nutricional devido a sua excelente composição de aminoácidos, melhor biodisponibilidade em aminoácidos essenciais e alta digestibilidade, pois a baixa concentração de caseína resulta na formação de coágulo gástrico mais leve, com flóculos de mais fácil digestão e esvaziamento gástrico mais acelerado. Apresentam ótimas propriedades funcionais de solubilidade, formação e estabilidade de espuma, emulsibilidade, geleificação formação de filmes e cápsulas protetoras (SBARBIERI, 2005).

2.4.1 β -Lactoglobulina

A β -LG é a principal proteína do soro do leite bovino, constituindo aproximadamente 50% do total e 10% do leite, com um peso molecular em torno de 18.300Daltons, contém 162 resíduos de aminoácidos. A β -LG pertence à família lipocalina, cujos membros partilham de uma estrutura terciária semelhante e

possuem alta afinidade a ligantes hidrofóbicos, uma característica que os deixa com potencial altamente alergênico (WIT, 1998; SGARBIERI, 2005; CONG; LI, 2012; STOJADINOVIC et al., 2012).

É codificada pelo gene LGB, localizado no cromossomo 11 do genoma bovino. Até o momento foram identificadas 11 variantes da β -LG, incluindo as variantes A, B, C, D, E, F, G, H, I, J e W. As variantes A e B ocorrem em alta frequência na maioria das raças bovinas. Foram associadas, com essas variantes, as diferenças na composição da produção do leite, propriedades tecnológicas e atividade antimicrobiana (CAROLI; CHESSA; ERHARDT, 2009).

Esta proteína também é reconhecida por seu alto valor tecnológico e funcional, no entanto, por ser a proteína mais abundante e também a mais alergênica e antigênica pode apresentar riscos para a saúde de pacientes alérgicos a proteína do leite de vaca, principalmente crianças; uma vez que sua estrutura globular é estável contra a ação de hidrólise ácida e de enzimas proteolíticas presentes no estômago, fazendo com que permaneça intacta após a sua digestão (SGARBIERI, 2005; STOJADINOVIC et al., 2012; WIT, 1998).

Cong e Li (2012) determinaram vários epítomos para a β -LG, os quais são a parte do antígeno que é reconhecida por anticorpos, trinta peptídeos sintetizados são distribuídos por toda a proteína. A sequência de aminoácidos 152 a 166 localizada no carbono terminal é semelhante a outras proteínas derivadas do leite, esse fenômeno pode explicar a razão da reação cruzada entre as proteínas do leite.

Deste modo, a remoção da β -LG ampliaria as aplicações do soro do leite na indústria alimentícia infantil, pois o soro do leite livre da β -lactoglobulina poderia ser utilizado como constituinte principal de fórmulas infantis hipoalergênicas com composição protéica mais semelhante à do leite humano (NG; SNYDER, 2013).

2.4.2 α -Lactalbumina

A α -LA, a segunda proteína mais abundante no soro do leite (15-25%) e presente em torno de 2% no leite, é uma proteína globular composta por 123 resíduos de aminoácidos, possui peso molecular de 14.200Daltons e caracteriza-se por ser uma proteína de fácil e rápida digestão. É uma ótima fonte de aminoácidos como: triptofano, lisina, leucina, treonina e cistina e beneficia o crescimento das crianças. A α -LA é precursora da biossíntese de lactose no tecido mamário e possui

a capacidade de se ligar a minerais como cálcio e zinco (HARAGUCHI; ABREU; PAULA, 2006; ALBREHT; VOVK, 2012; ZHANG et al., 2012).

Esta proteína é codificada pelo gene LAA, mapeado no cromossomo 5 do genoma bovino, possui 3 variantes identificadas até o momento: A, B e C (CAROLI; CHESSA; ERHARDT, 2009).

A α -lactalbumina é de grande interesse por muitos pesquisadores, desde que possa ser produzida em grande escala com um elevado teor de pureza e com limitada desnaturação, uma vez que possui alto valor nutricional agregado (MULLER et al., 2003).

A α -LA é usada comercialmente em fórmulas infantis devido a sua similaridade estrutural e conformacional com as proteínas do leite materno, sendo também utilizada em alimentos da nutrição esportiva em razão do seu conteúdo de aminoácidos ramificados (WALZEM et al., 2002).

2.5 Cromatografia de troca iônica

O tratamento térmico é pouco efetivo sobre o potencial alergênico das proteínas do leite de vaca, pois os processos de aquecimento são capazes de modificar apenas epítopos conformacionais, que perdem sua capacidade de ligação com IgE's específicas, mas epítopos lineares não são estruturalmente afetados e com isto mantêm seu potencial alergênico após o tratamento térmico (RESTANI, 2009).

A indústria de laticínios tem realizado muitos esforços para desenvolver eficientes tecnologias de separação e purificação de proteínas que permitam a produção de novos produtos. Entre estas tecnologias destacam-se técnicas de precipitação, de membranas e de cromatografia. No entanto, as técnicas de precipitação e de membranas podem ocasionar a desnaturação protéica, além disto, estas técnicas são volume-dependente, fazendo com que o fracionamento das proteínas do soro do leite seja muito caro (SANTOS; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2012).

Vários tipos diferentes de cromatografia líquida são utilizados industrialmente para a separação e purificação de misturas de proteínas de multicomponentes, estas incluem a exclusão de tamanho, de permuta iônica, cromatografia de adsorção e processos de afinidade (GERBERDING; BYERS, 1998).

A cromatografia de troca iônica é uma técnica de alta resolução mais apropriada para separação e purificação de proteínas. A separação é baseada na interação eletrostática reversível entre uma molécula de proteína com carga positiva ou negativa e a membrana cromatográfica carregada com carga oposta (troca iônica). A proteína é positivamente carregada abaixo do seu Ponto Isoelétrico (PI) e ligar-se-á a qualquer membrana de troca catiônica. Em um pH maior que o PI da proteína, a proteína alvo será carregada negativamente e ligar-se-á a membrana de troca aniônica. A desabsorção de biomoléculas das membranas de troca de íons começa após aumentar a força iônica ou trocar o pH da solução tampão (BHATTACHARJEE; BHATTACHARJEE; DATTA, 2006).

Muitas vantagens foram relatadas sobre a cromatografia iônica, tais como a rápida taxa de associação entre a proteína-alvo e grupos funcionais, curto tempo de processamento, custo relativamente baixo, capacidade de sobreviver a severos regimes de limpeza, não há necessidade de nenhum tratamento térmico, extremos de pH ou tratamento químico, que podem comprometer a estrutura da proteína e sua funcionalidade (SANTOS; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2012).

O principal problema no isolamento das proteínas do soro do leite é a separação das duas principais frações protéicas, a α -LA e a β -LG, que possuem semelhantes pesos moleculares de 14,4 e 18,3 KDa e valores de PI de 4,8 e 5,3, respectivamente (STOJADINOVIC et al., 2012).

3 RESULTADOS CIENTÍFICOS

Os resultados desta dissertação estão apresentados sob a forma de um artigo científico, o qual será apresentado no decorrer deste documento e será posteriormente submetido à Revista Química Nova, periódico Qualis B2 para Ciência de Alimentos.

3.1 Artigo

ISOLAMENTO DA β -LACTOGLOBULINA DO SORO DO LEITE POR CROMATOGRÁFIA IÔNICA

Susana B. de Pelegrini*, José L. Nörnberg

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologias dos Alimentos (PPGCTA),
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria (RS), Brasil.

Autor para Correspondência:

Susana B. de Pelegrini

Endereço: Avenida Presidente Vargas nº1051, Bairro Fátima, Santa Maria, Rio
Grande do Sul, Brasil. CEP: 97015-511. Telefone: (55) 99362530.

*e-mail: susapel@hotmail.com

ISOLATION OF β -LACTOGLOBULIN FROM WHEY BY ION CHROMATOGRAPHY

The objective of this work was to achieve the separation of β -lactoglobulin from the whey protein concentrate by ion exchange chromatography. Physical-chemical analysis of the protein concentrate, separation of β -lactoglobulin by ion exchange chromatography, analysis of amino acids profile and of the final amount of β -lactoglobulin in the resulting product and in two hypoallergenic infant formulas were made. The results were the obtainment of a α -lactalbumin protein fraction (1) and a β -lactoglobulin protein fraction (2). Fraction 1 had great amino acids profile, but it contained residues of β -lactoglobulin (fraction 2). From the obtained results, it is possible to ascertain that it is feasible to separate proteins by ion chromatography.

Keywords: Chromatography. Human milk substitutes. Milk proteins.

INTRODUÇÃO

As indústrias de medicamentos e de alimentos têm um grande interesse no desenvolvimento de produtos utilizando o soro do leite e seus derivados como fonte de matéria-prima. As proteínas do soro são muito utilizadas em produtos alimentícios, devido às suas excelentes propriedades funcionais e nutricionais. Grandes esforços têm sido realizados nos últimos anos para melhorar essas propriedades através de tratamentos químicos, físicos e/ou enzimáticos.^{1,2,3}

A produção de fórmulas lácteas é um mercado importante que tem sido explorado pelas indústrias alimentícias. A maior parte das fórmulas para lactentes contém proteínas do soro do leite misturadas com carboidratos, lipídeos, vitaminas, minerais, nucleotídeos e outros componentes, para obter um produto o mais semelhante possível ao leite humano. O principal problema com estes produtos derivados do soro do leite a ser utilizado como ingrediente principal nas fórmulas infantis é a presença da β -lactoglobulina (β -LG).⁴

Esta proteína tem sido relatada como sendo uma fonte importante de alergia infantil, o que limita a utilização do leite de vaca como matéria-prima para a produção de fórmulas para lactentes.⁵

A β -LG é a proteína em maior concentração no soro do leite bovino, pertence à família lipocalina e contém duas pontes dissulfeto e um grupo de cisteína livre, consiste de 162 resíduos de aminoácidos correspondendo a uma massa molecular de 18.300 Daltons. Numerosos estudos indicam que existem epítomos conformacionais e lineares cobrindo a maior parte da molécula que causa a alergia. A β -LG é uma proteína muito estável e resiste a processos de digestão gastro-

duodenais e esta resistência juntamente com a sua ausência no leite humano tem sido proposta como um fator que contribui para a sua maior alergenicidade.^{6,7}

Os sintomas de uma reação alérgica a proteína do leite de vaca podem variar de leve a risco de vida e podem incluir sintomas gastrintestinais (náusea, vômito, cólicas abdominais, diarreia), cutâneos (urticária, dermatite atópica), respiratórios (rinite, asma) e em casos mais graves pode ocorrer anafilaxia.⁸

Fórmulas lácteas extensamente hidrolisadas são alternativas para evitar à exposição da criança a proteína do leite de vaca no início da vida, outra abordagem para a produção de fórmulas lácteas infantis semelhantes ao leite humano é remover a β -LG a partir do leite de vaca ou de seus derivados.⁹

A cromatografia de troca iônica é a técnica mais frequentemente utilizada para separação e purificação de proteínas, polipeptídeos, ácidos nucleicos e outras biomoléculas carregadas. É baseada na interação entre as moléculas de soluto e porções carregadas com cargas opostas ligadas covalentemente a uma matriz de cromatografia.¹⁰

Cromatografia de troca iônica é um princípio versátil de separação de proteínas devido à sua aplicabilidade para diversas classes protéicas, de alta resolução, simplicidade, boa reprodutibilidade e possibilidade de realizar a separação em condições que não desnaturem a proteína.¹¹

Atualmente a separação de proteínas por cromatografia oferece vantagens de alta velocidade de processamento, sem perda de capacidade de adsorção, módulos compactos para uma operação em grande escala e baixas quedas de pressão através de módulos de cromatografia. Vários tipos de cromatografia, dentre estes cromatografia de troca iônica, estão disponíveis comercialmente a partir de uma variedade de fabricantes.¹²

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi realizar a separação da β -lactoglobulina de um concentrado protéico do soro do leite através de cromatografia de troca iônica, visando aplicação em fórmulas lácteas.

PARTE EXPERIMENTAL

Matéria-prima

Utilizou-se concentrado protéico do soro do leite bovino (CL 3985), adquirido da empresa Alibra, localizada em Campinas – SP.

Caracterização do concentrado protéico do soro do leite

Realizou-se análises, em triplicata, do concentrado protéico, conforme descrição a seguir. Determinou-se o teor de umidade por aquecimento direto em estufa a 105 °C por 16 horas; cinzas através de queima da amostra em mufla a temperatura de 550°C durante 6 horas, proteínas a partir da determinação de nitrogênio através do método Kjeldhal; de acordo com os procedimentos descritos no AOAC (1995).¹³ O teor de lipídeos totais, foi obtido conforme BLIGH e DYER (1959),¹⁴ empregando-se os solventes clorofórmio, metanol e água (10, 20 e 8 mL respectivamente). Os carboidratos totais foram estimados por diferença, subtraindo-se de 100% a soma dos valores obtidos nas determinações anteriores.

Isolamento da β -lactoglobulina

O isolamento da β -lactoglobulina foi realizado na Divisão de Microbiologia do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), de acordo com a metodologia de Mezzaroba (2005).¹⁸

Cromatografia de troca iônica

Utilizou-se um sistema FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) da Pharmacia composto de: controlador de pH, bomba dosificadora, válvula de injeção, detector e coletor de frações, registrador e unidade UV (280 nm).

O sistema foi preparado com uma coluna do tipo XK50/30 preenchida com resina de troca aniônica (*Q – Sepharose Fast Flow da Pharmacia*) com capacidade iônica total de 180-250 $\mu\text{mol/ml}$ gel, taxa de fluxo de trabalho de 100-300 cm/h, com tamanho das partículas da resina aproximado de 90 μm , medindo 100 mm de altura por 50 mm de diâmetro e equilibrada com tampão Tris-HCl 0,02 M, pH 7,0 (tampão A). A eluição foi efetuada em passos (*stepwise elution*) com concentração de 30% do tampão B (tampão A + 1 M NaCl).

Preparo da amostra

Foram preparadas 48 amostras do concentrado protéico do soro do leite bovino (CPS), dissolvidas em água Milli-Q a 20% e injetadas na coluna de troca aniônica previamente equilibrada com o tampão A.

Desorção das proteínas

Após a aplicação da amostra, passou-se 200 mL do tampão A para remover as proteínas que não foram adsorvidas à resina, em seguida iniciou-se a eluição das proteínas adsorvidas com aumento da força iônica. Para regenerar a coluna foram passados mais 400 mL do tampão A.

Análise das frações obtidas

As duas frações obtidas de α -lactalbumina e de β -lactoglobulina foram coletadas, sendo dialisadas e concentradas em uma membrana Biomax (*polyethersulfone*) com porosidade de corte para 10 kDa (*Pellicon XL Filter Device with Biomax 10kD*). Posteriormente estas frações concentradas foram congeladas e desidratadas por liofilização.

Caracterização eletroforética

A homogeneidade (pureza) do concentrado protéico isolado por métodos cromatográficos foi avaliada por eletroforese SDS-PAGE (gel de poli-acrilamida em presença de β -mercaptoetanol e dodesil sulfato de sódio), realizada em aparelho vertical Bio-Rad (mini-protean) da Pharmacia, segundo LAEMMLI (1970).

Preparou-se o gel de concentração a 4% e o gel de separação com 12% de acrilamida. As amostras foram dissolvidas em solução tampão contendo 62,5mM Tris-HCl, 10% de glicerol, 2% SDS, 5% β -mercaptoetanol, pH 6,8, sendo posteriormente aquecida a 95 °C por 4 minutos para ocorrer a desnaturação. Uma

alíquota de 35µL de cada amostra (contendo 38µg de proteínas) foi aplicada ao gel. A corrida foi efetuada em temperatura ambiente com uma corrente fixa de 35mA.

O gel foi corado com solução de Coomassie Brilliant Blue R 250 (0,1%) e ácido acético 20% (na proporção de 1:1) durante duas horas. Posteriormente, o gel foi descorado com solução contendo água, metanol e ácido acético (na proporção de 5:3:1).

Detecção de β -lactoglobulina

O concentrado protéico com α -lactalbumina e duas fórmulas lácteas (NAN HA e Aptamil HA) disponíveis no mercado foram submetidos ao teste ELISA. Este ensaio imunológico é um ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA), para a detecção e semi-quantificação da β -lactoglobulina. O anticorpo utilizado reconhece β -lactoglobulina e o resultado é expresso em ppm (mg/kg).

Perfil de aminoácidos

O perfil de aminoácidos da fração com α -lactalbumina e das fórmulas lácteas (NAN HA e Aptamil HA) foi determinado através de hidrólise ácida e HPLC, conforme orientações da ISO13903:2005.

Análise Estatística

Os dados foram analisados através do programa Stata 9.0 (Stata Corp LP, College Station, USA).

Inicialmente foi realizada uma análise descritiva dos dados relacionada às medidas do concentrado protéico do soro do leite considerando duas análises (análise 1 e análise 2).

Posteriormente foram testados os dados relacionados às fórmulas dos aminoácidos com relação à normalidade da distribuição com o teste de Shapiro-Wilk. Como a distribuição das variáveis não apresentou distribuição normal, o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis foi empregado. Para verificar em quais grupos se encontravam as diferenças estatísticas foi aplicado o teste de Bonferroni.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A necessidade da determinação da composição centesimal do concentrado protéico do soro do leite (CPS) é relevante, uma vez que este concentrado foi a matéria-prima para a realização da separação da β -lactoglobulina através de cromatografia de troca iônica.

Na tabela 1 está apresentada a composição centesimal do concentrado protéico do soro do leite, onde se observa que este produto pode ser corretamente definido como concentrado protéico por conter 71,85% de proteínas.

Segundo Pagno e seus colaboradores (2009)¹⁵ os concentrados protéicos do soro do leite podem variar sua composição de proteínas entre 35% a 80%. Quando o CPS contém em torno de 53% de proteínas, terão em média 35% de lactose, 5% de gordura e 7% de cinzas, quando a concentração de proteínas aumenta para 80% o conteúdo de lactose decresce em média para 7%, gordura e cinzas entre 4% e 7%, diminuindo gradativamente à medida que aumentam as lavagens com água¹⁵.

Antunes, Motta e Antunes (2003)¹⁶ avaliaram as variáveis concentração de proteínas e pH, temperatura e tempo de desnaturação protéica no perfil de textura e capacidade de retenção de água em géis ácidos de CPS. Utilizaram como matéria-prima um concentrado protéico com 78,56% de proteínas, 5,96% de gordura, 2,62% de cinzas, 5,73% de umidade e 6,44% de lactose, características estas semelhantes as do concentrado protéico deste estudo. O que pode ser observado ao comparar os resultados destes trabalhos é uma quantidade um pouco inferior de proteína e superior de carboidrato no presente estudo.

Através da cromatografia de troca iônica as proteínas foram separadas em frações conforme pode ser visualizado na Figura 1. Observa-se que a fração 1 com a α -lactalbumina, a qual possui o maior pico, foi eluída sem nenhuma força de arraste (NaCl). Enquanto a segunda fração, a qual possui o pico menor, ficou retida na resina e precisou de 50% de NaCl para ser eluída da mesma, o que demonstra que a segunda fração tem uma interação significativa com a resina, demonstrando que esta resina é apropriada para a realização deste tipo de processo.

Foram submetidas à cromatografia iônica 48 amostras, contendo 2g do concentrado protéico do soro do leite em cada, totalizando 96g; como este concentrado protéico possui 71,85% de proteínas pode-se dizer que foram injetadas 69g de proteína no total, onde 13,8g correspondem a α -lactalbumina e 34,5g a β -lactoglobulina. Portanto analisando-se a área do gráfico da Figura 1, verifica-se a recuperação protéica de 6g para a fração 1 de α -lactalbumina e 10g da fração 2 de β -lactoglobulina, equivalente a 43,5% e 29% respectivamente.

Santos, Teixeira e Rodrigues (2012)¹⁷ demonstraram que a cromatografia de permuta aniônica é uma técnica adequada de recuperação de 60,5% da β -lactoglobulina de um concentrado protéico a 80%, sendo um método fácil e não

oneroso. Neste estudo a α -lactalbumina foi a primeira a ser eluída com 25% de NaCl, na sequência foi eluída a albumina sérica bovina com 27% de NaCl e por último a β -lactoglobulina com 30% de NaCl.

Mezzaroba (2005)¹⁸ recuperou 82% de β -lactoglobulina e 32% de α -lactalbumina de um concentrado protéico a 80%, sendo que a fração de β -lactoglobulina foi eluída da coluna quando a solução tampão (NaCl) atingiu concentração de 30%, sendo uma das últimas proteínas a serem eluídas da coluna, uma vez que as demais proteínas e contaminantes presentes no concentrado do soro do leite haviam sido eluídas anteriormente. A porção de α -lactalbumina foi eluída com 10% de NaCl.

Observou-se que tanto no estudo de Mezzaroba (2005)¹⁸ quanto no presente estudo as frações de β -LG tiveram alta afinidade pela resina, pois precisaram de quantidades elevadas de NaCl para ser eluídas da coluna. A ordem de eluição foi à mesma dos estudos supracitados, porém no presente estudo a porcentagem de recuperação das frações protéicas foi inferior.

Através da análise do perfil eletroforético exposto na Figura 2 observa-se que a fração protéica 1 de α -lactalbumina obtida através de cromatografia iônica a partir do concentrado protéico contém vários contaminantes, incluindo a contaminação com a β -lactoglobulina, o que fica comprovado também através do teste de detecção da β -lactoglobulina onde a fração protéica 1 possui >0,8 ppm, a fórmula láctea NAN HA 0,41 ppm e a fórmula láctea APTAMIL HA >0,8 ppm. Observa-se que tanto as duas fórmulas lácteas hipoalergênicas quanto a fração protéica de α -La possuem contaminantes da β -lactoglobulina, mesmo que em pequena quantidade.

Os perfis de aminoácidos da fração protéica 1 com α -lactalbumina e os perfis das fórmulas lácteas hipoalergênicas NAN HA e Aptamill HA são comparados na

tabela 4. Na tabela 5 estão expressos os valores médios de aminoácidos em relação à composição dos diferentes grupos.

Pacheco et al. (2005)¹⁹ verificaram que as proteínas do soro do leite apresentam elevado conteúdo de aminoácidos de cadeia ramificada, particularmente leucina (10,55) e isoleucina (5,69), os quais estão relacionados com a construção de tecido muscular. Também encontraram elevado conteúdo de aminoácidos sulfurados, corroborando com os resultados do presente estudo onde estes aminoácidos também se encontram em níveis elevados no concentrado protéico após a separação da β -lactoglobulina.

Comparando-se os valores de aminoácidos dos produtos do soro do leite com os hidrolisados no estudo de Pacheco et al. (2005)¹⁹ observa-se que de modo geral, ocorreu uma ligeira redução dos níveis de aminoácidos nos hidrolisados em relação ao CPS. O mesmo pode ser observado ao se comparar os aminoácidos da fração 1 da α -lactalbumina deste estudo com os aminoácidos do CPS do estudo de Pacheco et al. (2005)¹⁹, o que pode ter ocorrido devido a retirada da β -lactoglobulina.

O fato do soro do leite possuir um perfil aminoacídico semelhante ao do leite humano permite que sua proteína, particularmente a α -lactalbumina seja recomendada na formulação de produtos para a nutrição infantil, mais especificamente para as fórmulas lácteas infantis.²⁰

CONCLUSÃO

Conclui-se que através da cromatografia de troca iônica é possível obter a separação da β -lactoglobulina de um concentrado protéico do soro do leite, porém através deste processo há limitações, uma vez que restaram resíduos desta proteína

na fração protéica da α -lactalbumina. Apesar disto, como a contaminação foi baixa, este processo tecnológico poderá ser utilizado na elaboração de fórmulas lácteas, as quais poderão ser utilizadas para a prevenção primária da alergia à proteína do leite de vaca na alimentação de lactentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Hau, J.; Bovetto, L.; *J. Chromatogr. A* **2001**; 926.
- 2 Souza, R.; Bergamasco, R.; Costa, S. et al. *Chem. Eng. Process.: Process Intensification* **2010**, 49.
- 3 Fernández, E.; Artiguez, M. L.; Marañón, I. M. et al. *Food Hydrocolloids* **2012**, 27.
- 4 Lucena, M. E.; Alvarez, S.; Menéndez, C. et al. *Sep. Purification Technol.* **2007**, 52.
- 5 Ren, Y.; Han, Z.; Chu, X. et al. *Anal. Chimica Acta* **2010**, 667.
- 6 Kleber, N.; Maier, S.; Hinrichs, J. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **2007**, 8.
- 7 Bogh, K. L.; Barkholt, V.; Madsen, C. B. *Int. Archives of Allergy and Immunology* **2013**, 161.

- 8 Dows, M. L.; Taylor, S. L.; *J. Agricultural and Food Chemistry* **2010**, 58.
- 9 Lucena, M. E.; Alvarez, S.; Menéndez, C. et al. *Sep. Purification Technol.* **2006**, 52.
- 10 Pastorello, E. A.; Trambaioli, C.; *J. Chromatogr. B* **2001**, 756.
- 11 Andersen, T.; Pepaj, M.; Trones, R. et al. *J. Chromatogr. A* **2004**, 1025:217-226.
- 12 Saufi, S. M.; Fee, C. J.; *J. Chromatogr. A* **2011**, 1218.
- 13 ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 16ed. Washington, 1995.
- 14 Bligh, E. G.; Dyer, W. J.; *Can. J. Biochemistry and Physiology* **1959**, 37.
- 15 Pagno, C. H.; Baldasso, C.; Tessaro, I. C. et al. *Rev. Alim. Nutr.* **2009**, 20.
- 16 Antunes, A. E. C.; Motta, E. M. P.; Antunes, A. J.; *Rev. Ciência Tecnol. Alim.* **2003**, 23.
- 17 Santos, M. J.; Teixeira, J. A.; Rodrigues, L. R.; *Sep. Purification Technol.* **2012**.
- 18 Mezzaroba, L. F. H.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP, Brasil, 2005.

19 Pacheco, M. T. B.; Dias, N. F. G.; Baldini, V. L. S. et al. *Rev. Ciência e Technol. Alim.* **2005**, 25.

20 Ziegler, F. L. F.; Sgarbieri, V. C.; *Rev. Nutr.* **2009**, 22.

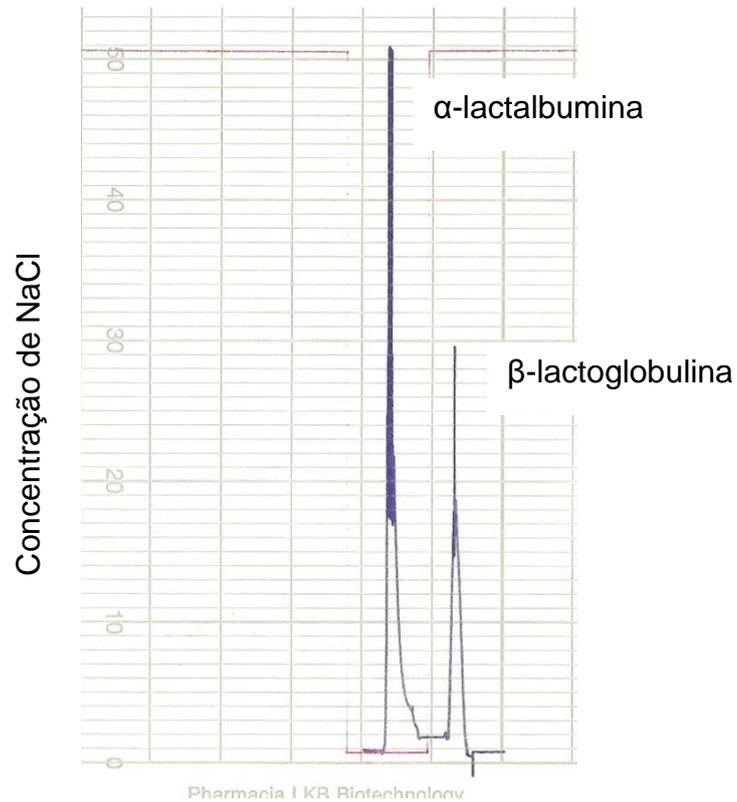


Figura 1. *Fracionamento das proteínas do soro do leite por cromatografia de troca iônica. Amostra do concentrado protéico do soro do leite aplicado em coluna preparativa com resina Q Sepharose fast flow em sistema FPLC (Pharmacia) previamente equilibrada com tampão Tris-HCl pH 7,0. A coluna foi submetida a um gradiente linear de NaCl*

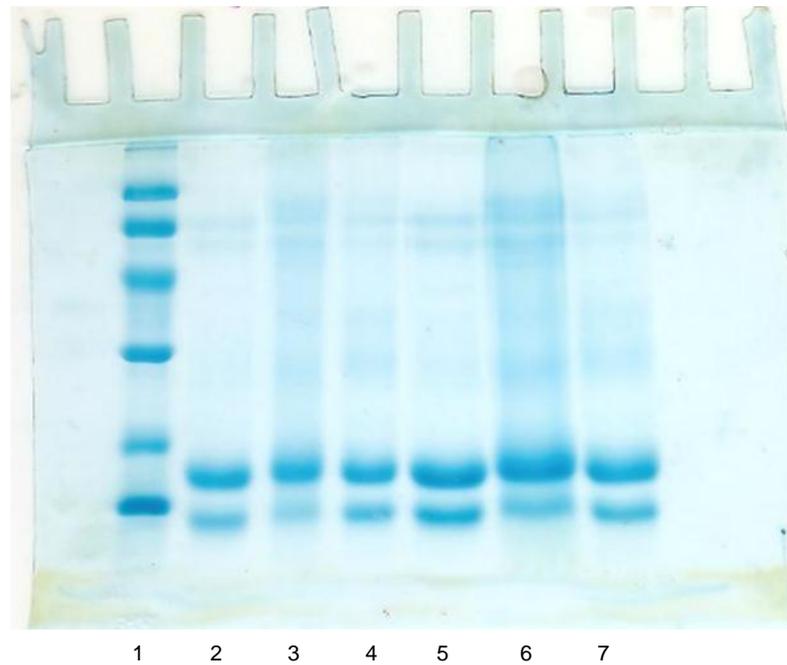


Figura 2. Perfil eletroforético (SDG PAGE) da α -lactalbumina obtida por cromatografia iônica a partir do CPS. Linha 1 padrão Sigma (mistura de proteínas incluindo 6 bandas de referência: 20,7, 28,8, 34,3, 50, 77, 103 kD), Linha 2 fração protéica 1 de α -lactalbumina em 5 mg, Linha 3 repetição da fração protéica 1 em 5 mg, Linha 4 concentrado protéico do soro do leite em 5 mg, Linha 5 fração protéica 1 de α -lactalbumina em 10 mg, Linha 6 repetição da fração protéica 1 em 10 mg e Linha 7 concentrado protéico do soro do leite em 10 mg

Tabela 1. Composição Centesimal do Concentrado Protéico do Soro do Leite

Composição Centesimal	Média e DP	Variância
Umidade	6,47 (0,02)	0,0008
Cinzas	2,82 (0,11)	0,1280
Proteínas	71,85 (0,33)	0,1104
Gordura Total	5,53 (0,26)	0,0722
Carboidratos	13,32 (0,02)	0,0004

Tabela 2. Perfil de aminoácidos do concentrado protéico após remoção da β -lactoglobulina e das fórmulas lácteas hipoalergênicas NAN HA e Aptamil HA

Aminoácido	Fração 1 α-Lactalbumina (g/100g)	NAN HÁ (g/100g)	Aptamil HÁ (g/100g)
Fenilalanina	1,40	0,421	0,385
Glicina	0,898	0,251	0,203
Histidina	0,773	0,264	0,228
Isoleucina	2,04	0,628	0,610
Leucina	3,78	1,36	1,31
Lisina	2,96	1,06	1,05
Prolina	2,08	0,580	0,579
Serina	2,16	0,561	0,515
Tirosina	1,38	0,370	0,339
Treonina	2,51	0,652	0,605
Valina	2,05	0,616	0,581
Ácido Aspártico	3,91	1,32	1,22
Ácido Glutâmico	4,82	1,88	1,88
Alanina	1,86	0,607	0,557
Arginina	1,30	0,383	0,283

Tabela 3. Valores médios de aminoácidos em relação aos diferentes grupos

Grupos	Média (d.p)
NAN H.A.	0,730 (0,467) ^b
APTAMIL H.A.	0,690 (0,472) ^b
CPS s/ BETA-LACTOGLOBULINA	2,261 (1,162) ^a
Valor do p	< 0,001

* Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significantes.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados encontrados no presente estudo, pode-se concluir que foi possível separar as frações protéicas de β -lactoglobulina e α -lactalbumina através do processo de cromatografia iônica, porém essas frações ficaram um pouco contaminadas e para obter uma melhor purificação protéica é necessária a utilização de tecnologias subseqüentes.

A proteína obtida através deste processo demonstrou possuir uma ótima fonte de aminoácidos ao ser comparada com as fórmulas lácteas hipoalergênicas. A partir deste estudo a indústria alimentícia poderá aplicar este concentrado protéico com redução da presença de β -lactoglobulina no desenvolvimento de fórmulas lácteas destinadas a prevenção primária da alergia à proteína do leite de vaca, reduzindo o teor protéico das fórmulas, uma vez que esta proteína possui um valor de aminoácidos superior ao das fórmulas lácteas analisadas.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINI, C.; SCAGLIONI, S.; GHISLENI, D. et al. How much protein is safe? **International Journal of Obesity**, v.29, n.2, p.8-13, 2005.

ALBREHT, A.; VOVK, IRENA. Applicability of analytical and preparative monolithic columns to the separation and isolation of major whey proteins. **Journal of Chromatography A**, v.1227, p. 210-218, 2012.

BAKER, S. S.; COCHRAN, W. J.; GREER, F. R. et al. Hypoallergenic Infant Formulas. **Official Journal of the American Academy of Pediatrics**, v.106, n.2, p.346-349, 2000.

BERSETH, C. L.; MITMESSER, S. H.; ZIEGLER, E. E. et al. Tolerance of a standard intact protein formula versus a partially hydrolyzed formula in healthy, term infants. **Nutrition Journal**, v.8, n.27, p.1-7, 2009.

BHATTACHARJEE, S.; BHATTACHARJEE, C.; DATTA, S. Studies on the fractionation of β -lactoglobulin from casein whey using ultrafiltration and ion-exchange membrane chromatography. **Journal of Membrane Science**, v.275, n.1-2, p.141-150, 2006.

CAROLI, A. M.; CHESSA, S.; ERHARDT, G.J. Invited review: Milk protein polymorphisms in cattle: Effect on animal breeding and human nutrition. **Journal of Dairy Science**, v.92, n.11, p.5335-5352, 2009.

CARRATÙ, B.; BONIGLIA, C.; SCALISE, F. et al. Nitrogenous components of human milk: non-protein nitrogen, true protein and free amino acids. **Food Chemistry**, v.81, n.3, p.357-362, 2003.

CHAPMAN, J. A.; BERNSTEIN, I. L.; LEE, R. E. et al. Food allergy: a practice parameter. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v.96, n.3, p.51-568, 2006.

CHATELAIS, L., JAMIN, A.; GUEN, C. G. L. et al. The Level of Protein in Milk Formula Modifies Ileal Sensitivity to LPS Later in Life in a Piglet Model. **Plos One**, v.6, n.5, 2011.

CONG, Y. J.; LI, L. F. Identification of the critical amino acid residues of immunoglobulin and immunoglobulin G epitopes in β -lactoglobulin by alanine scanning analysis. **Journal Of Dairy Science**, v.95, n.11, p.6307-6312, 2012.

CRITTENDEN, R.G.; BENNETT, L.E. Cow's Milk Allergy: A Complex Disorder. **Journal of the American College of Nutrition**, v.24, n.6, p.582-591, 2005.

DUPONT, C. Protein requirements during the first year of life. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.77, n.6, p.1544-1549, 2003.

EL-AGAMY, E. I. The challenge of cow milk protein allergy. **Small Ruminant Research**, v.68, n.1-2, p.64-72, 2007.

FERREIRA, C. T.; SEIDMAN, E. Alergia alimentar: atualização prática do ponto de vista gastroenterológico. **Revista de Pediatria**, v.83, n.1, 2007.

FIOCCHI, A.; SCHÜNEMANN, H. J.; BROZEL, J. et al. Diagnosis and Rationale for Action against Cow's Milk Allergy (DRACMA): A summary report. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.126, n.6, p.1119-1128, 2010.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION/ WORLD HEALTH ORGANIZATION (FAO/WHO/UNU). Protein and amino acid requirements in human nutrition. **World Health Organ. Tecn.**, 2007.

GERBERDING, S. J.; BYERS, C. H. Preparative ion-exchange chromatography of proteins from dairy whey. **Journal of Chromatography A**, v.808, n.1-2, p.141-151, 1998.

HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. C.; PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista de Nutrição**, v.19, n.4, p.479-488, 2006.

KATZ, Y.; RAJUAN, N.; GOLDBERG, M. R. et al. Early exposure to cow's milk protein is protective against IgE-mediated cow's milk protein allergy. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.126, n.1, p. 77-82, 2010.

KOLETZKO, S.; NIGGEMANN, B.; ARATO, A. et al. Diagnostic Approach and Management of Cow's-Milk Protein ALLERGY IN Infants and Children: ESPGHAN GI Committee Practical Guidelines. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v.55, n.2, p.221-229, 2012.

LIEN, E. L. Infant formulas with increased concentrations of α -lactalbumin. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.77, n.6, p.1555-1558, 2003.

LUCENA, M. E.; ALVAREZ, S.; MENÉNDEZ, C. et al. Beta-lactoglobulin removal from whey protein concentrates Production of milk derivatives as a base for infant formulas. **Separation and Purification Technology**, v.52, n.2, p.310-316, 2006.

MENDONÇA, R.B.; FRANCO, J.M.; COCCO, R.R. et al. Open oral food challenge in the confirmation of cow's milk allergy mediated by immunoglobulin E. **Allergologia et immunopathologia**, v. 40, n. 1, p. 25-30, 2012.

MORISSET, M.; AUBERT-JACQUIN, C.; SOULAINES, P. et al. A non-hydrolyzed, fermented milk formula reduces digestive and respiratory events in infants at high of allergy. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.65, n.2, p.175-183, 2011.

MULLER, A.; CHAUFER, B.; MERIN, U. et al. Prepurification of α -lactalbumin with ultrafiltration ceramic membranes from acid casein whey: study of operating conditions. **Le Lait Dairy Science and Technology**, v.83, n.2, p.111-129, 2003.

NG, P. K.; SNYDER, M. A. Purification of β -lactoglobulin with a high-capacity anion exchanger: High-throughput process development and scale-up considerations. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2013.

PAGNO, C. H.; BALDASSO, C.; TESSARO, I. C. et al. Obtenção de concentrados protéicos de soro de leite e caracterização de suas propriedades funcionais tecnológicas. **Revista Alimentos e Nutrição**, v.20, n.2, p.231-239, 2009.

RESTANI, P.; BALLABIO, C.; LORENZO, C. D. et al. Molecular aspects of Milk allergens and their role in clinical events. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.395, n.1, p.47-56, 2009.

SANTOS, M. J.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Fractionation of the major whey proteins and isolation of b-Lactoglobulin variants by anion exchange chromatography. **Separation and Purification Technology**, v., n., p.133-139, 2012.

SGARBIERI, V. C. Revisão: Propriedades Estruturais e Físico-Químicas das Proteínas do Leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.8, n.1, p.43-56, 2005.

SINHA, R.; RADHA, C.; PRAKASH, J. et al. Whey protein hydrolysate: Functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. **Food Chemistry**. v.101, p.1484-1491, 2007.

SKRIPAK, J.M.; MATSUI, E.C.; MUDD K. et al. The natural history of IgE-mediated cow's milk allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.120, n.5, p.1172-1177, 2007.

SOLÉ, D.; SILVA, L.R.; ROSÁRIO FILHO, N.A. et al. Consenso Brasileiro sobre Alergia Alimentar: 2007. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 31, n.2, p. 64-86, 2007.

STOJADINOVIC, M.; BURAZER, L.; ERCILI-CURA, D. et al. One-step method for isolation and purification of native β -lactoglobulin from bovine whey. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.92, n.7, p.1432-1440, 2012.

TRABULSI, J.; CAPEPING, R.; LEBUMFACIL, J. et al. Effect of an α -lactalbumin-enriched infant formula with lower protein on growth. **European Journal Of Clinical Nutrition**, v.65, n.2, p.167-174, 2011.

VANDENPLAS, Y; GREEF, E.; DEVREKER, T. et al. Soy infant formula: is it that bad? **Acta Paediatrica**, v.100, n.2, p.162-166, 2011.

WALZEM, R.L.; DILLARD, C.J.; GERMAN, J.B. Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlooking. **Food Science and Nutrition**, v.42, p.353-375, 2002.

WIT, J. N. de. Nutritional and Functional Characteristics of Whey Protein in Food Products. **Journal Dairy Science**, v.81, n.3, p.597-608, 1998.

ZEIGER, R. S. Food Allergen Avoidance in the Prevention of Food Allergy in Infants and Children. **Official Journal of the American Academy of Pediatrics**, v.111, n.6, p.1662-1671, 2003.

ZHANG, J.; LAI, S.; ZHANG, Y. Multiple reaction monitoring-based determination of bovine α -lactalbumin in infant formulas and whey protein concentrates by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry using tryptic signature peptides and synthetic peptide standards. **Analytica Chimica Acta**, v.727, n.21, p.47-53, 2012.

ANEXO A – Normas para publicação na revista Química Nova

GERAL - Serão considerados para publicação na Revista Química Nova manuscritos em Português, Inglês e Espanhol, que cubram as áreas tradicionais da Química bem como artigos sobre Ensino de Química, História da Química, Política Científica, etc, além de artigos de áreas afins, desde que tenham acentuado conteúdo químico. Os trabalhos devem se encaixar dentro de uma das modalidades abaixo:

Artigos Originais: refere-se a trabalhos inéditos de pesquisa. Devem seguir a forma usual de apresentação, contendo Introdução, Resultados e Discussão, Parte Experimental etc, de acordo com as peculiaridades de cada trabalho. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

Artigos de Revisão: destinados à apresentação do progresso em uma área específica de Química, com o objetivo de dar uma visão crítica do estado da arte do ponto de vista do especialista altamente qualificado e experiente. Deverão ter no máximo 40 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

É imprescindível que, na referida área, o autor tenha publicações que comprovem a sua experiência e qualificação. Antes do envio do manuscrito, o autor deverá submeter à editoria, por e-mail, um resumo da revisão pretendida e lista de publicações, acompanhados de uma carta explicativa da pertinência do trabalho. O material será analisado pelos Editores e, uma vez aprovado, será solicitado ao autor o envio do manuscrito completo, dentro das normas de QN, e só então será dado início ao processo de avaliação pelos assessores.

O Corpo Editorial de QN poderá, eventualmente, convidar pesquisadores qualificados para submeter artigo de revisão.

Artigos sobre Educação: trabalhos de pesquisas relacionadas ao ensino de Química e divulgação de experiências inovadoras no ensino de graduação e pós-graduação. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

Notas Técnicas: trabalhos de comunicação de métodos, validação de métodos, técnicas, aparelhagens ou acessórios desenvolvidos no laboratório de origem do autor do manuscrito. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

Assuntos Gerais: abordagem de assuntos de interesse geral dos químicos, tais como política científica, programas de graduação e pós-graduação, história da química. etc. Deverão ter no máximo 40 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas etc. e todas as páginas deverão ser numeradas.

PREPARAÇÃO DE MANUSCRITOS - Todos os trabalhos deverão ser digitados em espaço duplo, utilizando somente Microsoft Word. A seguir, deve ser

gerado um único arquivo no formato .pdf, do trabalho todo, para ser submetido através do sistema on line de QN. A revista não aceita a submissão de trabalhos por outra forma.

A primeira página deverá conter o título do trabalho, nome e endereço dos autores. Havendo autores com diferentes endereços, estes deverão vir imediatamente após o nome de cada autor. Os autores deverão ser agrupados por endereço. O autor para correspondência, que deverá ser o mesmo que submete o artigo on line, deverá ser indicado com asterisco (*) e seu e-mail colocado no rodapé da página (um só e-mail).

A segunda página deverá conter o título e o resumo do trabalho em inglês (abstract), com no máximo 100 (cem) palavras, e a indicação de 3 palavras-chave (keywords), também em inglês.

As figuras (incluindo gráficos, esquemas, etc) deverão ser em número máximo de 7 figuras simples e ter qualidade gráfica adequada (usar somente fundo branco). Para número maior ver o item Material Suplementar. As figuras, tabelas, esquemas, etc deverão ser colocadas após as referências e devidamente identificadas pelo respectivo número. Se escaneadas, deverão ser em alta resolução (800 dpi/bitmap para traços).. No caso particular de esquemas contendo estruturas químicas, estas deverão ter sempre a mesma dimensão, para que possam ser reduzidas uniformemente, além de boa qualidade gráfica. Considerar que as figuras deverão ter largura máxima de uma coluna (8,5 cm).

Figuras coloridas terão custo de publicação repassado aos autores, quando da publicação. Esse valor só poderá ser informado aos autores quando o trabalho estiver previsto para ser publicado, ocasião em que a gráfica fornece o orçamento. A publicação de figuras coloridas na versão online é isenta de custos.

Para figuras, gráficos, esquemas, tabelas, etc idênticos aos já publicados anteriormente na literatura, os autores deverão pedir permissão para publicação junto à empresa/sociedade científica que detenha os direitos autorais e enviá-la à editoria de QN junto com a versão final do manuscrito.

As referências deverão ser numeradas consecutivamente no texto, na forma de expoentes, após a pontuação (se houver). A lista de referências deverá ser colocada no final do texto. As legendas das figuras, gráficos e esquemas deverão ser colocadas em uma única folha à parte, separadas das figuras. A seguir, deverão ser colocadas as figuras, os gráficos, os esquemas, as tabelas e os quadros. Colocar os títulos acima de cada tabela. No texto, deverá ser indicada apenas a inserção de cada um(a).

Referências

Revistas:

Será utilizada a abreviatura da revista como definida no Chemical Abstracts Service Source Index (ver <http://www.cas.org/content/references/corejournals>). Caso a abreviatura autorizada de uma determinada revista não puder ser localizada e não for óbvio como o título deve ser abreviado, deve-se citar o título completo.

1. Varma, R. S.; Singh, A. P.; J. Indian Chem. Soc. **1990**, 67, 518.
2. No caso especial da revista citada não ser de fácil acesso, é recomendado citar o seu número de Chemical Abstract, como segue:
Provstyanoi, M. V.; Logachev, E. V.; Kochergin, P. M.; Beilis, Y. I.; Izv. Vyssh. Uchebn. Zadev.; Khim. Khim. Tekhnol. **1976**, 19, 708. (CA 85:78051s).

3. Caso o trabalho tenha doi, mas não a referência completa, citar doi da seguinte maneira:

Vidotti, M.; Silva, M. R.; Salvador, R. P.; de Torresi, S. I. C.; Dall'Antonia, L. H.; *Electrochimica Acta* (2007), doi:10.1016/j.electacta.2007.11.029.

É recomendado o uso de referências compostas na medida do possível, em lugar de uma lista de referências individuais. O estilo das referências compostas é o seguinte:

4. Varela, H.; Torresi, R. M.; *J. Electrochem. Soc.* **2000**, 147, 665; Lemos, T. L. G.; Andrade, C. H. S.; Guimarães, A. M.; Wolter-Filho, W.; Braz-Filho, R.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1996**, 7, 123; Ângelo, A. C. D.; de Souza, A.; Morgon, N. H.; Sambrano, J. R.; *Quim. Nova* **2001**, 24, 473.

Patentes:

Devem ser identificadas da seguinte forma (na medida do possível o número do Chemical Abstracts deve ser informado entre parênteses).

5. Hashiba, I.; Ando, Y.; Kawakami, I.; Sakota, R.; Nagano, K.; Mori, T.; *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* 79 73,771 **1979**. (CA 91:P193174v)

6. Kadin, S.B.; *US pat.* 4,730,004 **1988**. (CA 110:P23729y)

7. Eberlin, M. N.; Mendes, M. A.; Sparrapan, R.; Kotiaho, T. *Br PI* 9.604.468-3, **1999**.

Livros:

com editor(es):

8. Regitz, M. *Em Multiple Bonds and Low Coordination in Phosphorus Chemistry*; Regitz, M.; Scherer, O. J., eds.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 1990, cap. 2.

sem editor(es):

9. Cotton, F.A.; Wilkinson, G.; *Advanced Inorganic Chemistry*, 5th ed., Wiley: New York, 1988.

Programas de computação (Softwares):

10. Sheldrick, G. M.; SHELXL-93; Program for Crystal Structure Refinement; Universidade de Göttingen, Alemanha, 1993.

Teses:

11. Velandia, J. R.; Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil, 1997.

Material apresentado em Congressos:

12. Ferreira, A. B; Brito, S. L.; Resumos da 20^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, Brasil, 1998.

Páginas Internet:

<http://www.s bq.org.br/jbcs>, acessada em Junho 2001.

Material não publicado:

Para material aceito para publicação: Magalhães, U. H.; J. Braz. Chem. Soc., no prelo. Para material submetido mas ainda não aceito: Magalhães, U. H.; J. Braz. Chem. Soc., submetido. Para trabalho não publicado ou comunicação pessoal: Magalhães, U. H.; trabalho não publicado ou Magalhães, U. H., comunicação pessoal. Os resultados não publicados só poderão ser citados com a permissão explícita das pessoas envolvidas na sua obtenção.

Os autores devem procurar seguir, naquilo que for possível, as normas recomendadas pela IUPAC, inclusive o Sistema Internacional de Unidades. Sobre a nomenclatura de compostos (orgânicos e inorgânicos) já há traduções para a língua portuguesa publicadas em QN. Quanto aos Símbolos e Terminologias, onde não há tradução, espera-se que adaptação seja feita pelos autores, criando então, paulatinamente, um conjunto de normas em português.

SUBMISSÃO DOS ARTIGOS – A QN oferece aos autores a submissão on line, que pode ser acessada através do registro de Login e Senha. É possível registrar-se em nossa home page (<http://quimicanova.sbgq.org.br>) usando a opção Novo Usuário. Após estar cadastrado no sistema, o autor pode facilmente seguir as instruções fornecidas na tela. Será solicitada a submissão de um único arquivo do manuscrito completo, em formato .pdf. Está disponível uma ferramenta para gerar o arquivo .pdf, a partir de arquivo .doc ou .rtf, com envio automático para o e-mail do autor. Tão logo seja completada a submissão, o sistema informará automaticamente, por e-mail, o código temporário de referência do manuscrito, até que este seja verificado pela editoria. Então será enviado e-mail com o número de referência do trabalho.

Se não for recebido o e-mail com código de submissão temporária, por algum motivo, a submissão não foi completada e o autor terá prazo máximo de 5 (cinco) dias para completá-la. Depois desse prazo, o sistema não permite o envio, devendo ser feita nova submissão.

O autor poderá acompanhar, diretamente através do sistema, a situação de seu manuscrito.

Ao fazer a submissão, solicita-se uma carta de apresentação, que deverá ser digitada no local indicado, sendo obrigatória a apresentação dos e-mails de todos os autores. Além disso, devem ser enviados também os nomes, instituições a que pertencem e e-mails de três ou quatro possíveis assessores, que não podem pertencer à(s) mesma(s) instituição(ões) dos autores.

Material Suplementar – Esta modalidade foi criada para que na versão impressa da revista apareça o número estritamente necessário de figuras e tabelas (6 a 7 figuras simples). Ressalta-se que, como este material ficará disponível apenas na versão on line, figuras, tabelas e ilustrações coloridas apresentadas na forma de material suplementar não terão custo repassado aos autores, nem limite de páginas. Porém, devem ter boa qualidade gráfica.

O material suplementar deverá ser colocado no final do trabalho, com indicação clara. Deverá ser submetido um único documento .pdf, incluindo o material suplementar.

Os Editores poderão solicitar aos autores, em qualquer fase da tramitação, a separação de Material Suplementar.

MANUSCRITOS REVISADOS – Manuscritos enviados aos autores para revisão deverão retornar à Editoria dentro de prazo máximo de trinta dias ou serão considerados retirados, sendo que o sistema encerra o processo, não permitindo que seja reaberto. Vencido o prazo, deverá ser feita nova submissão, dando início a um novo processo.

A submissão do manuscrito revisado deverá ser feita pelo mesmo autor, usando o Login e a Senha registrados anteriormente. O autor deve seguir as instruções fornecidas na tela, para envio do documento .pdf completo da versão revisada. Deve ser redigida uma carta de encaminhamento, em pdf, aos assessores, detalhando as alterações feitas na nova versão e justificando as alterações sugeridas nos pareceres e que não foram aceitas pelos autores. Esses dois arquivos devem ser enviados através da seção Envio de Nova Versão, na Página do Autor, no sistema de submissão on line de QN.

Tão logo seja completada a submissão o sistema informará automaticamente, por e-mail, o código temporário de referência do manuscrito, até que ele seja verificado pela editoria. Então será enviado e-mail contendo o número de referência do trabalho.

Se não receber o e-mail com código de submissão temporária, por algum motivo, a submissão não foi completada e o autor terá prazo máximo de 5 (cinco) dias para completá-la. Depois desse prazo, o sistema não permite o envio, devendo ser feita nova submissão.

O autor poderá acompanhar, diretamente através do sistema, o status de seu manuscrito.

VERSÃO FINAL – Quando for solicitada a versão final, o autor receberá instruções específicas quanto a programas para envio de arquivos (texto, figuras, tabelas, etc) . Arquivos em formato .pdf não são mais solicitados nessa fase.

Se as Figuras forem escaneadas, deverão ser em alta resolução (800 dpi/bitmap para traços) com extensão tif ou jpg, desde que nas dimensões especificadas pelos Editores. As fotos ou desenhos com cor (300 dpi/grayscale) deverão ser enviadas com extensão tif/jpg, com largura máxima total de 8,5 cm para não haver problemas ao aplicá-las no padrão da Revista. Outras extensões possíveis: cdr, eps, cdx ou opj. No caso particular de esquemas contendo estruturas químicas, estas deverão ter sempre a mesma dimensão, para que possam ser reduzidas uniformemente.

A Editoria de QN reserva-se o direito de efetuar, quando necessário, pequenas alterações nos manuscritos, de modo a adequá-los às normas da revista ou tornar seu estilo mais claro, respeitando, naturalmente, o conteúdo do trabalho. Qualquer que seja a natureza do manuscrito submetido, ele deve ser original em nível de metodologia, informação, interpretação ou crítica. A qualificação do trabalho será atestada por dois consultores, indicados pela Editoria.