

PARTIÇÃO DE PROTEÍNAS DE SORO DE LEITE EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS BASEADOS EM LÍQUIDOS IÔNICOS**Benôit Michel^a, Mateus Tomaz Neves^a, Rita de Cássia Superbi de Sousa^{a,*}, Marcelo Martins das Chagas^a, Bruna Amaral Martins^a e Jane Sélia dos Reis Coimbra^b**^aDepartamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, 36570-000 Viçosa – MG, Brasil^bDepartamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, 36570-000 Viçosa – MG, Brasil

Recebido em 13/03/2015; aceito em 18/06/2015; publicado na web em 22/07/2015

PARTITIONING OF WHEY PROTEINS USING AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEMS WITH IONIC LIQUIDS. In this work, we used an aqueous two-phase system (ATPS) consisting of the ionic liquid [C₄mim][Cl] and the salt K₂HPO₄ to partition α -lactalbumin, β -lactoglobulin, and lactoferrin whey proteins. Extraction efficiency values above 87% indicate that the proteins primarily migrated to the ionic liquid-rich phase (top phase). Partition coefficient values ranged from 6.17 to 8.93 for α -lactalbumin, from 22.80 to 34.55 for β -lactoglobulin, and from 26.46 to 40.06 for lactoferrin. Therefore, the saline ATPS with the ionic liquid examined in this study can be considered to be a promising alternative for extracting whey proteins.

Keywords: liquid-liquid extraction; ionic liquid; partition coefficient; protein.

INTRODUÇÃO

O soro de leite é o coproduto mais abundante da indústria de laticínios e é rico em proteínas de alto valor nutricional, funcional e tecnológico. Entre essas, destacam-se a alfa-lactoalbumina (α -la), a beta-lactoglobulina (β -lg) e a lactoferrina (Lf). A β -lactoglobulina (β -lg) é a proteína presente em maior quantidade no soro de leite bovino (cerca de 50% do total das proteínas do soro) destacando-se por suas propriedades nutricionais, funcionais e técnicas de grande aplicação na indústria de alimentos, como capacidade de emulsificação, formação de espuma/retenção de ar, geleificação, ligação de aroma e sabor, formação de filmes e cápsulas protetoras.¹ A alfa-lactalbumina (α -la), que também é encontrada no leite humano, pode atuar na prevenção de úlcera gástrica² e possui elevado teor de triptofano, sendo então capaz de elevar o triptofano sanguíneo,³ entre outras vantagens e aplicações. A lactoferrina (Lf) é uma glicoproteína que pertence à família de transferrinas (transportadores de ferro), com propriedades antimicrobianas associadas à sua capacidade quelante de ferro. Em contextos clínicos pediátricos, tem potencial para atuar em diversas funções biológicas que incluem o transporte de íons, atividades antifúngica, anti-inflamatória e antiviral, efeitos de imunomodulação e a cicatrização de feridas.⁴

As indústrias farmacêutica e de alimentos usam proteína, com alto grau de pureza, para múltiplas aplicações. Com as técnicas tradicionais de extração e purificação, o custo final do composto purificado é elevado; em torno de 50 a 80% do preço de venda é devido aos custos dos processos de separação e purificação. Em adição, os sistemas usuais demandam longos tempos de extração e podem desnaturar algumas das biomoléculas, reduzindo a atividade biológica.⁵

Nos últimos anos, observa-se o aumento da procura por proteínas de soro de leite em função do interesse crescente da população por suplementos alimentares de alta qualidade. A recuperação e a valorização dessas proteínas são, portanto, de interesse nos campos acadêmico e industrial.

A operação unitária extração líquido-líquido (ELL) é utilizada nos processos de separação e purificação de biomoléculas. No entanto, biomoléculas como proteínas, organelas e fragmentos celulares,

podem sofrer danos quando submetidas a ELL, no caso do uso de solventes orgânicos. Logo, a vertente da ELL utilizando sistemas aquosos bifásicos (SAB) surgiu como uma técnica alternativa e aplicável à separação de compostos de origem biológica.⁶ Esta técnica apresenta vantagens como curto tempo de processo, baixo consumo de energia e possibilidade de aplicação em grande escala.^{7,8} Adicionalmente, as duas fases dos SAB são formadas majoritariamente por água, fornecendo assim um ambiente ameno para as biomoléculas, o que evita que ocorram mudanças em suas estruturas e perda das suas atividades biológicas.⁹

Os SAB se formam quando um polímero solúvel em água e uma substância de baixa massa molar (normalmente um sal inorgânico) ou dois tipos de polímeros solúveis em água se dissolvem em solução aquosa acima de suas concentrações críticas.¹⁰ No entanto, a maioria dos polímeros utilizados nos SAB convencionais apresenta alta viscosidade e as soluções formadas são geralmente opacas, interferindo nas técnicas de análises instrumentais usadas na quantificação dos compostos extraídos do sistema.¹¹ Portanto, nos últimos anos, a utilização de SAB baseados em líquidos iônicos (LI) para substituir os solventes orgânicos convencionais constitui uma área de pesquisa em franco crescimento. Estudos iniciais foram conduzidos por Gutowski *et al.*¹² que demonstraram que a adição de sais inorgânicos (como o K₃PO₄) a soluções aquosas de LI (baseados no cátion imidazólio) induz a formação de SAB.

Líquidos iônicos são sais compostos por íons de grandes dimensões, um cátion orgânico relativamente grande e um ânion orgânico ou inorgânico relativamente pequeno, que não formam uma rede cristalina bem definida, e assim permanecem líquidos à temperatura ambiente. Apresentam uma fraca interação interiônica, a qual resulta em uma baixa energia do retículo cristalino e baixa temperatura de fusão, o que os difere dos sais comuns.¹³ Os LI têm propriedades únicas, tais como: não-inflamáveis, pressão de vapor negligenciável, forte poder de solubilização e estabilidade química e térmica.¹⁴ Encontram aplicação química e bioquímica nas sínteses químicas, transformações biocatalíticas, projetos de dispositivos eletroquímicos e processos de separação.^{15,16}

Assim, SAB baseados em LI estão sendo aplicados em processos de biopurificação e bioextração com as vantagens de maior estabilidade das biomoléculas alvo (normalmente proteínas e enzimas) e

*e-mail: rita.sousa@ufv.br

maiores taxas de recuperação em comparação aos SAB tradicionais formados por polímero e sal.^{5,7,8,17-21}

A extração de proteínas em SAB baseados em LI foi primeiramente reportada por Du *et al.*,¹⁷ que empregaram SAB compostos por cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio ([C₄mim][Cl]) e sal de fosfato (K₂HPO₄) na extração de albumina de soro bovino (BSA) de fluidos biológicos. Pei *et al.*⁵ estudaram a partição de BSA e tripsina em SAB compostos por brometo de 1-butil-3-metilimidazólio [C₄mim][Br] e K₂HPO₄. Ventura *et al.*⁷ avaliaram a influência dos tipos de LI (formados por diferentes ânions combinados ao cátion imidazólio) na extração do aminoácido L-triptofano. Ventura *et al.*⁸ estudaram a separação e purificação da enzima lipase B, de *Candida antarctica*, com SAB constituídos por [C₄mim][Cl] e K₂HPO₄. Ruiz-Angel *et al.*¹⁸ analisaram a partição de ovalbumina da clara de ovo em SAB de mesma composição. O LI [C₄mim][Cl] também foi utilizado para a separação de vanilina, que é uma biomolécula utilizada em alimentos, bebidas e produtos farmacêuticos para produzir aromas satisfatórios.¹⁹ Passos *et al.*²⁰ avaliaram a partição do aminoácido L-triptofano em SAB constituídos por [C₄mim][Cl] e sais de citrato de potássio. Dreyer *et al.*²¹ determinaram coeficientes de partição para tripsina, lisozima, mioglobina e álcool desidrogenase em sistemas constituídos pelo LI Ammoeng TM 110 e tampão fosfato (pH 7,0). LI baseados no cátion fosfônio e K₃PO₄ foram empregados por Louros *et al.*²² na extração de aminoácidos. Pereira *et al.*²³ estudaram SAB compostos por LI baseados nos cátions amônio e fosfônio, combinados com solução tampão de citrato de potássio/ácido cítrico (pH 7,0), para extração de BSA. No entanto, sistemas compostos por [C₄mim][Cl] e sais de fosfato ainda não foram usados para a partição das proteínas α-la, β-lg e lactoferrina do soro de leite.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi estudar a extração das proteínas α-la, β-lg e lactoferrina, presentes no soro de leite, em SAB constituídos pelo cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio [C₄mim][Cl], água e o sal inorgânico fosfato de potássio dibásico (K₂HPO₄).

O cátion 1-butil-3-metilimidazólio foi escolhido pois é um modelo de cátion de LI para o qual se tem dados gerais descritos em literatura.²⁴⁻²⁷ Além disso, o sal inorgânico baseado em fosfato foi selecionado pois os íons fosfatos atuam em sistemas biológicos.²⁸

PARTE EXPERIMENTAL

Materiais

O líquido iônico cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio, [C₄mim][Cl] e o sal inorgânico fosfato de potássio dibásico anidro (K₂HPO₄) foram adquiridos da Sigma Aldrich (EUA). As proteínas α-la e β-lg foram doadas pela Davisco Food Ingredients International (Eden Prairie, USA). A lactoferrina foi cedida pela DMV International (Veghel, Holanda).

Curvas binodais e dados de equilíbrio

As curvas de equilíbrio foram obtidas por meio da titulação turbidimétrica, metodologia que consiste em titular uma determinada quantidade de líquido iônico gotejando a solução aquosa de sal inorgânico até que a mistura final se torne turva.²⁹ Para tanto, inicialmente, soluções estoque do LI a 70% m/m e de sal com concentração total 40% m/m foram preparadas. Aproximadamente 1 g de solução de LI foi então transferida para um tubo de ensaio de vidro, que foi colocado no interior de um banho termostático (170M020, Matoli, Brazil) à temperatura de trabalho (25 °C). Após atingir a temperatura desejada, alíquotas de 20 µL da solução de sal foram adicionadas com auxílio de uma micropipeta ao tubo e o sistema foi misturado com a ajuda de um agitador de soluções tipo

vortex (Phoenix Lufenco, AP 56). Após, foi deixado em repouso durante alguns minutos dentro do banho até que o turvamento da solução final pudesse ser notado (região bifásica).

Em seguida, alíquotas de água ultrapura foram adicionadas para que o sistema voltasse ao estado límpido (região monofásica). Para cada ponto de turvamento identificado, a composição global do sistema (concentração de LI, água e sal) foi determinada a partir da massa total do sistema e das quantidades de sal, LI e água adicionadas antes da observação do turvamento. Este processo de titulação foi repetido até a obtenção de uma quantidade suficiente de pontos para a formação da curva binodal, de maneira que os pontos de turvamento foram considerados como pontos da curva de equilíbrio. Posteriormente, as curvas binodais obtidas experimentalmente foram correlacionadas às Equações 1, 2 e 3 utilizando o software SAS (SAS versão 9.0, Cary, NC, SAS Institute, Inc., 1998, licenciado para uso pela Universidade Federal de Viçosa).

A Equação 1 representa o modelo matemático de Merchuk *et al.*³⁰ usado para correlacionar pontos experimentais em sistemas contendo polímeros. A Equação 2³¹ é outro modelo empírico também utilizado para correlacionar os dados binodais de sistemas polímero-sal. A Equação 3 foi utilizada por Han *et al.*³² para correlacionar os dados das binodais de sistemas formados por LI baseados no cátion imidazólio e sais orgânicos.

$$[LI] = A \exp([B[Sal]^{0.5}] - (C[Sal]^3)) \quad (1)$$

$$[LI] = A + B[Sal]^{0.5} + C[Sal] \quad (2)$$

$$[LI] = A + B[Sal]^{0.5} + C[Sal] + D[Sal]^2 \quad (3)$$

onde [LI] e [Sal] são as composições em fração mássica do líquido iônico e do sal, respectivamente; e A, B, C e D são os parâmetros de ajuste dos modelos.

Linhas de amarração

Após a determinação das curvas de equilíbrio, as linhas de amarração foram obtidas utilizando o método gravimétrico descrito por Merchuk *et al.*³⁰ Foram utilizados quatro pontos globais. A partir das concentrações (% m/m) pré-definidas de sal, LI e água, quatro sistemas foram preparados através da pesagem dos componentes (BEL Engineering, M 214 A) para uma massa total de 10 g, em tubos de centrífuga graduados de volume de 15 mL. Os tubos foram agitados vigorosamente e então centrifugados (FANEM, Excelsa II 206 BL) a 3500 rpm por 5 minutos a fim de acelerar a separação de fases. Posteriormente, os tubos foram mantidos em repouso durante 12 horas em estufa (FANEM, 502, Brasil) a 25±1 °C.

Após o período especificado, os volumes das fases foram medidos e as fases foram, então, separadas e pesadas.

Para determinação da concentração de cada componente (LI, sal e água) nas fases coletadas, um sistema de quatro equações (Equações 4-7) e quatro variáveis desconhecidas ([LI]_{LI}, [LI]_{Sal}, [LI]_{LI}, [Sal]_{Sal}) foi resolvido³³ no software Engineering Equation Solver (EES), Comercial Version 6.883-3D (2003).

$$[LI]_{LI} = A \exp([B[Sal]_{LI}^{0.5}] - (C[SAL]_{LI}^3)) \quad (4)$$

$$[LI]_{Sal} = A \exp([B[Sal]_{Sal}^{0.5}] - (C[Sal]_{Sal}^3)) \quad (5)$$

$$[LI]_{LI} = \frac{[LI]_M}{\infty} - \left(\frac{1 - \infty}{\infty} \right) [LI]_{Sal} \quad (6)$$

$$[Sal]_{LI} = \frac{[Sal]_M}{\infty} - \left(\frac{1 - \infty}{\infty} \right) [Sal]_{Sal} \quad (7)$$

onde os índices subscritos LI, Sal e M representam a fase superior (rica em LI), a fase inferior (rica em sal) e a composição global da mistura, respectivamente. O parâmetro α é a razão entre a massa da fase superior e a massa total da mistura, característico da regra da alavanca.

O comprimento da linha de amarração foi determinado por meio da Equação 8.

$$TLL = \sqrt{([Sal]_{LI} - [Sal]_{sal})^2 + ([LI]_{LI} - [LI]_{sal})^2} \quad (8)$$

Partição das proteínas em SAB

Os experimentos de partição foram realizados em tubos de centrífuga graduados de 15 mL para uma massa total de 12 g. Adicionou-se, aos tubos, uma massa de 10 mg de proteína. Os SAB foram preparados através da pesagem dos componentes e, então, agitados, centrifugados e mantidos em repouso em estufa (25 ± 1 °C), por 12 horas. Então as suas fases foram separadas, como descrito para o procedimento de determinação das linhas de amarração no item anterior. A temperatura de trabalho foi mantida a 25 ± 1 °C. Os experimentos foram realizados em duas repetições.

O conteúdo de proteína em cada uma das fases foi determinado utilizando o método espectrofotométrico (Cary 50 Probe, Varian, EUA), por leitura direta da absorbância a 280 nm. No intuito de evitar a interferência do sal e do LI no método de quantificação das proteínas, amostras de controle (branco) constituídas apenas por LI, sal e água foram utilizadas em todas as leituras. Uma curva analítica foi previamente preparada para cada proteína. A distribuição da proteína nas fases do sistema foi determinada a partir do coeficiente de partição (K_p), resultado da razão entre as concentrações de proteína da fase superior e inferior (Equação 9). O coeficiente de partição foi utilizado para quantificar o grau de separação alcançado no processo de extração.

$$K_p = \frac{C_{LI}}{C_{Sal}} \quad (9)$$

onde C_{LI} e C_{Sal} são as concentrações de proteína na fase superior e inferior, respectivamente.

Para que se possa selecionar o SAB com melhor capacidade de extração das proteínas estudadas, foi calculada a recuperação teórica (y_{sup} , %) do sistema, utilizando-se a Equação 10³⁴

$$y_{sup} = \frac{100}{1 + (1/RK_p)} \quad (10)$$

na qual R corresponde à razão entre os volumes da fase superior e inferior.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dados de equilíbrio de fases

A Figura 1 apresenta a curva binodal, as linhas de amarração e o ponto crítico (Pc) obtidos para o SAB constituído por $[C_4mim][Cl]$, K_2HPO_4 e água, a 25 ± 1 °C. Os parâmetros de ajuste obtidos da correlação dos dados experimentais da binodal, juntamente com os coeficientes de correlação (R^2) e os correspondentes desvios padrão (sd) das Equações 1-3 são apresentados na Tabela 1. A equação 1 mostrou melhor acurácia no ajuste dos dados da binodal para o sistema investigado.

As linhas de amarração foram determinadas através da predição matemática da composição de cada fase dos sistemas bifásicos

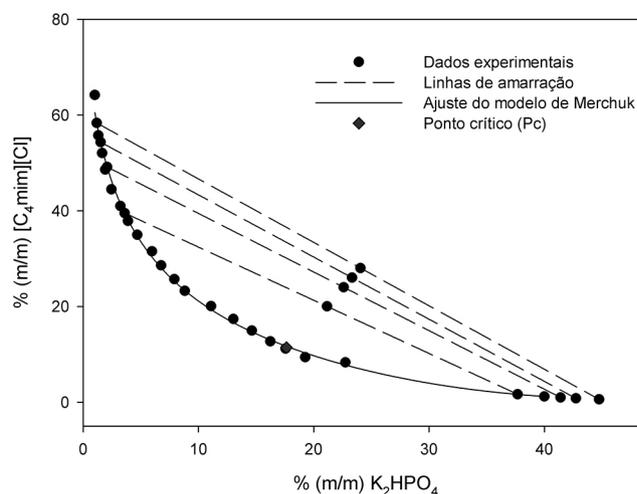


Figura 1. Diagrama de equilíbrio de fases do SAB formado por $[C_4mim][Cl]$ + K_2HPO_4 + água

Tabela 1. Parâmetros das Equações 1-3

Parâmetro	Equação		
	1	2	3
A	97,90	72,81	90,35
B	-0,48	-16,63	-34,34
C	$2,17 \times 10^{-5}$	0,02	4,14
D	-	-	-0,02
R^2	0,9977	0,9894	0,9970
sd	1,2631	2,7326	1,4957

formados. As composições das fases superior e inferior, a composição das misturas iniciais e os comprimentos das linhas de amarração (TLL) estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2. Composições iniciais das misturas, dados experimentais de composições das fases obtidas e comprimento da linha de amarração

$[LI]_{LI}$	$[Sal]_{LI}$	$[LI]_M$	$[Sal]_M$	$[LI]_{sal}$	$[Sal]_{sal}$	TLL
45,60	2,86	18,00	26,93	$2,40 \times 10^{-3}$	42,62	60,49
39,50	3,60	20,00	24,85	1,63	37,68	50,94
45,37	2,89	22,00	22,78	$4,60 \times 10^{-3}$	41,49	59,56
49,13	2,08	24,00	22,60	0,97	41,41	62,17
54,32	1,52	26,00	23,33	0,79	42,74	67,56
58,32	1,18	28,00	24,05	0,57	44,75	72,34

Analisando os dados da Tabela 2, observa-se um aumento do TLL com o aumento das composições globais de sal e LI para todas as combinações LI + sal consideradas. Quanto maior o conteúdo do composto formador de fase, mais distante é o ponto de mistura global da curva binodal e, portanto, espera-se uma maior diferença nas propriedades intensivas entre as fases formadas. Esse aumento do TLL também pode ser notado na Figura 1.

Considerando a regra da alavanca, observa-se na Figura 1 que as composições de mistura definidas forneceram fases (superior e inferior) de volumes aproximadamente iguais, estando os pontos de mistura aproximadamente na metade das linhas de amarração.

Partição de proteínas em SAB

A partição das proteínas foi testada para os quatro diferentes pontos de mistura globais utilizados para determinação das linhas de

amarração. A Tabela 3 apresenta os valores de coeficiente de partição e eficiência de extração para as proteínas do soro de leite estudadas.

Tabela 3. Coeficientes de partição e eficiência de extração para as proteínas do soro de leite em SAB formados por LI + sal

Proteína	[LI] _M	[Sal] _M	K _p	y _{sup} (%)
Lf	18,00	26,93	40,06±2,14	97,23±0,02
	20,00	24,85	34,97±1,79	97,14±0,13
	22,00	22,78	30,68±1,52	97,83±0,12
	24,00	22,60	26,46±1,28	97,91±0,19
α-la	18,00	26,93	8,93±3,88	87,62±4,77
	20,00	24,85	7,35±2,86	87,39±4,33
	22,00	22,78	6,70±3,37	88,12±5,33
	24,00	22,60	6,17±3,56	88,71±5,88
β-Ig	18,00	26,93	22,80±7,87	94,58±1,77
	20,00	24,85	34,55±11,34	97,08±0,93
	22,00	22,78	27,52±10,91	96,85±1,22
	24,00	22,60	32,09±5,98	97,93±0,38

Os resultados apresentados na Tabela 3 mostram que, para todos os SAB estudados, foram obtidos altos valores de eficiência de extração, superiores a 87%. É, então, possível concluir que a variação da concentração dos componentes formadores de fase exerce pouca influência na migração das proteínas α-la e β-Ig. Nos experimentos de extração, o pH do sistema foi igual a 9,0, estando, assim, acima dos valores de ponto isoelétrico (pI) das proteínas α-la e β-Ig (4,2-4,8 e 5,2-5,4, respectivamente)³⁵ que estão carregadas negativamente. Portanto, na interface, a carga positiva de [C₄mim] atrai as proteínas para a fase superior, rica em LI.¹⁷

Os valores de recuperação teórica da Lf na fase superior, rica em LI, também foram elevados (acima de 97,14%). Entre as diferentes interações existentes entre as moléculas, as interações hidrofóbicas desempenham um papel importante no comportamento de proteínas em solução.³⁶ A hidrofobicidade relativa do LI pode inferir em sua capacidade de extrair proteínas. As interações do LI com a biomolécula podem ser do tipo forças de van der Waals, interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio e π-π entre o anel de imidazólio e o anel aromático de aminoácidos aromáticos.^{8,22} A Lf apresenta pI entre 8 e 8,5,³⁷ próximo do pH do sistema (pH 9,0), o que resulta em um aumento do caráter hidrofóbico, criando uma maior afinidade da proteína pela fase rica em LI. Pei *et al.*⁵ encontraram resultados semelhantes estudando a partição de tripsina em sistemas constituídos por brometo de 1-butil-3-metilimidazólio ([C₄mim][Br]). Lin *et al.*³⁸ estudaram a extração das proteínas BSA, hemoglobina e lisozima em sistemas constituídos por brometo de 1-octil-3-metilimidazólio ([C₈mim][Br]) e K₂HPO₄. Segundo os autores, devido às interações hidrofóbicas mais fortes que ocorrem no pI, os rendimentos de extração de hemoglobina e lisozima foram relativamente otimizados nessas condições.

Verificou-se que o aumento das concentrações de sal promoveu o aumento dos valores de K_p. Em altas concentrações de K₂HPO₄ foi observada a redução da solubilidade da proteína na fase inferior como resultado de competição de um grande número de íons de sal com proteínas pelas moléculas de água³⁹ (efeito *salting out*). Este fato induz a transferência da proteína para a fase superior do sistema.¹⁷

Alvarez-Guerra e Irabien⁴⁰ estudaram a extração de Lf usando LI hidrofóbicos (1-butil-3-metilimidazólio bis[(trifluorometil)sulfonil]imida [C₄mim][NTf₂]) e 1-butil-3-metilimidazólio hexafluorofosfato [C₄mim][BF₆]). No entanto, as eficiências de extração obtidas não foram maiores que 20%.

Os valores de K_p encontrados no presente trabalho foram similares a outros reportados na literatura para SAB compostos por polímero e sal. Chen⁴¹ estudou a partição e separação das proteínas α-la e β-Ig em PEG (polietilenoglicol) utilizando um SAB com fosfato de potássio e obteve valores de coeficiente de partição na faixa de 1 a 7. Mokhtarani *et al.*,⁴² estudando a partição das mesmas proteínas em SAB de polivinilpirrolidona e fosfato de potássio, obtiveram valores na faixa de 1 a 7.

CONCLUSÃO

Os valores de K_p variaram, aproximadamente, de 6,17 a 8,93 para a alfa-lactalbumina, de 22,80 a 34,55 para a beta-lactoglobulina e de 26,46 a 40,06 para a lactoferrina. Os valores de eficiência de extração maiores que 87% indicam uma elevada migração das proteínas para a fase superior rica em LI dos SAB. Dessa forma, a partir dos resultados obtidos e discutidos, os SAB baseados em LI sob investigação no presente trabalho podem ser considerados uma alternativa promissora para extração de proteínas do soro de leite.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS

1. Fox, P. F.; McSweeney, P. L. H.; *Dairy Chemistry and Biochemistry*, Blakie Academic & Professional, 2001.
2. Matsumoto, H.; Shimokawa, Y.; Ushida, Y.; Toida, T.; Hayasawa, H.; *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **2001**, *65*, 1104.
3. Heine, W. E.; Klein, P. D.; Reeds, P. J.; *J. Nutr.* **1991**, *121*, 277.
4. Bayeye, S.; Ellass, E.; Nazuruier, J.; Spik, G.; Legrand, D.; *Clin. Chem. Lab. Med.* **1999**, *37*, 281.
5. Pei, Y.; Jianji, W.; Wu, K.; Xuan, X.; Lu, X.; *Sep. Purif. Technol.* **2009**, *64*, 288.
6. Neves, C. M. S. S.; Ventura, S. P. M.; Freire, M. G.; Marrucho, I. M.; Coutinho, J. A. P.; *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 5194.
7. Ventura, S. P. M.; Neves, C.; Freire, M. G.; Marrucho, I. M.; Oliveira, J.; Coutinho, J. A. P.; *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 9304.
8. Ventura, S. P. M.; Sousa, S. G.; Freire, M. G.; Lima, A. S.; Coutinho, J. A. P.; *J. Chromatogr. B* **2011**, *879*, 2679.
9. Silva, L. H. M.; Loh, W.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 1345.
10. Liu, Y.; Yu, Y. L.; Chen, M. Z.; Xiao, X.; *Canadian Journal on Chemical Engineering & Technology* **2011**, *2*.
11. Perumalsamy, M.; Bathmalakshmi, A.; Murugesan, T.; *J. Chem. Eng. Data* **2007**, *52*, 1186.
12. Gutowski, K. E.; Broker, G. A.; Willauer, H. D.; Huddleston, J. G.; Swatoski, R. P.; Holbrey, J. D.; Rogers, R. D.; *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6632.
13. Cassol, C. C.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2007.
14. Wei, D.; Ivaska, A.; *Anal. Chim. Acta* **2008**, *607*, 126.
15. Pandey, S.; *Anal. Chim. Acta* **2006**, *556*, 38.
16. Wasserscheid, P.; Welton, T.; *Ionic liquids in synthesis*, Wiley-VCH: Weinheim, 2003.
17. Du, Z.; Yu, Y. L.; Wang, J. H.; *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 2130.
18. Ruiz-Angel, M. J.; Pino, V.; Carda-Broch, S.; Berthod, A.; *J. Chromatogr. A* **2007**, *1151*, 65.
19. Cláudio, A. F. M.; Freire, M. G.; Freire, C. S. R.; Silvestre, A. J. D.; Coutinho, J. A. P.; *Sep. Purif. Technol.* **2010**, *75*, 39.
20. Passos, H.; Ferreira, A. F.; Cláudio, A. F. M.; Coutinho, J. A. P.; Freire, M. G.; *Biochem. Eng. J.* **2012**, *67*, 68.

21. Dreyer, S.; Kragl, U.; *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, *99*, 1416.
22. Louros, C. L. S.; Claudio, A. F. M.; Neves, C. M. S. S.; Freire, M. G.; Marrucho, I. M.; Pauly, J.; Coutinho, J. A. P.; *Int. J. Mol. Sci.* **2010**, *11*, 1777.
23. Pereira, M. M.; Pedro, S. N.; Quental, M. V.; Lima, A. S.; Coutinho, J. A. P.; Freire, M. G.; *J. Biotechnol.* **2015**, *in press*.
24. Freire, M. G.; Neves, C.; Silva, A. M. S.; Santos, L. M. N. B. F.; Marrucho, I. M.; Rebelo, L. P. N.; Shah, J. K.; Maginn, E. J.; Coutinho, J. A. P.; *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 2004.
25. Canongia Lopes, J. N.; Costa Gomes, M. F.; Husson, P.; Pádua, A. A. H.; Rebelo, L. P. N.; Sarraute, S.; Tariq, M.; *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 6088.
26. Domanska, U.; Krolikowski, M.; *J. Chem. Eng. Data* **2010**, 4817.
27. Pei, Y. C.; Wang, J. J.; Xuan, J. X.; Fan, P.; Fan, M. H.; *Environ. Sci. Technol.* **2007**, *41*, 5090.
28. Collins, K. D.; *Biophys. Chem.* **2006**, *119*, 271.
29. Albertsson, P. A.; *Partition of Cell Particles and Macromolecules*, 2nd edition, Wiley: New York, 1971.
30. Merchuk, J. C.; Andrews, B. A.; Asenjo, J. A.; *J. Chromatogr. B* **1998**, *711*, 285.
31. Raja, S.; Murty, V. R.; *The Scientific World Journal* **2013**, doi: 10.1155/2013/819259.
32. Han, J.; Wang, Y.; Yu, C.; Li, Y.; Kang, W.; Yan, Y.; *J. Chem. Thermodyn.* **2012**, *45*, 59.
33. Hu, M.; Zhai, Q.; Liu, Z.; Xia, S.; *J. Chem. Eng. Data* **2003**, *48*, 1561.
34. Picó, A.; Colavizza, D.; Benaissa, M.; Maes, P.; Tartar, A.; Montreuil, J.; Spik, G.; *J. Chromatogr. B* **2008**, *830*, 286.
35. Onwulata, C.; Huth, P. J.; *Whey processing, functionality and health benefits*, IFT Press, Wiley-Blackweel, USA, 2008.
36. Yaminsky, V. V.; Vogler, E. A.; *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2001**, *6*, 342.
37. Lonnerdal, B.; Iyer, S.; *Annu. Rev. Nutr.* **1995**, *15*, 93.
38. Lin, X.; Wang, Y.; Zeng, Q.; Ding, X.; Chen, J.; *Analyst*, **2013**, *138*, 6445.
39. Zaslavsky, B. Y.; Miheeva, V.; Mesteckina, N. M.; Rogozhin, S. V.; *J. Chromatogr.* **1982**, *253*, 149.
40. Alvarez-Guerra, E.; Irabien, A.; *Sep. Purif. Technol.* **2012**, *98*, 432.
41. Chen, J. P.; *J. Ferment. Bioeng.* **1992**, *73*, 140.
42. Mokhtarani, B.; Mortaheb, H. R.; Mafi, M.; Amini, M. H.; *J. Chromatogr. B* **2011**, *879*, 721.