

Partição das proteínas da Moringa em sistemas aquosos bifásicos formados por  
Polióxido de etileno e sulfato de sódio ou sulfato de lítio.  
LEONEL, G. V.F<sup>a</sup>, SANTOS, H.C.<sup>a</sup>, PAULA, H.M.C.<sup>b</sup>, SILVA, L.H.M<sup>b</sup>, PIRES,  
A.C.S<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Grupo de Termodinâmica Molecular Aplicada (THERMA), Departamento de  
Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Brasil

<sup>b</sup> Grupo de Química Verde Coloidal e Macromolecular (QUIVECOM), Departamento  
de Química, Universidade Federal de Viçosa, Brasil

## RESUMO

A adoção de novos hábitos alimentares proporcionou um aumento na demanda de consumo de proteínas de origem vegetal. No entanto, métodos de extração e purificação de proteínas, em sua maioria, utilizam solvente orgânicos, que podem causar a perda das propriedades funcionais e baixa recuperação. Assim, a utilização de sistemas aquosos bifásicos (SABs) emerge como uma ferramenta economicamente viável e eficiente. O extrato proteico das folhas da Moringa *Oleifera* foi particionado no SAB PEO 1500 + H<sub>2</sub>O + Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ou Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 298,15K e a energia livre de Gibbs de transferência entre fases ( $\Delta_{tr}G^\circ$ ) foi determinada. No comprimento de linha de amarração (CLA) = 32,5 para o SAB formado por PEO1500-Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, a  $\Delta_{tr}G^\circ$  é igual a -4,5 kJmol<sup>-1</sup>, indicando que as proteínas da Moringa concentram-se na fase superior nestas condições termodinâmicas. No entanto, ao aumentar o CLA, a diferença entre as propriedades termodinâmicas intensivas aumenta e as proteínas passam a se concentrar na fase inferior. O processo de transferência da proteína da fase inferior para superior ocorre com a redução da entropia. Desta forma, a contribuição entálpica é a força motriz que dirige o processo de transferência, advindos dos processos moleculares de interação.

## INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a demanda de consumo de proteínas vegetais aumentou, impulsionada pela adoção de novos hábitos alimentares (1). No entanto, para tornar as proteínas de fonte vegetal economicamente e sustentavelmente viáveis é necessária a escolha adequada do método de extração e particionamento a ser utilizado para assegurar uma boa recuperação do analito. Assim, a utilização dos métodos convencionais de separação e purificação de proteínas que utilizam solventes orgânicos torna-se inviável na maioria dos casos (2,3). Por outro lado, a utilização de sistemas aquosos bifásicos (SABs) emerge como uma ferramenta economicamente viável, ambientalmente amigável e eficiente.

Os SABs são elaborados a partir de uma solução ternária, composta predominantemente por água (60-95%), polímero e sal. Esses sistemas possuem a vantagem de apresentar baixa toxicidade ao organismo humano sendo potencial para os processos de separação e purificação de biopartículas. Além disso, é uma técnica simples, facilmente escalonável e que permite a reutilização dos reagentes (4).

Em geral, as proteínas são distribuídas entre as fases dos SABs e podem ser caracterizadas pelo coeficiente de partição (K). Os valores de K podem ser afetados por propriedades físico-químicas da proteína e das fases que constituem os SABs. Fatores como: o tamanho

da proteína, estrutura conformacional e presença de carga elétrica são exemplos das propriedades físico-químicas que afetam a distribuição das proteínas nos SABs. Por outro lado, a contribuição das fases nos valores de K está relacionada com a natureza química dos componentes formadores do SABs, como, massa molar, hidrofobicidade, concentração dos polímeros, pH e temperatura (2,5).

Shahriari et al., (2010) estudaram o particionamento da  $\beta$ -amilase e amiloglicosidade em SABs (PEO 4000, PEG 6000 ou PEG 10000 + Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ou KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) em diferentes temperaturas (298-308 K). Os valores de K para as duas enzimas foram menores que 1, indicando que a maior concentração foi na fase inferior, rica em sal. Também foi observado que à medida que a concentração de sal era aumentada o K também aumentava. Por outro lado, à medida que a concentração de PEO era aumentada os valores de K diminuem para as duas enzimas estudadas. A partir deste estudo é possível fornecer quais as melhores condições para a purificação da  $\beta$ -amilase e amiloglicosidade sem a produção de efeitos destrutivos na estrutura das biomoléculas.

A partir dos valores obtidos de K em regime de diluição infinita podemos relacionar com a função termodinâmica de transferência  $\Delta_{tr}G$  e estudar as interações da proteína com os constituintes formadores dos SABs (6). Assim, determinar a  $\Delta_{tr}G$  permite compreender melhor as forças que dirigem o processo de particionamento da proteína nos SABs.

## OBJETIVO

Neste trabalho, objetivou-se em particionar o extrato proteico das folhas da *Moringa Oleifera* no SAB PEO 1500 + H<sub>2</sub>O + Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ou Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 298,15K e determinar a energia livre de Gibbs de transferência entre fases ( $\Delta_{tr}G^\circ$ ).

## METODOLOGIA

Para preparar os sistemas foram utilizadas 25g de cada fase para cada linha de amarração. A composição dos SABs para o particionamento de proteínas foi preparada de acordo com estudos prévios (6,7). Após atingir o equilíbrio termodinâmico, as duas fases foram coletadas separadamente para o experimento de partição. Em seguida, 5 g de cada fase e 0,15mg de EPFMO foram adicionadas a um tubo de vidro e agitados lentamente até a completa solubilização do extrato. Os sistemas foram armazenados em banho termostático a 25°C, por no mínimo 24 horas para atingir o equilíbrio termodinâmico.

Uma alíquota de cada fase é coletada para análise no espectrômetro UV-visível, no comprimento de onda de 280 nm. O coeficiente de partição (K) foi determinado a partir Eq. 1.

$$\frac{Abs FS_{280nm}}{Abs FI_{280nm}} = K \quad \text{Eq.1}$$

O K foi estudado em diferentes comprimentos de linha de amarração (CLA)(%m/m) dos SABs. O CLA pode ser calculado a partir da Eq. 2, que expressa numericamente a diferença nas funções termodinâmicas intensivas entre as fases superior e inferior, a pressão e temperatura constante.

$$CLA = \sqrt{(C_p^S - C_p^I)^2 - (C_s^S + C_s^I)^2} \quad \text{Eq. 2}$$

Onde  $C_p^S$  e  $C_p^I$  são as concentrações do polímero na fase superior e inferior, respectivamente, e  $C_s^S$  e  $C_s^I$  são as concentrações do sal na fase superior e inferior, respectivamente.

A variação da energia livre de Gibbs de transferência ( $\Delta_{tr}G^\circ$ ) pode ser determinada a partir da Eq. 3, que corresponde a variação da energia livre de Gibbs quando 1 mol de proteínas é transferido da fase inferior para a superior.

$$\Delta_{tr}G^\circ = -RT \ln k \quad \text{Eq. 3}$$

Onde R é a constante universal dos gases, T a temperatura e k é o coeficiente de partição da proteína.

## RESULTADO E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra a dependência de  $\Delta_{tr}G^\circ$  em relação aos valores de CLA.

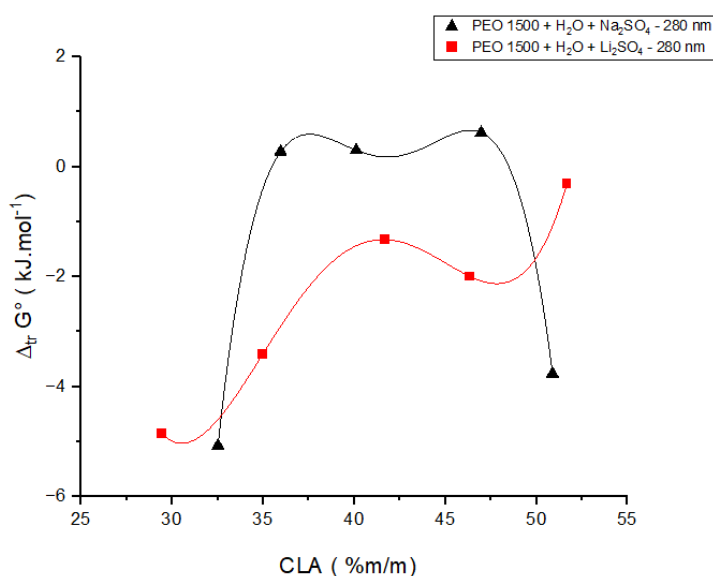


Figura 1: Partição das proteínas da Moringa em SAB PEO 1500 + H<sub>2</sub>O + Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ou PEO 1500 + H<sub>2</sub>O + Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 298,15K.

Para o SAB formado por PEO1500-Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,  $\Delta_{tr}G^\circ$  é igual a -4,5 kJmol<sup>-1</sup> para CLA=32,5 demonstrando que as proteínas da Moringa se concentram na fase superior nestas condições termodinâmicas. Entretanto com o aumento do CLA, isto é, aumentando a diferença entre as propriedades termodinâmicas das fases as proteínas passam a se concentrar na fase inferior.

O valor de  $\Delta_{tr}G^\circ$  é resultado da contribuição de duas componentes:  $\Delta_{tr}H^\circ$  e  $\Delta_{tr}S^\circ$ . Em SABs formados por polímero e sal, a transferência de proteínas da fase rica em eletrólito (fase inferior) para a fase rica em polímero (fase superior) ocorre com a diminuição da entropia do sistema ( $\Delta_{tr}S^\circ < 0$ ), pois o número de diferentes configurações moleculares na fase superior é menor do que aquelas da fase inferior. Este fato deve-se, principalmente, às moléculas de PEO que são formadas por segmentos moleculares conectados covalentemente, reduzindo, assim, o grau de liberdade destes segmentos no espaço. Desta forma, a única força motriz para a transferência das proteínas da Moringa

para a fase superior seria a liberação de energia entálpica ( $\Delta_{tr}H^\circ < 0$ ). A variação da entalpia do sistema durante o processo de transferência é resultante de alguns processos moleculares, como mostra a seguinte equação  $\Delta_{tr}H^\circ = \Delta_{pr-FI}H^\circ + \Delta_{pr-FS}H^\circ + \Delta_{FI-FI}H^\circ + \Delta_{FS-FS}H^\circ$ , mostrando que para  $\Delta_{tr}H^\circ < 0$ , nós teremos que ter sempre  $-\left[\Delta_{pr-FS}H^\circ + \Delta_{FI-FI}H^\circ\right] > \left[\Delta_{pr-FI}H^\circ + \Delta_{FS-FS}H^\circ\right]$ . Esta relação entre os fatores entálpicos demonstram que a proteína se desloca para a fase formada pelos componentes que mais interagem com estes biopolímeros, isto é, as proteínas de moringa interagem favoravelmente com as moléculas de PEO. Entretanto não podemos, a princípio, desconsiderar a contribuição das interações eletrostáticas promovidas pelos íons do sal formador da fase inferior. Para determinar essa contribuição eletrostática foi realizada também a partição das proteínas da moringa num SAB formado por PEO 1500–Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Os valores de  $\Delta_{tr}G^\circ$  ficaram na mesma magnitude no sistema sulfato de sódio e sulfato de lítio demonstrando assim que a natureza do eletrólito tem pouco efeito sobre a partição das proteínas da moringa. A contribuição do íon sódio e do íon lítio para a entropia configuracional do sistema é a mesma visto os dois íons terem aproximadamente a mesma razão carga/raio. Desta forma a pequena variação observada nos valores de  $\Delta_{tr}G^\circ$  advém de contribuições entálpicas. É reconhecido que os íons de lítio interagem com os segmentos de oxido de etileno (EO) presentes no PEO formando assim um pseudopolication que intensifica a interação eletrostática com as proteínas da moringa, aumentando assim a transferência destes biopolímeros para a fase superior.

## CONCLUSÃO

A transferência das proteínas em SAB formados por PEO 1500 + H<sub>2</sub>O + Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para a fase superior é mais favorável com a diminuição do CLA. O processo de transferência entre as fases ocorre com a perda de entropia configuracional, sendo a entalpia a única força motriz que governa este processo. Deste modo, a contribuição entálpica demonstra que a proteínas de moringa interagem favoravelmente com as moléculas de PEO. Além disso, os diferentes sais formadores do SAB demonstraram pouca influência no particionamento das proteínas, por apresentarem a mesma razão carga/raio. O uso dos SABs é uma alternativa sustentável aos métodos convencionais de purificação, promovendo a concentração da proteína na fase em que ela interage de forma mais favorável.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES, ao CNPq e à FAPEMIG pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. REZENDE, J. P. et al. Application of Congo red dye as a molecular probe to investigate the kinetics and thermodynamics of the formation processes of arachin and conarachin nanocomplexes. **Food Chemistry**, v. 384, p. 132485, 2022.
2. SILVA, L. H. M.; LOH, W. Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. **Química Nova**, v. 29, 2006.
3. EBRAHIMI T.; SHAHRIARI S. Extraction of betanin using aqueous two-phase systems. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v.89, n.5, p. 565–572, 2016.

4. SHAHRIARI S. et al. Measurement of partition coefficients of  $\beta$ -amylase and amyloglucosidase enzymes in aqueous two-phase systems containing poly (ethylene glycol) and  $\text{Na}_2\text{SO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  at different temperatures. **Fluid Phase Equilibria**, v.292, p. 80–86, 2010.
5. JAYAPAL M.; REGUPATHI I.; MURUGESAN T. Liquid-Liquid Equilibrium of Poly (ethylene glycol) 2000 + Potassium Citrate + Water at (25, 35, and 45) °C. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 52, n. 1, p. 56-59, 2007.
6. COELHO Y. L. et al. New Insights into the Partitioning of Phenothiazine Dyes in Aqueous Two-Phase Systems. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, p. 1700-1713, 2020.
7. MARTINS J. P. et al. Liquid-liquid equilibria of an aqueous two-phase system containing poly (ethylene) glycol 1500 and sulfate salts at different temperatures. **Journal of Chemical & engineering data**, v. 53, n. 1, p. 238-241, 2008.