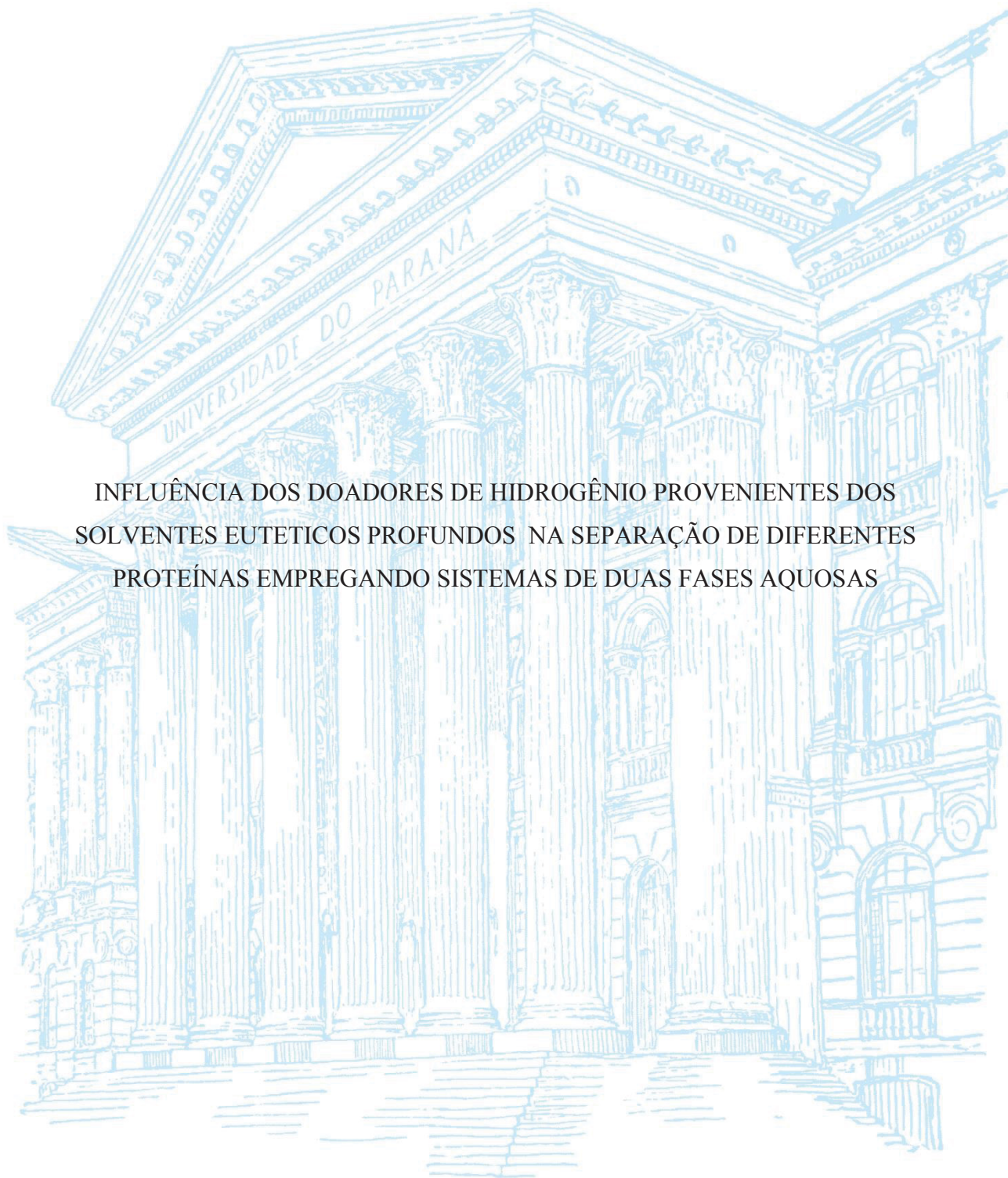


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TÂMISA PIRES MACHADO DOS SANTOS



INFLUÊNCIA DOS DOADORES DE HIDROGÊNIO PROVENIENTES DOS
SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS NA SEPARAÇÃO DE DIFERENTES
PROTEÍNAS EMPREGANDO SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS

CURITIBA

2019

TÂMISA PIRES MACHADO DOS SANTOS

INFLUÊNCIA DOS DOADORES DE HIDROGÊNIO PROVENIENTES DOS
SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS NA SEPARAÇÃO DE DIFERENTES
PROTEÍNAS EMPREGANDO SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS

Tese de Doutorado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de doutora em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof.^a Dra. Luciana Igarashi- Mafra
Coorientador: Prof. Dr. Marcos R. Mafra

CURITIBA
2019

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

S237i

Santos, Tâmisia Pires Machado dos

Influência dos doadores de hidrogênio provenientes dos solventes eutéticos profundos na separação de diferentes proteínas empregando sistemas de duas fases aquosas [recurso eletrônico] /Tâmisia Pires Machado dos Santos. – Curitiba, 2019.

Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, 2019.

Orientadora: Luciana Igarashi Mafra. Coorientador: Marcos Rogério Mafra.

1. Hidrogênio. 2. Açúcares (Química orgânica). 3. Biomoléculas. 4. Extração (Química). 5. Solventes. I. Universidade Federal do Paraná. II. Mafra, Luciana Igarashi. III. Mafra, Marcos Rogério. IV. Título.

CDD: 547

Bibliotecária: Vanusa Maciel CRB- 9/1928

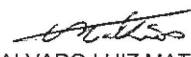
TERMO DE APROVAÇÃO

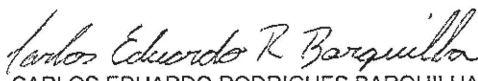
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA DE ALIMENTOS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **TÂMISA PIRES MACHADO DOS SANTOS** intitulada: **Influência dos doadores de hidrogênio provenientes dos solventes eutéticos profundos na separação de diferentes proteínas empregando sistemas de duas fases aquosas**, sob orientação da Profa. Dra. LUCIANA IGARASHI MAFRA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

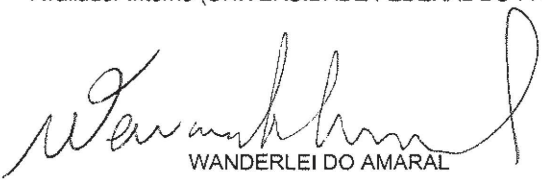
A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 17 de Dezembro de 2019.


LUCIANA IGARASHI MAFRA
Presidente da Banca Examinadora


ALVARO LUIZ MATHIAS
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)


CARLOS EDUARDO RODRIGUES BARQUILHA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ -UFPR)


WANDERLEI DO AMARAL
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)


RODRIGO CORRÊA BASSO
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS)

*A minha família por todo amor e suporte
que me deram forças para chegar até aqui.*

AGRADECIMENTOS

A Deus que me sustentou e capacitou até aqui, esteve comigo durante toda caminhada, dando sabedoria e fé para seguir em frente.

Aos meus amados pais Altair Machado e Raquel Pires, os quais estiveram presentes em todos os momentos. Pelo carinho e consolo nas horas em que o medo falou mais alto, pela amizade e companheirismo. Por serem meu sustento, por estarem constantemente orando por mim. Pelo amor, força e exemplo, muito obrigada.

Ao meu marido, companheiro e amigo Junior, por sempre me apoiar. Pela paciência, força e incentivo que me fez não desistir nos momentos de dificuldade. Por entender minha ausência em muitos momentos, suportar o estresse, acreditar em mim e estar ao meu lado todos os dias. Por ser presença constante em minha vida e coração.

Aos meus irmãos Hudson Pires e Jordão Pires e cunhadas Francine Sidenco e Bruna Catapan, pelo apoio, orações e amor incondicional. As minhas sobrinhas Júlia e Clara, meus anjinhos, por sempre alegrarem meus finais de semana e demonstrarem tanto amor e admiração.

Aos meus orientadores Luciana Igarashi-Mafra e Marcos Mafra, pelos ensinamentos, pela amizade e principalmente por confiarem em mim nos momentos de dificuldade dessa caminhada.

A minha amiga Fabiane Farias, por estar comigo desde o início, pelas palavras de incentivo e consolo muitas vezes. Por ter disposto seu tempo para me ajudar no desenvolvimento desse trabalho. Sua amizade e ajuda foram essenciais para que eu pudesse concluir essa etapa.

A Danielle Wisniewski e a Grazielle Oliveira que foram muito mais que amigas. Obrigada pelo incentivo, apoio, ajuda em tudo sempre. Pela amizade, carinho e cuidado comigo. Com certeza foram fundamentais para eu chegar até aqui.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de estudo concedida e a Universidade Federal do Paraná e ao Departamento de Engenharia Química pela infraestrutura.

A todos aqueles que de alguma maneira estiveram presentes, contribuindo com este trabalho, muito obrigada.

Deus nunca disse que a jornada seria fácil, mas

Ele disse que a chegada valeria a pena.

(Max Lucado)

RESUMO

Sistemas de duas fases aquosas (SDFA) vem sendo amplamente aplicados em estudos de processos de extração e partição de biomoléculas. Estes sistemas são formados em sua maioria por água e pelo menos dois componentes formadores de fase. Para maximizar a eficácia desses sistemas, têm-se buscado alternativas para substituir os formadores convencionais de fases. Nesse âmbito surgem os solventes eutéticos profundos (DES), os quais têm apresentado boa capacidade na separação de diferentes biomoléculas. Entretanto, o alto teor de água presente nos sistemas de duas fases aquosas resulta na quebra das ligações de hidrogênio formadoras dos solventes eutéticos profundos. Essa quebra causa uma partição não estequiométrica entre o doador e receptor de hidrogênio nas fases do SDFA, os quais passam a ser considerados sistemas quaternários. Apesar disso, têm-se verificado que a presença dos constituintes do DES no SDFA é capaz de alterar a características físico-químicas das fases em equilíbrio. O objetivo deste estudo foi avaliar o uso da glucose, xilitol e sorbose, ou seja, diferentes açúcares como moléculas doadoras de hidrogênio na formação de DES compostos por cloreto de colina ($(N_{111}(2OH))Cl$), nas razões molares 2:1, 1:1 e 1:2. Estes solventes foram aplicados como formadores de fases em SDFA com fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) e então avaliados quanto a partição das proteínas BSA, lisozima e colágeno hidrolisado. Foi realizado o levantamento dos dados de equilíbrio dos sistemas, ou seja, obtenção das curvas binodais e as linhas de amarração. Observou-se que a presença dos açúcares não apresentou influência na formação de fases dos sistemas, porém, a natureza e a concentração desses doadores afetam a região bifásica. Verificou-se a formação de uma fase rica em $(N_{111}(2OH))Cl$ e a outra rica em K_2HPO_4 . O coeficiente de partição (K) e a eficiência de extração ($EE\%$) das proteínas nestes sistemas foram avaliados. A menor $EE\%$ foi obtida no sistema formado por glucose (1:2) na partição da BSA (19,85%). Esse mesmo sistema apresentou o maior valor de $EE\%$ (97,04%) para a partição da BSA em razão molar 2:1. Para a lisozima, todos os doadores de hidrogênio avaliados na razão molar 1:1 apresentaram $EE\%$ superior a 90%. A partição do colágeno apresentou melhor $EE\%$ (93,04%) no SDFA formado por glucose em razão molar 1:1. Foi possível perceber a presença e a estrutura da molécula doadora de hidrogênio, bem como as características da biomolécula a ser separada influenciam no processo e na eficiência de separação, sendo necessário avaliar cada caso em particular e utilizar os doadores como “*designer solvents*”. Através da análise de dicroísmo circular em comparação qualitativa foi possível perceber que o processo de partição com uso de SDFA bem como a presença dos componentes do sistema, não alteram a estrutura das biomoléculas. Desta forma, os SDFA quaternários podem ser desenvolvidos especificamente e aplicados como um método de separação inócuo as proteínas.

Palavras-chave: Sistema quaternário. Açúcares. Extração líquido-líquido. Partição. Biomoléculas.

ABSTRACT

Aqueous two-phase systems (ATPS) come widely applied in studies of extraction and partition processes of biomolecules. These systems are formed mostly water and at least two-phase forming components. To maximize the effectiveness of these systems, alternatives have been sought to replace conventional phase formers. In this context arise deep eutectic solvents (DES), which have shown good ability to separate different biomolecules. The high-water content present in aqueous two-phase systems results in the breakdown of hydrogen bonds that form deep eutectic solvents. This breakdown causes a non-stoichiometric partition between the hydrogen donor and acceptor of DES in the ATPS phases, which become quaternary systems. Nevertheless, it has been found that the presence of DES constituents in ATPS can alter the physicochemical characteristics of the equilibrium phases. The aim of this study was to evaluate the use of glucose, xylitol and sorbose, that is, different sugars as hydrogen donor molecules in the formation of DES composed by choline chloride ($N_{111}(2OH)Cl$), at molar ratios 2:1, 1:1 and 1:2. These solvents were applied as phase builders in SDFAs with dibasic potassium phosphate (K_2HPO_4) and then evaluated for the partition of BSA, lysozyme and hydrolyzed collagen proteins. The systems equilibrium data were collected, that is, the binodal curves and the tie lines were obtained. It was observed that the presence of sugars did not influence the phase formation of the systems, however, the nature and concentration of these donors affect the biphasic region. The formation of a phase rich in ($N_{111}(2OH)Cl$) and the other rich in K_2HPO_4 was observed. The partition coefficient (K) and protein extraction efficiency ($EE\%$) in these systems were evaluated. The smallest $EE\%$ was obtained in the system formed by glucose (1:2) in the BSA partition (19.85%). These same systems also presented the highest value obtained (97.04%) in the partition of BSA in the 2:1 molar ratio. For lysozyme all hydrogen donors evaluated at 1:1 molar ratio presented $EE\%$ over 90%. Collagen partition showed better $EE\%$ (93.04%) in the ATPS formed by glucose in 1:1 molar ratio. It was possible to realize that both the presence and structure of the hydrogen donor molecule, as well as the characteristics of the biomolecule to be separated influence the process of separation and efficiency, being necessary to evaluate each one in particular case and to use the donors as designer solvents. Through the analysis of circular dichroism in qualitative comparison it was possible to realize that the partition process using ATPS as well as the presence of the system components do not alter the structure of the biomolecules. Thus, quaternary SDFAs can be specifically developed and applied as a method of innocuous separation of proteins.

Keywords: Quaternary system. Sugars. Liquid liquid extraction. Partition. Biomolecules

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESQUEMA DE APRESENTAÇÃO DA REVISÃO DA LITERATURA.	20
FIGURA 2. ESQUEMA DE LIGAÇÃO DE RECEPTOR E DOADOR DE HIDROGÊNIO NA FORMAÇÃO DO SOLVENTE EUTÉTICO PROFUNDO.....	21
FIGURA 3 - ESQUEMA DE DIAGRAMA DE FASE SÓLIDO LÍQUIDO PARA UMA MISTURA EUTÉTICA BINÁRIA.	22
FIGURA 4 - SÉRIE DE HOFMEISTER	26
FIGURA 5 - DIAGRAMA DE FASES DE UMA MISTURA A+B+H ₂ O	28
FIGURA 6 - ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA ALBUMINA DE SORO BOVINO.	33
FIGURA 7 - ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA PROTEÍNA LISOZIMA	33
FIGURA 8 - ESQUEMA DE APRESENTAÇÃO DA TESE.....	36
FIGURA 9 - ESQUEMA DO APARATO EXPERIMENTAL UTILIZADO PARA OBTENÇÃO DOS DADOS DE EQUILÍBRIO. (1) REATOR ENCAMISADO, (2) AGITADOR MAGNÉTICO, (3) BANHO TERMOSTÁTICO COM CIRCULAÇÃO DE ÁGUA, (4) SAÍDA DE ÁGUA DO REATOR E (5) ENTRADA DE ÁGUA NO REATOR.	41
FIGURA 10 - ESPECTROS DE DICROISMO CIRCULAR CARACTERISTICO PARA ESTRUTURAS α - HÉLICE, β - FOLHA E RANDOMIZADA	46
FIGURA 11 - SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS: 1.a) CHCl.U 2:1; 1.b) CHCl.U 1:1; 1.c) CHCl.U 1:2; 2.a) CHCl.G 2:1; 2.b) CHCl.G 1:1; 2.c) CHCl.G 1:2; 3.a) CHCl.X 2:1; 3.b) CHCl.X 1:1; 3.c) CHCl.X 1:2; 4.a) CHCl.S 2:1; 4.b) CHCl.S 1:1; 4.c) CHCl.S 1:2.....	49
FIGURA 12 - SDFA COM PELÍCULA LIPÍDICA FORMADA DURANTE A EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA DA MATRIZ DE SOJA.	50
FIGURA 13. RESUMO ESQUEMÁTICO DO DESENVOLVIMENTO PRÁTICO DO TRABALHO.....	52
FIGURA 14 - DIAGRAMAS DE FASES OBTIDOS A 25 °C E PRESSÃO ATMOSFÉRICA DOS SDFA COMPOSTOS POR DES+K ₂ HPO ₄ + H ₂ O, UTILIZANDO DIFERENTES DOADORES DE HIDROGÊNIO A DIFERENTES RAZÕES	

MASSICAS (▲) 2:1, (■)1:1 E (●) 1:2 E (•) SISTEMA TERNÁRIO FORMADO POR $[N_{111(2OH)}]Cl + K_2HPO_4 + H_2O$ 53

FIGURA 15 - DIAGRAMA DE FASES DOS SDFA COMPOSTOS POR DES + $K_2HPO_4 + H_2O$ EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE $[N_{111(2OH)}]Cl$ COM DIFERENTES DOADORES DE HIDROGÊNIO NAS TRÊS RAZÕES MÁSSICAS ESTUDAS COM $[N_{111(2OH)}]Cl$: (▲) 2:1, (■) 1:1, (●) 1:2 E (□) PARA O SISTEMA TERNÁRIO FORMADO POR $[N_{111(2OH)}]Cl + K_2HPO_4 + H_2O$ 55

FIGURA 16. DIAGRAMA DE FASES DOS SDFA COMPOSTOS POR DES + $K_2HPO_4 + H_2O$ OBTIDOS A 25 °C E PRESSÃO ATMOSFÉRICA COM DIFERENTES DOADORES DE HIDROGÊNIO (●) UREIA, (●) GLUCOSE, (●)XILITOL E (●) SORBOSE NAS TRÊS RAZÕES MÁSSICAS ESTUDAS. 56

FIGURA 17 - EXEMPLO DO GRÁFICO DE TGA PARA A QUANTIFICAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DAS FASES CONHECIDAS DO SDFA: $[N_{111(2OH)}]Cl$:UREIA + $K_2HPO_4 + H_2O$, (□) PERDA DE MASSA (% M/M); (- - -) DTA (%/MIN). 58

FIGURA 18 - EXEMPLO DE ESPECTRO DE TGA PARA A QUANTIFICAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DAS FASES DO SDFA: $[N_{111(2OH)}]Cl$:SORBOSE + $K_2HPO_4 + H_2O$ (1:1) , (□) PERDA DE MASSA (% M/M); (- - -) DTA (%/MIN). 59

FIGURA 19 - RAZÃO MÁSSICA ENTRE RECEPTOR (RH) E DOADOR (DH) DE HIDROGÊNIO (NO DES INICIAL (COLUNAS CHEIAS) E EM CADA UMA DAS FASES APÓS A SEPARAÇÃO (COLUNA VAZADAS) NAS 3 RAZÕES MÁSSICAS. 62

FIGURA 20 - REPRESENTAÇÃO TRIDIMENSIONAL DOS SISTEMAS QUATERNÁRIOS $[N_{111(2OH)}]Cl + DOADOR DE HIDROGÊNIO + K_2HPO_4 + H_2O$ EM DIFERENTES RAZÕES $[N_{111(2OH)}]Cl$: DH: (●) 2:1; (●) 1:1 E (●)1:2 E PARA O SISTEMA TERNÁRIO (●) $[N_{111(2OH)}]Cl + K_2HPO_4 + H_2O$ 63

FIGURA 21 - COEFICIENTE DE PARTIÇÃO (K) E EFICIÊNCIA DA EXTRAÇÃO (EE) DA BSA, LISOZIMA E COLAGENO NOS SDFA FORMADOS POR UREIA(■), GLUCOSE (■), XILITOL (■) E SORBOSE (■) NAS RAZÕES MOLARES 2:1, 1:1 E 1:2..... 64

FIGURA 22 - ESPECTRO DE DICROÍSMO CIRCULAR DA PROTEÍNA BSA NOS SDFA $[N_{111(2OH)}]Cl$: DH+ $K_2HPO_4 + H_2O$, ONDE AS LINHAS CONTÍNUAS (□) REPRESENTAM OS SISTEMAS EM RAZÃO MOLAR 2:1 E AS LINHAS PONTILHADAS SISTEMAS EM RAZÃO MOLAR (1:1), SENDO OS DH'S: UREIA, GLUCOSE, SORBOSE E XILITOL. 69

FIGURA 23 - ESPECTRO DE DICROÍSMO CIRCULAR DA PROTEÍNA LISOZIMA NOS SDFA $[N_{111(2OH)}]Cl$: DH+ $K_2HPO_4 + H_2O$, ONDE AS LINHAS CONTÍNUAS (□) REPRESENTAM OS SISTEMAS EM RAZÃO MOLAR 2:1 E AS LINHAS

PONTILHADAS SISTEMAS EM RAZÃO MOLAR (1:1), SENDO OS DH'S: UREIA, GLUCOSE, SORBOSE E XILITOL..... 70

FIGURA 24 - ESPECTRO DE DICROÍSMO CIRCULAR DA PROTEÍNA COLÁGENO HIDROLISADO NOS SDFA [N_{111(20H)}]Cl: DH+ K₂HPO₄ + H₂O, ONDE AS LINHAS CONTÍNUAS (—) REPRESENTAM OS SISTEMAS EM RAZÃO MOLAR 2:1 E AS LINHAS PONTILHADAS SISTEMAS EM RAZÃO MOLAR (1:1), SENDO OS DH'S: UREIA, GLUCOSE, SORBOSE E XILITOL..... 71

FIGURA 25 - ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNETICA NUCLEAR DAS PROTEÍNAS EM SOLUÇÃO AQUOSA a) BSA; b) LISOZIMA E c) COLÁGENO HIDROLISADO..... 72

FIGURA 26 - ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DA FASE DE TOPO DO SISTEMA FORMADO POR [N_{111(20H)}]Cl:UREIA + K₂HPO₄ + H₂O PARA A PARTIÇÃO DA BSA..... 73

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PROTEÍNAS EM ESTUDO, MASSA MOLECULAR (KDa), SOLUBILIDADE EM ÁGUA ($\text{mg}\cdot\text{cm}^{-3}$), PONTO ISOELÉTRICO, NÚMERO DE RESÍDUOS E PRINCIPAIS AMINOÁCIDOS.....	32
TABELA 2 - NOME, CAS, MASSA MOLECULAR, PUREZA E FÓRMULA QUÍMICA DOS REAGENTES UTILIZADOS NO DESENVOLVIMENTO DOS SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS E SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS.....	38
TABELA 3 - ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO DOS DES ESTUDADOS	39
TABELA 4 - SISTEMAS AVALIADOS E AS RESPECTIVAS RAZÕES DOS DES UTILIZADOS.....	40
TABELA 5 - DADOS OBTIDOS PARA VALIDAÇÃO DO USO DO BRADFORD EM SOLUÇÕES COM UREIA.....	44
TABELA 6 - COMPOSIÇÃO DOS DES DESENVOLVIDOS EM CADA RAZÃO MOLAR.....	48
TABELA 7. CONCENTRAÇÕES DOS COMPONENTES DAS FASES SIMULADAS PARA VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE TGA, E AMOSTRAS QUANTIFICADAS POR TGA, ONDE: (1) K_2HPO_4 ; (2) DH; (3) $\text{N}_{111}(\text{OH})\text{Cl}$; (4) H_2O^* , T: FASE DE TOPO E F: FASE FUNDO.....	58
TABELA 8 - DADOS EXPERIMENTAIS DE ELL PARA OS SDFA A 25 °C E PRESSÃO ATMOSFÉRICA.....	60
TABELA 9 - DADOS EXPERIMENTAIS DAS RAZÕES MOLARES ENTRE RECEPTOR DE HIDROGÊNIO (RH) E DOADOR DE HIDROGÊNIO (DH) NA MISTURA INICIAL DO DES E NAS FASES DE TOPO E FUNDO DOS SDFA.	62
TABELA 10 - DADOS EXPERIMENTAIS RELATIVOS À FIGURA 18, PARA O COEFICIENTE DE PARTIÇÃO (K) E EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO (EE %).	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	-	<i>Bovine serum albumin</i> (albumina de soro bovino)
CD	-	Circular Dichroism (dicroísmo circular)
CLA	-	Comprimento da linha de amarração
Col	-	Colágeno Hidrolisado
DES	-	<i>Deep eutectic solvents</i> (solventes eutéticos profundos)
DH	-	Doador de hidrogênio
ELL	-	Equilíbrio líquido- líquido
ESL	-	Equilíbrio sólido líquido
FTIR	-	Espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier
Glu	-	Glucose
KDa	-	KiloDaltons
LA	-	Linha de amarração
LI	-	Líquidos Iônicos
Lis	-	Lisozima
pH	-	Potencial Hidrogeniônico
RH	-	Receptor de hidrogênio
RMN	-	Ressonância Magnética Nuclear
SDFA	-	Sistema de duas fases aquosas
Sor	-	Sorbose
TGA	-	Análise termogravimétrica
Ure	-	Ureia
UV-Vis	-	Ultravioleta-visível
Xil	-	Xilitol

LISTA DE SÍMBOLOS

- K - Coeficiente de partição
- EE% - Eficiência de extração
- Θ - Elipticidade
- $^{\circ}\text{C}$ - Graus célsius
- MM - Massa Molar
- T - Temperatura
- P - Pressão

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 OBJETIVO	18
1.1.1 Objetivo geral	18
1.1.2 Objetivos específicos	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS.....	20
2.2 SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS.....	25
2.2.1 Comportamento de fases dos SDFA.....	27
2.2.2 Sistemas de duas fases aquosas formados por solventes eutéticos profundos....	28
2.3 PROTEÍNAS	29
2.3.1 Estabilidade Proteica	30
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
3.1 DETERMINAÇÃO DOS DADOS DE EQUILÍBRIO LÍQUIDO-LÍQUIDO.....	37
3.1.1 Determinação dos componentes dos sistemas	37
3.1.2 Preparo dos solventes eutéticos profundos	38
3.1.3 Levantamento das curvas binodais	40
3.1.4 Linhas de amarração	41
3.1.4.1 Validação da metodologia termogravimétrica (TGA) empregada na quantificação da composição das fases	42
3.2 PARTIÇÃO DAS PROTEÍNAS	43
3.3 QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNA NAS FASES.....	43
3.4 AVALIAÇÃO DA ESTRUTURA PROTEICA	45
3.4.1 Dicroísmo circular	45
3.4.2 Ressonância Magnética Nuclear	47
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1 DETERMINAÇÃO DOS DADOS DE EQUILÍBRIO	53
4.2 DETERMINAÇÃO DAS LINHAS DE AMARRAÇÃO	57
4.2.1 Validação da metodologia analítica (TGA).....	57

4.2.1	Determinação das linhas de amarração dos SDFA.....	58
4.3	APLICAÇÃO DO SDFA NA PARTIÇÃO DE PROTEÍNAS	64
4.4	AVALIAÇÃO DAS ESTRUTURAS DAS PROTEÍNAS SUBMETIDAS À SEPARAÇÃO EM SDFA	67
4.4.1	Avaliação da estrutura das proteínas por Dicroísmo Circular (DC).....	67
4.4.2	Avaliação de estrutura das proteínas por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	72
5	CONCLUSÃO.....	75
	REFERÊNCIAS	77
	APÊNDICE A	85
	APÊNDICE B.....	88
	APÊNDICE C	93

1 INTRODUÇÃO

As proteínas são macromoléculas amplamente utilizadas nas indústrias alimentícias, cosméticas e farmacêuticas. Formadas por sequências específicas de aminoácidos, a estrutura conformacional das proteínas é dividida em primária, secundária, terciária e quaternária. A exposição das proteínas a condições desfavoráveis, como pH, temperatura e solventes orgânicos, podem promover o fenômeno de desnaturação proteica, a qual pode alterar e até mesmo extinguir sua função biológica.

Diversas técnicas têm sido aplicadas nas etapas de extração, separação, e purificação das proteínas, dentre essas destacam-se a extração líquido-líquido, a qual é uma operação simples, eficiente e de baixo custo.

Os processos de separação empregando sistemas de duas fases aquosas (SDFA) surgem como alternativa aos métodos tradicionais. Estes sistemas são formados quando dois componentes hidrofílicos são diluídos em água formando duas fases aquosas, de diferentes densidades e composições. De acordo com estudos da literatura, os SDFA apresentam boa capacidade de extração a temperatura ambiente e alta seletividade. Além disso, em razão da elevada concentração e água, os SDFA apresentam alta biocompatibilidade. Portanto, o emprego do SDFA na etapa de separação e purificação de proteínas, tende a preservar a sua atividade biológica.

Os SDFA podem ser formados por soluções de polímero-polímero, sal-sal ou polímero-sal. Entretanto, devido a possibilidade de formação de emulsão e a alta viscosidade, tem sido avaliado SDFA formados por solventes alternativos.

A escolha do solvente é um aspecto de extrema relevância, uma vez que a eficiência e capacidade de extração estão diretamente relacionadas. Além disso, quando do emprego na separação de biomoléculas, a escolha do solvente deve contemplar a preservação das características funcionais dos compostos de interesse.

O uso de solventes orgânicos nessas etapas apresenta problemas relativos à toxicidade e a perda da atividade das proteínas. Neste contexto, solventes verdes como os líquidos iônicos e solventes eutéticos profundos (DES) têm sido amplamente estudados. Ambos os solventes apresentam semelhanças físico-químicas, além de serem caracterizados como “*designer solvents*”, ou seja, podem ter as suas propriedades ajustadas aos sistemas de interesse. Os DES são resultantes da formação de um complexo entre um componente doador e um receptor de hidrogênio, estabilizados por fortes

ligações de hidrogênio, e foram assim denominados por apresentarem um grande abaixamento da temperatura de fusão. Os DES podem ser formados a partir de misturas de sais quaternários de amônio, como cloreto de colina, e ácidos carboxílicos, álcoois, ureia, açúcar ou ácidos orgânicos.

O uso de DES em SDFA vem sendo recentemente avaliado para obter um sistema biocompatível, de baixo custo, alto potencial de extração e biodegradável. Entretanto, estudos indicam que a estabilidade das ligações de hidrogênio do DES no SDFA é questionada devido ao alto teor de água presente no sistema, fazendo com que estes sejam tratados como sistemas quaternários.

Com a inovação nos métodos de separação das proteínas, torna-se necessário avaliar a integridade da estrutura da biomolécula após a partição em SDFA. Técnicas como dicroísmo circular (DC) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) são utilizadas quando se deseja verificar e quantificar as estruturas de uma proteína, através de espectros característicos de cada tipo de estrutura.

Portanto, a separação empregando SDFA como etapa de *downstream* da extração de proteínas utilizando DES torna-se um arranjo promissor para projetos industriais. Tendo que a estabilidade dos DES é comprometida em sistemas aquosos, torna-se necessário avaliar a influência dos constituintes dos DES tanto no comportamento de fases como na partição das biomoléculas de interesse.

Desta forma, este trabalho tem como objetivo avaliar a influência da glucose, sorbose e xilitol, empregados como molécula doadora de hidrogênio (DH) na formação dos DES e o cloreto de colina como molécula receptora de hidrogênio (RH), no comportamento de fases de SDFA, bem como na partição de proteínas modelos (BSA, lisozima e colágeno hidrolisado). Técnicas espectroscópicas, *i.e.*, dicroísmo circular e ressonância magnética nuclear foram empregadas com o objetivo de avaliar a preservação das estruturas proteicas.

1.1 OBJETIVO

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a influência de diferentes açúcares como moléculas doadoras de hidrogênio na formação de solventes eutéticos profundos aplicados em sistemas de duas fases aquosas para a separação de proteínas.

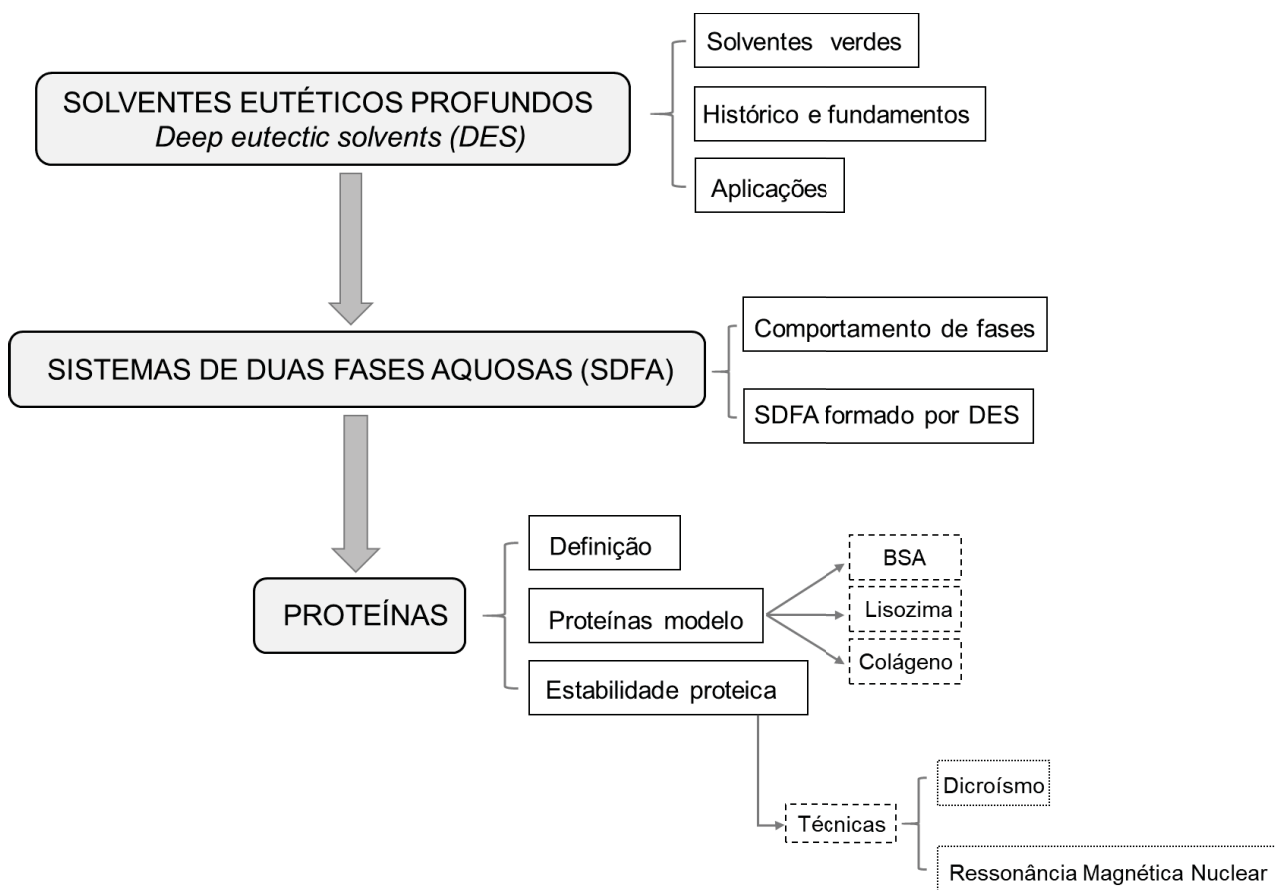
1.1.2 Objetivos específicos

- Obter os DES a partir de diferentes moléculas doadoras de hidrogênio;
- Aplicar os DES para formação de SDFA;
- Caracterizar os diagramas de fases dos sistemas;
- Avaliar a influência das moléculas formadoras de DES no comportamento do SDFA;
- Avaliar a partição de proteínas nos sistemas DES-SDFA com o objetivo de determinar a capacidade dos constituintes do DES em atuar como modulador das fases dos sistemas;
- Avaliar a estabilidade das proteínas submetidas à separação em SDFA formados por DES.
- Avaliar e validar o uso do TGA na caracterização do SDFA.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Nesta seção foram abordados aspectos fundamentais e as aplicações relativas aos principais temas avaliados nesse trabalho de acordo com a FIGURA 1.

FIGURA 1 - ESQUEMA DE APRESENTAÇÃO DA REVISÃO DA LITERATURA.



FONTE: A autora (2019)

2.1 SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS

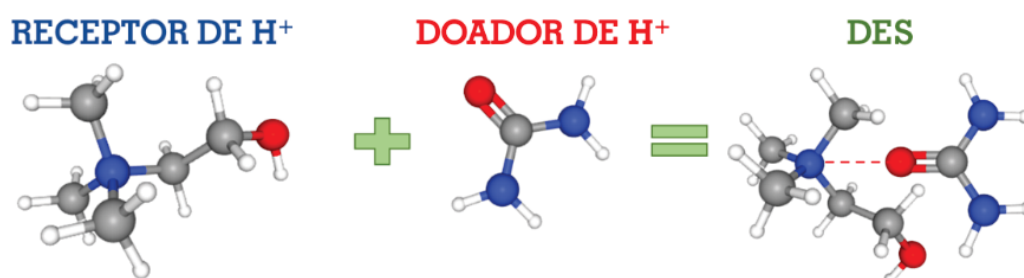
O uso de solventes orgânicos é altamente difundido nas indústrias químicas, petroquímicas, farmacêuticas, alimentícias, dentre outras. Entretanto, estes solventes são em sua maioria tóxicos, enquanto alguns apresentam custo elevado e dificuldade de recuperação e/ou tratamento. Com isso, pesquisadores têm buscado alternativas de baixo custo, atóxicas e de baixo impacto ao meio ambiente, e, nesse contexto, surgem os solventes verdes (JESSOP, 2011). Os solventes verdes vêm da necessidade de desenvolver rotas com menor impacto ambiental, reduzindo a emissão de compostos

orgânicos voláteis. Outro objetivo é reduzir a exposição humana a produtos químicos com alta toxicidade, utilizando matérias primas renováveis e biodegradáveis. Os novos meios reacionais incluem hidrocarbonetos perfluorados, água, fluidos supercríticos (água e CO₂) e os líquidos iônicos. Os líquidos iônicos (LI) são formados por cátions orgânicos volumosos e ânions de diferentes tamanhos, que são líquidos a temperatura ambiente. Estes solventes podem apresentar variação de viscosidade, ponto de fusão, seletividade e outros, de acordo com os compostos utilizados. No entanto, esses solventes são considerados de alto custo e podem apresentar certa toxicidade conferida a partir dos reagentes químicos que o formaram (CLARK; TAVENER, 2007, WANG *et al.*, 2015). Nesse âmbito surgem os solventes eutéticos profundos (DES, do inglês, *Deep Eutectic Solvent*) com características físico químicas semelhantes aos LI, uma classe relativamente recente de solventes verdes, apresentada a seguir:

2.1.1 Solventes eutéticos profundos: Histórico e fundamentos

Resultantes da formação de uma ligação entre uma molécula doadora de hidrogênio e uma outra receptora de hidrogênio (FIGURA 2), os solventes eutéticos profundos (DES), descritos pela primeira vez por Abbott e seus colaboradores em 2003, são assim denominados por apresentarem ponto de fusão inferior aos pontos de fusão dos seus constituintes sólidos puros, como representado na FIGURA 3 (ABBOTT *et al.*, 2003; DAI *et al.*, 2013; FARIAS *et al.*, 2017; SMITH; ABBOTT; RYDER, 2014).

FIGURA 2. ESQUEMA DE LIGAÇÃO DE RECEPTOR E DOADOR DE HIDROGÊNIO NA FORMAÇÃO DO SOLVENTE EUTÉTICO PROFUNDO.

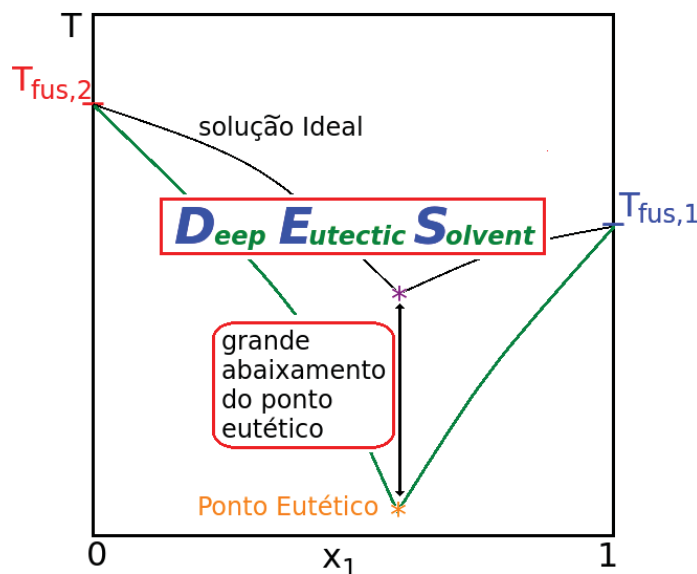


FONTE: A autora (2019)

O primeiro DES relatado foi formado por cloreto de colina [N₁₁₁(20H)]Cl e ureia (NH₂)₂CO, o qual tem permanecido como sendo o mais amplamente estudado

(PASSOS *et al.*, 2016). O cloreto de colina é um dos sais quaternários mais utilizados nas combinações para formação de DES, sendo que a maioria apresenta-se em estado líquido na faixa de temperatura de 25 a 70 °C (ZHANG *et al.*, 2012).

FIGURA 3 - ESQUEMA DE DIAGRAMA DE FASE SÓLIDO LÍQUIDO PARA UMA MISTURA EUTÉTICA BINÁRIA.



FONTE: A autora (2018)

Esses solventes apresentam vantagens em relação a outros solventes verdes, como os líquidos iônicos, devido a facilidade de preparo com alto grau de pureza além do baixo custo (DAI *et al.*, 2013). Os DES podem ser formados a partir de misturas de sais quaternários de amônio como cloreto de colina e ácidos carboxílicos, álcoois, ureia e açúcar ou ácidos orgânicos (ABBOTT *et al.*, 2004, GORE; BASKARAN; KOENIG, 2011; GORKE; SRIENC; KAZLAUSKAS, 2008; IMPERATO *et al.*, 2005).

Outra vantagem dos DES é a sua baixa pressão de vapor e alta estabilidade térmica, o que lhes garantem uma ampla faixa de temperatura de trabalho (DAI; VERPOORTE; CHOI, 2014, FRANCISCO; VAN DEN BRUINHORST; KROON, 2013; JEONG *et al.*, 2015, YANG *et al.*, 2013).

Segundo Smith, Abbott e Ryder (2014) os DES são uma alternativa viável à tecnologias já existentes e vêm sendo aplicados na síntese de flavonoides (HAWKINS; HANDY, 2013); extração de saponina (JEONG *et al.*, 2015); extração de gálio (FOREMAN *et al.*, 2018); além de purificação de biodiesel e purificação e concentração

de biomoléculas como compostos fenólicos e proteínas (GARCÍA *et al.*, 2016, MONDAL *et al.*, 2015, SMITH; ABBOTT; RYDER, 2014, ZHANG *et al.*, 2012).

Segundo Francisco e colaboradores (2013) as propriedades dos DES são influenciadas pelas razões molares dos compostos na mistura. Uma característica marcante dos DES é sua elevada viscosidade em temperatura ambiente para algumas misturas eutéticas. Nesses casos, um aumento significativo na temperatura ou a adição de água em proporções corretas nos solventes reduzem a viscosidade, aumentando a taxa de transferência de massa e conseqüentemente a eficiência na extração de biomoléculas (BI; TIAN; ROW, 2013, FRANCISCO; VAN DEN BRUINHORST; KROON, 2013, GARCÍA *et al.*, 2015). Essa redução na viscosidade ocorre pelo enfraquecimento das ligações de hidrogênio quando é adicionado água ao sistema. Segundo Dai, Verpoorte e Choi (2014) quando a concentração de água atinge cerca de 25% (base mássica), essas interações podem ser totalmente rompidas, descaracterizando completamente os DES.

De acordo com Martins *et al.* (2018) a classificação dos DES como solventes verdes, de baixo custo e de simples obtenção dependem diretamente dos componentes que os constituem, assim como as suas características e propriedades físico químicas. Os autores afirmam ainda que a sua definição não pode ser generalizada uma vez que não formam um novo composto e sim uma mistura (MARTINS; PINHO; COUTINHO, 2018, ZHANG *et al.*, 2012).

2.1.2 Solventes eutéticos profundos: Aplicações na extração, separação e purificação de biomoléculas

O uso de DES como formador de SDFA é uma aplicação recente e foi apresentado pela primeira vez por Zeng e colaboradores (2014), os quais justificaram o trabalho em razão dos DES apresentarem similaridade com os líquidos iônicos, além de serem de fácil obtenção e baixo custo. Avaliaram o potencial dos sistemas na extração de proteínas (BSA, ovoalbumina e Tripsina), e obtiveram, em um sistema formado por DES (Cloreto de colina: Ureia) + K_2HPO_4 e água, quase a total partição (99,49 %) da BSA, demonstrando o potencial do uso dessa técnica (ZENG *et al.*, 2014). Desde então alguns outros estudos vêm sendo desenvolvidos, principalmente com foco na partição de proteínas.

Xu *et al.* (2015) utilizaram DES a base de cloreto de colina e álcoois aplicado em SDFA para extração de BSA e tripsina e verificaram que a concentração de DES, sal,

massa de biomolécula, tempo de agitação, temperatura e pH influenciam diretamente no processo de separação. Segundo estes autores esses sistemas não apresentam boa seletividade para a BSA, por se tratar de álcoois, no entanto obtiveram uma alta eficiência de extração sendo 98,16 e 94,36% para BSA e Tripsina respectivamente. Os autores realizaram ensaios de dicroísmo circular e verificaram que o processo não alterou a estrutura conformacional da biomolécula após ser extraído preferencialmente pela fase rica em DES (XU *et al.*, 2015).

O uso de cloreto de tetrametilamonio como receptor de hidrogênio e doadores de hidrogênio com características de álcool e açúcar foram utilizados para avaliar a extração da BSA e da Lisozima. Os pesquisadores obtiveram valores de EE% de até 98,95% de BSA em sistemas formados por glicerol e ureia. Através de análises qualitativas de FTIR e DC, concluíram que as proteínas submetidas a extração na presença do S DFA não sofreram processo de desnaturação (ZHANG *et al.*, 2016).

Zhang e colaboradores (2017) avaliaram 16 solventes eutéticos profundos formados por polietilenoglicol (PEG) e diferentes sais quaternários de amônio, os quais foram aplicados a sistemas de duas fases aquosas para extração de RNA. Observaram que a eficiência de extração foi nitidamente maior (90,78%) em razões molares com menor concentração de PEG, PEG de menor peso molecular, sais quaternários de amônio de maior cadeia carbônica e com sais inorgânicos menos hidrofílicos como o Na_2CO_3 , além de verificarem que a interação eletrostática é a principal força para separação do RNA (ZHANG *et al.*, 2017). Os trabalhos de LI *et al.* (2016); XU *et al.* (2015) e ZHANG *et al.* (2016) apresentaram resultados que demonstram elevada eficiência na extração de proteínas.

Pang e colaboradores (2017) avaliaram a obtenção de DES com cloreto de colina e o polímero PEG aplicados em S DFA. Os sistemas foram aplicados em processos de separação, resultando em alta eficiência de extração das proteínas BSA e papaína. Os pesquisadores constataram que, nos S DFA estudados as proteínas não sofreram alteração conformacional, mantendo suas características funcionais (PANG *et al.*, 2017).

Os estudos apresentados sugerem que a formação de fase nos sistemas compostos por solventes eutéticos profundos e sal está relacionada com a afinidade do DES com a água, ou seja, quanto menor essa afinidade, menor a concentração de sal necessária para formação de duas fases. Os trabalhos indicam também que nesses sistemas ocorre uma competição entre o DES e o sal pela água do sistema, onde o sal, por possuir uma maior afinidade pela água, acaba por expulsar (efeito *salting out*) as moléculas de DES, o que

resulta na formação de uma fase rica em DES, normalmente a fase de topo, e outra fase rica em sal (fase de fundo).

2.2 SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS

Os processos de extração e purificação de biomoléculas são por vezes considerados onerosos e com etapas complexas que resultam em perdas na recuperação dos produtos biológicos. Com isso, surge o interesse em técnicas industriais mais simples e economicamente viáveis, como o uso dos sistemas de duas fases aquosas (MARTÍNEZ-ARAGÓN *et al.*, 2009).

Os primeiros relatos de sistemas de duas fases aquosas encontrados na literatura são de 1956, quando Per-Ake Albertsson evidenciou que a combinação de polietileno glicol, fosfato de potássio e água, e polietileno glicol, dextrana e água resultavam na formação de sistemas de duas fases aquosas (SDFA), e verificaram o seu potencial uso na extração de proteínas (ALBERTSSON, 1958). Desde então, os SDFA são aplicados em uma ampla gama de processos de separação e extração de biomoléculas e tem sido alvo de pesquisadores que tem buscado estudos de diferentes compostos formadores e aplicabilidades para esses sistemas (DONG; WAN; CAO, 2018; SVENSSON *et al.*, 1985; WANG *et al.*, 2017; XU *et al.*, 2015).

Há vários tipos de SDFA com base na natureza química dos seus dois constituintes principais. Os sistemas de duas fases aquosas são geralmente formados por soluções aquosas de dois polímeros, dois sais ou ainda um polímero e um sal e são descritos como um sistema de duas fases líquidas, ricas em água e imiscíveis, as quais coexistem entre si (DA SILVA; LOH, 2000).

O mecanismo de formação do SDFA pode ser elucidado com base na entalpia de hidratação dos componentes e o saldo líquido da entropia do sistema. Embora os dois componentes principais sejam hidrofílicos, estes se diferem na entalpia de hidratação. Com isso podemos observar dois casos termodinâmicos; quando a quantidade de energia do sistema é suficientemente alta para superar a diferença entre a entalpia e a entropia de hidratação, os dois componentes podem coexistir em sua concentração total em uma única fase homogênea. Caso contrário, a separação dos componentes torna-se energeticamente favorável, possibilitando a formação das duas fases (BENAVIDES; RITO-PALOMARES; ASENJO, 2011).

A separação das fases nos SDFA é resultante da capacidade de cada componente em formar complexos de hidratação com a água existente no sistema. Esse fenômeno pode ser influenciado por parâmetros como pH, temperatura do sistema, concentração, tipo e massa molar dos componentes formadores (ROGERS *et al.*, 1996).

A escolha dos sais que compõe o sistema segue a escala de Hofmeister, a qual está diretamente ligada a eficácia de separação das fases (HOFMEISTER, 1888; HUDDLESTON; WILLAUER; ROGERS, 2003; ZASLAVSKY, 1995). A série de Hofmeister, descrita na FIGURA 4 foi citada pela primeira vez 1888 para classificar os íons em cosmotrópicos e caotrópicos, ou seja, quanto a sua capacidade em estabilizar e desestabilizar moléculas como proteínas, e está classificada por ordem de efetividade em causar *salting-out* (ANANTHAPADMANABHAN; GODDARD, 1987).

O efeito de *salting-out* pode ser definido como a diminuição da solubilidade e consequente precipitação das proteínas em soluções com elevadas concentrações do sal (HOFMEISTER, 1888). Desta forma, o uso de sais de maior efeito cosmotrópico resulta em maior *salting-out*, e a aplicação da série de *Hofmeister* nos sistemas de duas fases aquosas é de grande importância na escolha do sal a ser utilizado (CACACE; LANDAU; RAMSDEN, 1997; HATTI-KAUL, 2001; HUDDLESTON *et al.*, 1991; LO NOSTRO; NINHAM, 2012).

FIGURA 4 - SÉRIE DE HOFMEISTER

SÉRIE DE HOFMEISTER									
	Efeito Cosmotrópico	Estabilizante (<i>Salting-out</i>)			Desestabilizante (<i>Salting-in</i>)			Efeito Caotrópico	
	←-----→								
Ânions	F ⁻	PO ₄ ³⁻	SO ₄ ²⁻	CH ₃ COO ⁻	Cl ⁻	Br ⁻	I ⁻	CNS ⁻	
Cátions	(CH ₃) ₄ N ⁺	(CH ₃) ₂ NH ²⁺	NH ₄ ⁺	K ⁺	Na ⁺	Cs ⁺	Li ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺
									Ba ²⁺

FONTE: Adaptado de Cacace, Landau e Ramsden (1997).

Os SDFA formados por polímero-sal têm sido os mais estudados e aplicados. Entretanto, com intuito de superar a alta viscosidade das fases, característica marcante desses sistemas, e a tendência de formação de emulsões, pesquisadores têm procurado avaliar alternativas para substituição dos polímeros, tais como: solventes orgânicos (LU *et al.*, 2013; SANGLARD *et al.*, 2018) e líquidos iônicos (FREIRE *et al.*, 2012; QUENTAL *et al.*, 2015). Entretanto, o elevado custo de produção dos líquidos iônico e baixa biocompatibilidade dos solventes orgânicos são aspectos que ainda limitam a suas aplicações (BENAVIDES; RITO-PALOMARES; ASENJO, 2011; FREIRE *et al.*, 2012).

Visando amenizar essas desvantagens, pesquisas com uso de solventes eutéticos profundos (DES) aplicados em sistemas de duas fases aquosas vêm sendo realizadas nos últimos anos (WANG *et al.*, 2017; XU *et al.*, 2015; ZENG *et al.*, 2014; ZHANG; WANG, 2017). Esses sistemas apresentam vantagens em relação as técnicas de separação convencionais, como baixo custo, atoxicidade, rápida transferência de massa, alta seletividade, e alta biocompatibilidade. Tais características facilitam a produção em escala industrial além da aumentar eficiência de separação de moléculas de interesse (ASENJO; ANDREWS, 2011; GRILO; AIRES-BARROS; AZEVEDO, 2016; YUZUGULLU; DUMAN, 2015; ZENG *et al.*, 2014). A partição das moléculas em SDFA é dependente das suas propriedades e das características das fases do sistema, sendo regida principalmente por interações soluto-solvente do tipo: Van der Waals, ligações de hidrogênio e forças eletrostáticas. Além disso, as moléculas podem sofrer influência dos efeitos estéricos e conformacionais das moléculas, afetando também a sua partição em SDFA (FREIRE *et al.*, 2012).

2.2.1 Comportamento de fases dos SDFA

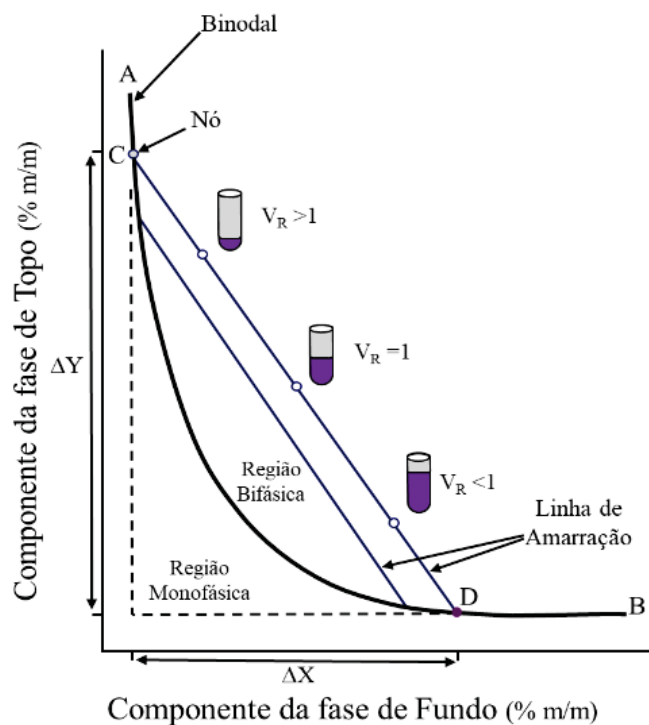
Para a utilização dos SDFA é importante conhecer o comportamento das fases que compõem o sistema. Para isso a obtenção dos dados de equilíbrio se torna essencial. O diagrama de fases delimita a área de trabalho potencial para um sistema bifásico, e é uma característica individual de cada sistema em condições como pH, temperatura e concentração de sal pré-determinadas. Através do diagrama de fases, dados importantes como a concentração necessária dos componentes formadores de fase para obter um sistema com duas fases em equilíbrio e a concentração subsequente de componentes em cada uma das fases podem ser facilmente determinadas (BENAVIDES; RITO-PALOMARES; ASENJO, 2011; HATTI-KAUL, 2001).

Inclusa no diagrama está uma curva denominada binodal, a qual divide uma região de concentração de componentes que formarão duas fases aquosas imiscíveis, ou seja, aquelas acima da curva, daquelas que formarão um sistema monofásico, ou seja, abaixo da curva, como demonstrado na FIGURA 5 (HATTI-KAUL, 2001).

Todas as coordenadas para a formação de potenciais sistemas, estarão descritas em uma linha de amarração (TL, do inglês, *tie-line*). As TL's são linhas que unem dois nós que compõe a binodal os quais representam a concentração final dos componentes nas fases superior e inferior do sistema. O deslocamento ao longo das coordenadas da

linha de amarração remete a sistemas com diferentes composições totais e proporções em volume (V_R), no entanto, com a mesma concentração final de componentes de fase nas fases superior e inferior (DA SILVA; LOH, 2000; HATTI-KAUL, 2001; ZASLAVSKY, 1995).

FIGURA 5 - DIAGRAMA DE FASES DE UMA MISTURA A+B+H₂O



FONTE: Adaptado de HATTI-KAUL, 2001.

2.2.2 Sistemas de duas fases aquosas formados por solventes eutéticos profundos

Como citado no item 2.1.1. a literatura reporta alguns estudos aplicando o DES para a formação de sistemas de duas fases aquosas na extração de biomoléculas. No entanto, Passos e colaboradores (2016) verificaram que a estequiometria inicial entre as moléculas receptora e doadora de hidrogênio que formam o DES não se mantém nas fases do sistema. Segundo os autores, SDFA-DES são na verdade sistemas quaternários, característica essa que não afeta a sua aplicabilidade nos processos de extração, mas aumenta a complexidade do comportamento das fases do sistema (PASSOS *et al.*, 2016).

Farias *et al.* (2017) avaliaram a influência de diferentes açúcares como moléculas doadoras de hidrogênio em diferentes razões molares na formação de fases e a sua estabilidade no sistema aquoso, e verificaram que a formação ocorre predominantemente

pela presença da molécula receptora de hidrogênio (cloreto de colina). A partição de ácido gálico foi realizada para verificar a influência dos açúcares nesse caso, e foi observado diferença na partição entre os sistemas com diferentes tipos de moléculas (FARIAS *et al.*, 2017).

Com base nesses dados, neste trabalho optou-se por avaliar SDFa-DES compostos por doadores de hidrogênio para a formação dos DES e em diferentes razões molares a fim de verificar a influência desses na partição de proteínas com diferentes massas molares, resíduos de aminoácidos e características estruturais.

2.3 PROTEÍNAS

As proteínas são definidas como polímeros de alto peso molecular e são formadas por uma sequência mínima de 20 aminoácidos, ligados entre si por ligações peptídicas. As propriedades e funções de uma proteína são determinadas pelo número e espécie dos resíduos de aminoácidos, bem como pela sequência desses compostos na molécula. As proteínas podem apresentar quatro níveis estruturais: primária, secundária, terciária e quaternária. A estrutura primária das proteínas é formada pela sequência linear dos aminoácidos unidos por ligações peptídicas. Na estrutura secundária as cadeias lineares se enrolam em uma configuração regular formando as estruturas α -hélices, folhas β e voltas. A estrutura terciária corresponde a um segundo nível de enovelamento, que decorre da atração entre diferentes partes da molécula já enrolada, agora arranjadas tridimensionalmente. Por fim, na estrutura quaternária duas ou mais cadeias polipeptídicas enoveladas (estrutura terciária) se associam por interações não covalentes, conduzindo à formação específica de uma proteína (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Há vários métodos de extração e purificação de proteínas descritos na literatura, os quais devem ser o mais simples possível para garantir a reprodutibilidade dos resultados e minimizar as possibilidades de alteração na estrutura da proteína. Os métodos usualmente aplicados são: i) extração alcalina, seguida de precipitação e neutralização (CAPOBIANGO *et al.*, 2006); ii) Agitação em água ou solução tampão (SOUZA; SOBRAL; MENEGALLI, 2004); iii) maceração em água ou solução tampão; iv) sonicação; v) precipitação com solventes orgânicos (ex. ácido tricloroacético/acetona) (CARREIRA *et al.*, 2003); vi) extração líquido-líquido com solventes orgânicos

(SIMONET; GARNIER; DOUBLIER, 2000); vii) precipitação com sulfato de amônio (ALBERTSSON, 1986); viii) eletroforese (HAJDUCH *et al.*, 2001); ix) cromatografia de troca iônica (UNSAI *et al.*, 2006); x) cromatografia de afinidade (WOLSCHIN; WIENKOOP; WECKWERTH, 2005). Entretanto, esses métodos além de demorados, podem causar danos irreversíveis às proteínas, exigindo o estudo de técnicas alternativas (ZENG *et al.*, 2014).

As proteínas são muito sensíveis a pequenas alterações devido, principalmente, à sua complexidade química e estrutural. A desnaturação proteica é um fenômeno definido como qualquer alteração na estrutura secundária, terciária ou quaternária que não envolva ruptura de ligações covalentes em geral, ou seja, que não altere a estrutura primária. A desnaturação ocorre por meio da ação de um agente desnaturante como pH, temperatura, pressão, força iônica, solventes orgânicos e outros. A conformação após a desnaturação pode ser uma estrutura total ou parcialmente desdobrada e desordenada (HARANO; KINOSHITA, 2006; HERBERHOLD; ROYER; WINTER, 2004; VAJPAI *et al.*, 2013).

2.3.1 Estabilidade Proteica

As proteínas podem sofrer processos de quebra das estruturas secundárias e terciárias. Essa quebra pode ocorrer quando as proteínas são submetidas a agitação, aquecimento, radiações, pH ou também por agentes químicos, como solventes, compostos orgânicos, metais pesados e outros. Esses processos podem causar mudanças nas propriedades físico-químicas, funcionais e fisiológicas das proteínas, sem afetar a sequência de aminoácidos da estrutura. Tais alterações podem causar transformações como o decréscimo da solubilidade em água e dificuldade de cristalização das proteínas (QUIROGA, 2014).

Proteínas que apresentam função enzimática podem ser inativadas quando são submetidas a ação desses agentes. A ampla possibilidade de desnaturação das proteínas, uma vez que vários parâmetros podem causar esse fenômeno, torna o estudo com proteínas mais complexo (QUIROGA, 2014).

Algumas análises são utilizadas para identificação de alteração na estrutura proteica. Entre elas, a espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), é utilizada para verificar estrutura secundária de proteínas, onde qualquer alteração muda a energia vibracional da molécula. Ao contrário de outros espectros de absorção, essa técnica incide um feixe de luz composto, com vários comprimentos de

onda. Após a medição da absorbância, o feixe de luz é modificado, com uma combinação de comprimentos de onda diferente do feixe anterior, dando origem a um segundo conjunto de dados. Este processo é repetido várias vezes e então os interferogramas obtidos passam pelo processo matemático conhecido como Transformadas de Fourier, o qual os convertem a um espectro de absorção óptica infravermelha de intensidade de absorção em função do comprimento de onda (FORATO *et al.*, 2012; SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002; SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1981).

A Cristalografia por difração de raio-x é, basicamente uma fonte de luz que emitirá a radiação raio-x e interagirá com a molécula de interesse a nível quântico, ocorrendo a excitação de elétrons em átomos através da absorção, emissão e espalhamento. Essa interação é detectada e a informação é interpretada matematicamente. Os comprimentos de onda de raios X utilizados para a determinação da estrutura de proteínas são normalmente da ordem de 1 Å (10^{-10} m). Nas energias correspondentes (~12 keV), praticamente 99% da radiação atravessa a amostra sem interagir com os átomos. Apenas uma fração mínima (< 1 %) dos fótons que de fato interagem com a amostra serão espalhados elasticamente pelos átomos desta, carregando assim informações estruturais úteis (AMBROSIO; FRANCHINI, 2017).

Ainda há as técnicas de Ressonância magnética nuclear (RMN) e Dicroísmo Circular (DC). A RMN avalia a estrutura terciária (^1H e ^{13}C) e explora a propriedade fundamental da proteína (spin), na qual o núcleo absorve a radiação eletromagnética de uma frequência específica na presença de um forte campo magnético. Além de ser uma técnica muito eficiente para avaliar interações entre proteína-ligante (LAMBERT; MAZZOLA, 2003). O DC é uma técnica que detecta qualquer alteração na estrutura através da medida de absorção da luz circularmente polarizada a direita e à esquerda. Por meio de um espectro é possível detectar a formação de picos máximos e mínimos em comprimentos de onda específicos, os quais são comparados aos espectros das proteínas nativas. Por meio do DC também é possível realizar a quantificação do teor da estrutura secundária da proteína, ou seja, a porcentagem de estruturas α -hélice, β -folha, β -volta e randômicas (LEHNINGER, 2006; MURAKAMI; RULLER, 2016).

2.4 PROTEÍNAS MODELOS EMPREGADAS NO TRABALHO

Na TABELA 1 estão descritas algumas características das proteínas utilizadas nessa pesquisa.

TABELA 1 - PROTEÍNAS EM ESTUDO, MASSA MOLECULAR (KDa), SOLUBILIDADE EM ÁGUA (mg.cm^{-3}), PONTO ISOELÉTRICO, NÚMERO DE RESÍDUOS E PRINCIPAIS AMINOÁCIDOS.

	MM (KDa)	Solubilidade em água (mg.cm^{-3})	PI	Número de resíduos	Principais aminoácidos	Estrutura
BSA	66,5	40	4,7	583	Triptofano Tirosina	Globular
Lisozima	14,0	100	11,35	129	Cisteína	Globular Compactada
Colágeno hidrolizado	3,0	100	–	120*	Prolina Glicina	Fibrosa

*valor médio de resíduos de aminoácidos em colágeno hidrolizado.

Fonte: WALRAND *et al.*, 2008; Protein Data Bank (2018).

Albumina de Soro Bovino (BSA)

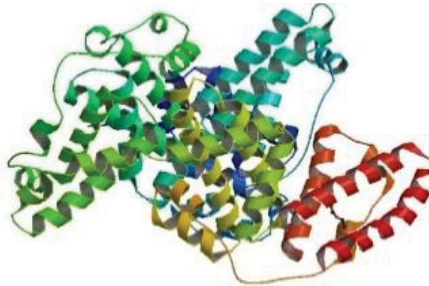
A Albumina de soro bovino (BSA) é uma das proteínas mais abundantes no plasma bovino, sendo encontrado diversos trabalhos dedicados à sua estrutura e propriedades. Por essa razão é tida como uma proteína modelo para diversos estudos.

A BSA é uma proteína globular (FIGURA 6) de alto peso molecular (66 KDa), composta por cerca de 583 resíduos de aminoácidos, principalmente, aminoácidos essenciais. Formada principalmente por triptofano, tirosina e fenilalanina. Possui 17 (dezessete) ligações dissulfídicas intramoleculares e um grupo tiol livre no resíduo de número 34 (ANTUNES, 2003; GRAF; LIPPARD, 2012; TIEKINK, 2005; BENI; BENCINI, 2012; MOREIRA *et al.*, 2014).

Os principais estudos que abordam esta proteína têm como um dos objetivos o entendimento de como essa proteína afeta a funcionalidade dos alimentos. A BSA apresenta afinidade por ácidos graxos livres e outros lipídeos favorecendo seu transporte na corrente sanguínea. Por essa razão têm papel importante em atividades fisiológicas e funcionais (KRISSANSSEN, 2007).

A palavra albumina é usada para descrever uma proteína ou grupo de proteínas, a qual possui como principal característica a sua solubilidade em água. Estudos de cristalografia de raio-x indicaram que a estrutura secundária da albumina de soro bovino possui aproximadamente 55 % da estrutura na forma de α -hélice (MCKEON, 2010).

FIGURA 6 - ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA ALBUMINA DE SORO BOVINO.



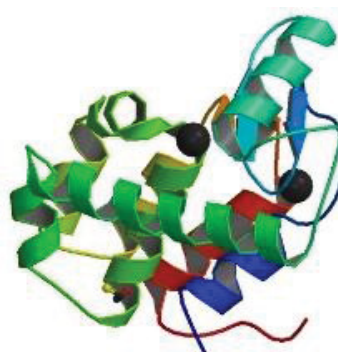
FONTE: Protein Data Bank, (2018).

Lisozima

A lisozima pode ser encontrada na lágrima, clara de ovo e algumas outras secreções. Foi descoberta por Alexander Fleming em 1922 durante a realização de pesquisas com o intuito de descobrir novos antibióticos. É uma proteína globular, compactamente enrolada com a maioria de seus grupos R hidrofóbicos voltados para o interior da macromolécula. A maioria dos seus grupos hidrofílicos voltados para a superfície de contato com o meio exterior (QASBA; KUMAR, 1997). Com este arranjo, a Lisozima apresenta alta solubilidade em solução aquosa a 20 °C. A FIGURA 7 representa a estrutura tridimensional da lisozima.

A lisozima é responsável pela clivagem hidrolítica de polissacarídeos complexos encontrados na parede celular de algumas bactérias, podendo, desta forma, atuar como agente bactericida (FLEMING, 1945).

FIGURA 7 - ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA PROTEÍNA LISOZIMA



FONTE: Protein Data Bank, (2018).

A estrutura primária da lisozima é formada por uma cadeia peptídica de 129 aminoácidos. Sua estrutura tridimensional globular de 26 x 45 Å é bem menor

comparativamente ao tamanho da proteína BSA. Cerca de 40 % dos seus 129 resíduos de aminoácidos estão em segmentos na forma de α -hélice (QASBA; KUMAR, 1997).

Colágeno Hidrolisado

O colágeno é uma proteína de origem animal, encontrado nos tecidos conjuntivos, como cartilagens, pele, músculos e outros, e tem a função de contribuir com a integridade estrutural destes tecidos. Com o avançar da idade, a suplementação de colágeno passa a ser necessária, o que explica o aumento dos estudos e consequente aplicação industrial desta proteína em produtos e suplementos alimentares (SILVA; PENNA, 2012).

O colágeno natural pode ser obtido de diversas espécies animais; bovinos, suínos, peixes e outros. O colágeno é uma proteína insolúvel em água e deve passar por pré-tratamento químico para remoção de gordura e cálcio, bem como causar a hidrólise das ligações não covalentes. Somente após isso, o colágeno pode ser submetido ao processo de aquecimento em água. O material resultante é seco e pode ser submetido a reação de hidrólise que leva a geração do colágeno hidrolisado (GÓMEZ-GUILLÉN *et al.*, 2011; NICOLETI; TELIS, 2009; WOLF; SOBRAL; TELIS, 2009).

O colágeno hidrolisado é um peptídeo de colágeno do tipo 1 obtido por um processo enzimático rigorosamente controlado para obtenção de um grau preciso de hidrólise, obtenção de um peso molecular ideal e com as melhores propriedades organolépticas. É um produto natural com alto grau de pureza e com teor de proteína superior a 97%. O colágeno hidrolisado é uma proteína natural que não altera o sabor e o odor do produto acabado, mesmo quando utilizado em altas concentrações. Suas principais características, além do fácil manuseio, são: caráter homogêneo, alta capacidade de absorção, dispersão rápida, altas solubilidades a frio e em solução salinas aquosas, resistente a variações de temperatura e pH (SILVA; PENNA, 2012).

Uma das características mais importantes do colágeno hidrolisado é a composição de aminoácidos, com alto teor de glicina e prolina, aminoácidos essenciais responsáveis pela estabilidade e regeneração de cartilagens (WALRAND *et al.*, 2008; GÓMEZ-GUILLÉN *et al.*, 2011).

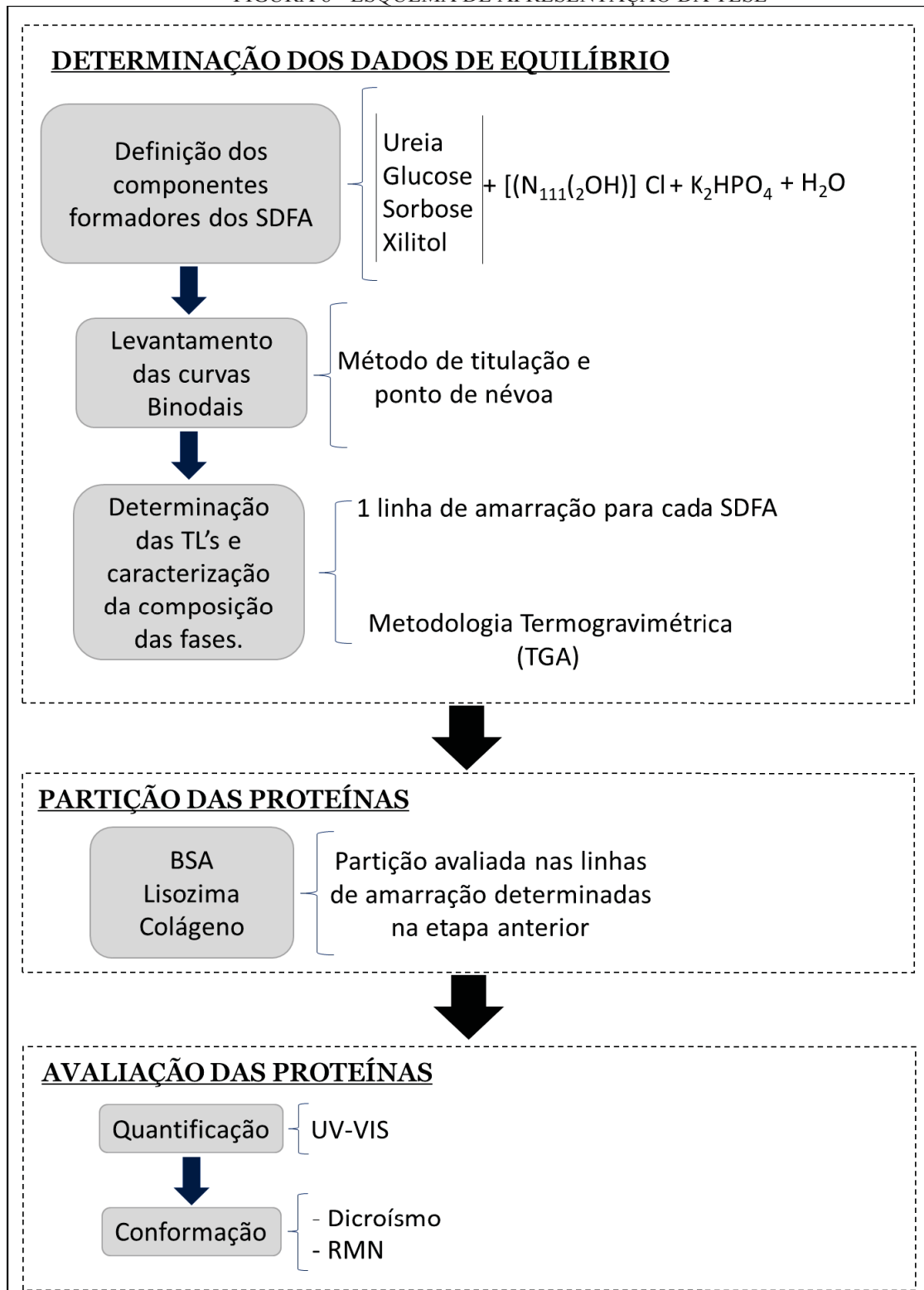
Foram selecionadas três proteínas com diferentes massas moleculares, onde a BSA é que apresenta maior valor de massa molecular. Cada uma das três apresentam diferentes aminoácidos principais, ou seja, em maior concentração na estrutura. A cadeia polipeptídica da lisozima é formada por quatro pares de cisteína, aminoácido hidrofóbico

(SIMÕES; BEIRA; MALCATA, 2006), enquanto a BSA é formada principalmente por 20 grupos de tirosina e dois fragmentos de Triptofano (MOREIRA *et al.*, 2014). A tirosina é um aminoácido hidrofílico, característica essa que torna a BSA menos hidrofóbica que a lisozima. O colágeno hidrolisado apresenta o seu índice de hidrofobicidade de acordo com a cadeia polipeptídica obtida após a hidrólise. Nesse estudo, o colágeno hidrolisado utilizado apresenta altos teores do aminoácido prolina que é altamente hidrofílico, conferindo essa característica a proteína. Desta forma temos em termos de hidrofobicidade: Lisozima > BSA > Colágeno hidrolisado.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A FIGURA 8 apresenta a estratégia de ação utilizada neste trabalho.

FIGURA 8 - ESQUEMA DE APRESENTAÇÃO DA TESE



FONTE: A autora (2019).

3.1 DETERMINAÇÃO DOS DADOS DE EQUILÍBRIO LÍQUIDO-LÍQUIDO

3.1.1 Determinação dos componentes dos sistemas

Neste estudo foi avaliado a formação de sistemas de duas fases aquosas baseados em solventes eutéticos profundos.

Como já é sabido, para a formação de um DES é necessário a presença de uma molécula doadora de hidrogênio e outra receptora de hidrogênio. Com base em estudos realizados no grupo por FARIAS *et al.* (2017) que avaliaram o uso dos açúcares glucose, frutose e sacarose, optou-se por empregar os açúcares como moléculas doadoras de hidrogênio. A glucose é um monossacarídeo com grupo funcional aldeído (CHO) ligado a cadeia carbônica, e foi selecionada por ter sido utilizada em vários estudos para a formação de SDFAs. A sorbose também é um monossacarídeo, porém pertencente a classe das cetoses. É um açúcar obtido a partir da fermentação do sorbitol, e por isso apresenta um grupamento carbonila $-C(=O)-$ ligado a dois radicais orgânicos. O xilitol é um açúcar álcool, pertencente a classe especial dos monossacarídicos. Possui uma estrutura aberta com cinco (5) grupos hidroxila (OH), cada um deles ligado a um (1) átomo de carbono, característica essa que o leva ser classificado também como um poliál e por isso apresenta grande afinidade por água. Por não apresentar grupos aldeídos e nem cetônicos em sua estrutura, o xilitol não participa de reações com aminoácidos, e com isso não afeta o valor nutricional das proteínas. Esse composto foi escolhido para avaliar a influência das hidroxilas na estrutura do doador de hidrogênio na partição das proteínas.

A glucose, a sorbose e o xilitol são compostos amplamente utilizados em matrizes e na alimentação, o que torna seus usos admissíveis, uma vez que não precisam ser totalmente retirados das matrizes alimentares por não serem considerados tóxicos ou impróprios para aplicação direta.

Além dos açúcares, a ureia também foi utilizada para a formação dos DES. Isso se deve o seu amplo emprego na formação dos DES e em sistemas de duas fases aquosas (ABBOTT *et al.*, 2003; LERON, 2012; YADAV; PANDEV, 2014; ASHWORTH, 2016). A ureia também é utilizada em aplicações, tais como: reações de biotransformação (GORKE; SRIENC; KAZLAUSKAS, 2008); síntese de flavonoides (HAWKINS; HANDY, 2013); reações de Diels-Alder (IMPERATO *et al.*, 2005); extração de compostos fenólicos (GARCIA *et al.*, 2016); extração e particionamento de proteínas (ZENG *et al.*, 2014). Portanto, neste trabalho, o DES constituído de ureia foi utilizado

por apresentar na literatura resultados de partição de proteínas, e com isso permitir a comparação em relação e eficiência na partição das proteínas nos sistemas desenvolvidos.

O cloreto de colina ($[N_{111}(2OH)]Cl$) foi utilizado como molécula receptora de hidrogênio por ser um dos sais quaternários de amônio mais utilizado na síntese de DES e SDFA, e apresentar capacidade de formar complexo com diferentes moléculas doadoras de hidrogênio. Esse sal pode ser extraído de biomassas ou sintetizado por meio de reservas fósseis, sendo considerado de baixo custo, biodegradável e não tóxico (ABBOTT *et al.*, 2003; RADOŠEVIĆ *et al.*, 2015).

O fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) usado na formação dos sistemas de duas fases aquosas foi escolhido devido a capacidade de causar *salting-out* de acordo com a série de *Hofmeister* (HOFMEISTER, 1888) e a sua alta solubilidade em água (aproximadamente 1600 g.L^{-1}) e capacidade em formar fase com o ($[N_{111}(2OH)]Cl$).

O nome, fórmula química, massa molecular, fornecedor, CAS e pureza desses compostos estão compilados e apresentados na TABELA 2.

TABELA 2 - NOME, CAS, MASSA MOLECULAR, PUREZA E FÓRMULA QUÍMICA DOS REAGENTES UTILIZADOS NO DESENVOLVIMENTO DOS SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS E SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS.

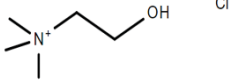
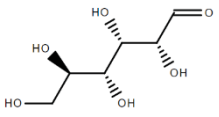
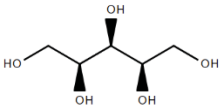
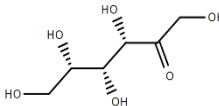
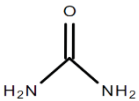
Nome Químico	Fórmula Química	Massa Molecular	Fornecedor	CAS	Pureza
Fosfato de Potássio dibásico	K_2HPO_4	174,18	Alphatec	7758-11-4	$\geq 0,9800$
Cloreto de Colina	$[N_{111}(2OH)]Cl$	139,62	Merck Millipore	67-48-1	$\geq 0,9800$
Ureia Cristal	CH_4N_2O	60,06	Panreac	57-13-6	$\geq 0,9995$
Glucose Anidra	$C_6H_{12}O_6$	180,16	Biotec	921-60-8	$\geq 0,9995$
Xilitol	$C_5H_{12}O_5$	152,15	Sigma-Aldrich	87-99-0	$\geq 0,9995$
Sorbose	$C_6H_{12}O_6$	180,16	Sigma-Aldrich	87-79-6	$\geq 0,9800$
Água	H_2O	18,02	-	-	-

FONTE: A autora (2019)

3.1.2 Preparo dos solventes eutéticos profundos

Neste estudo foram sintetizados quatro DES em três (3) diferentes razões molares de doador e receptor de hidrogênio conforme descrito na TABELA 3.

TABELA 3 - ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO DOS DES ESTUDADOS

Receptor de hidrogênio	Doadores de Hidrogênio	RH:DH(razão molar)	Codificação
 Cloreto de Colina PF 302 °C	 Glucose Anidra PF 146 °C	2:1	G.1
		1:1	G.2
		1:2	G.3
	 Xilitol PF 96 °C	2:1	X.1
		1:1	X.2
		1:2	X.3
	 Sorbose PF 160 °C	2:1	S.1
		1:1	S.2
		1:2	S.3
	 Ureia PF 133 °C	2:1	U.1
		1:1	U.2
		1:2	U.3

FONTE: ChemSpider (2019)

As razões molares 2:1; 1:1 e 1:2 foram escolhidas por serem as mais utilizadas nos trabalhos encontrados na literatura.

O preparo dos DES foi realizado como uma etapa prévia a obtenção dos diagramas de fases dos SDFAs, de forma a simplificar a obtenção das curvas binodais. Para isso, foi empregado a metodologia de aquecimento brando com agitação (FARIAS *et al.*, 2017), na qual os compostos formadores (doador e receptor de hidrogênio) são pesados em balança analítica (AL204-Meter Toledo) e acondicionados em Erlenmeyer, nas devidas razões molares. Os frascos eram então mantidos em um banho maria com agitação orbital (Dubnoff) na temperatura de pelo menos 60 °C até que se observasse a formação de um líquido homogêneo (DAI *et al.*, 2013; FARIAS *et al.*, 2017). Como o intuito do estudo não foi avaliar as características dos solventes eutéticos profundos, foi adicionado 25% (m/m) de água em cada um deles para acelerar o processo de formação do DES e diminuir sua viscosidade, facilitando o uso nas próximas etapas.

3.1.3 Levantamento das curvas binodais

Foram avaliados quatro sistemas, e cada um deles nas três razões molares de DES, como descrito na TABELA 4. Ressaltando que, como foi adicionado 25% (m/m) de água no DES, essa foi contabilizada para obtenção dos dados de equilíbrio.

TABELA 4 - SISTEMAS AVALIADOS E AS RESPECTIVAS RAZÕES DOS DES UTILIZADOS.

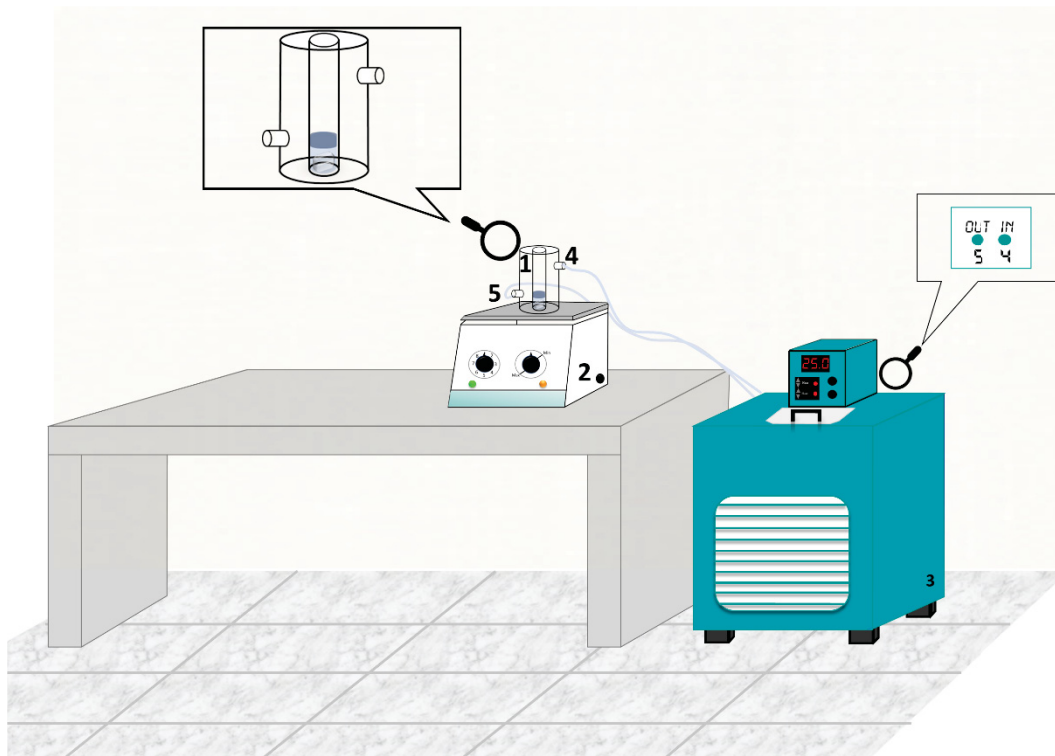
Sistemas	Razão molar (RH:DH)
[(N ₁₁₁ (2OH)] Cl: Ureia) + K ₂ HPO ₄ + H ₂ O	
[(N ₁₁₁ (2OH)] Cl: Glucose) + K ₂ HPO ₄ + H ₂ O	2:1/ 1:1/ 1:2
[(N ₁₁₁ (2OH)] Cl: Xilitol) + K ₂ HPO ₄ + H ₂ O	
[(N ₁₁₁ (2OH)] Cl: Sorbose) + K ₂ HPO ₄ + H ₂ O	

FONTE: A autora (2018)

As curvas binodais foram obtidas pelo método padrão de titulação e ponto de névoa (KAUL, 2000) a 25±0,5 °C e pressão atmosférica (~91 kPa). O método consiste em titular uma solução aquosa rica em sal (K₂HPO₄) no DES (massa inicial de ~2,00g) ou vice-versa, até que uma turvação seja visivelmente detectada. Essa turvação é denominada ponto de névoa e corresponde a formação da região bifásica ou heterogênea do sistema. Em seguida, água é titulada até que a solução se torne límpida novamente, sendo esse o ponto correspondente a região monofásica ou homogênea do sistema.

A composição da solução é calculada em cada ponto de névoa observado por quantificação mássica empregando uma balança analítica (AUX320, Shimadzu) com incerteza de ± 0,0001 g. Esse procedimento foi repetido até que houvesse pontos suficientes para obtenção da curva binodal (KAUL, 2000; PASSOS *et al.*, 2016). Os ensaios foram realizados utilizando um reator de vidro encamisado acomodado sobre um agitador magnético e conectado a um banho termostático com circulação de água (Lab Compain, RW- 1025G), com incerteza de ± 0,5 °C para controle da temperatura, como representado na FIGURA 9.

FIGURA 9 - ESQUEMA DO APARATO EXPERIMENTAL UTILIZADO PARA OBTENÇÃO DOS DADOS DE EQUILÍBRIO. (1) REATOR ENCAMISADO, (2) AGITADOR MAGNÉTICO, (3) BANHO TERMOSTÁTICO COM CIRCULAÇÃO DE ÁGUA, (4) SAÍDA DE ÁGUA DO REATOR E (5) ENTRADA DE ÁGUA NO REATOR.



FONTE: A autora (2019)

3.1.4 Linhas de amarração

O objetivo do estudo não foi avaliar o comportamento das fases, mas sim a composição dos sistemas na partição das biomoléculas. Por isso, para cada sistema foi obtida apenas uma linha de amarração. A partir dos diagramas obtidos no item anterior, foi selecionada uma composição global situada na região bifásica do diagrama de fases de cada um dos sistemas estudados.

As amostras foram preparadas em tubos tipo falcon, no qual os componentes foram adicionados gravimetricamente e em seguida agitados em um agitador vórtex (MX-S, Gomixer), até a completa solubilização dos componentes. Em seguida os tubos foram acondicionados em um banho termostático (RW – 1025G, Lab Companion) a $25 \pm 0,5$ °C por aproximadamente 24 horas para garantir que o equilíbrio fosse atingido (SAMPAIO *et al.*, 2016). Decorrido o tempo, as fases foram separadas cuidadosamente com o auxílio

de uma pipeta de Pasteur, tomando-se os devidos cuidados para evitar contaminação entre as fases, e seguida pesadas.

3.1.4.1 Validação da metodologia termogravimétrica (TGA) empregada na quantificação da composição das fases

Segundo Passos e colaboradores (2016), não há indícios sobre a estabilidade dos DES quando estes são aplicados para formação dos SDFA uma vez que apresentam uma partição não estequiométrica das espécies DH:RH nas fases. Nesse caso estes sistemas devem ser tratados como quaternários, tornando inviável o uso da metodologia de quantificação gravimétrica proposta por *Merchuk* (FARIAS *et al.*, 2017; MERCHUK; ANDREWS; ASENJO, 1998). Portanto, a determinação das composições das fases dos sistemas quaternários foi realizada por análise Termogravimétrica (TGA), conforme proposto por Farias e colaboradores (2017). Foi empregado um analisador termogravimétrico modelo TGA 400 da Perkin Elmer.

A metodologia foi validada para uso nos sistemas em questão. Para isso primeiramente 10 mg de cada componente individual (cloreto de colina, Fosfato de potássio dibásico, ureia, glucose, sorbose e xilitol) foi pesado e submetido a uma atmosfera de ar sintético a um fluxo de 50 mL.min⁻¹ e analisadas numa faixa de temperatura de 25 a 650 °C empregando-se uma taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹. Conhecendo o comportamento individual dos componentes, e sabendo que todos poderiam ser identificados por esta metodologia, misturas de concentrações conhecidas foram preparadas de forma a simular as fases de topo e fundo de cada sistema. Essas amostras foram analisadas como descrito anteriormente, e foi possível quantificar cada um dos quatro componentes presentes no SDFA (sal, água, doador de hidrogênio e receptor de hidrogênio). Com a metodologia validada para os sistemas em estudo, realizou-se a análise das fases em equilíbrio para todos os sistemas avaliados. Após determinar a concentração das fases, o comprimento das linhas de amarração dos sistemas quaternários foi calculado através da EQUAÇÃO 1.

$$CLA = \sqrt{(X_{topo} - X_{fundo})^2 + (Y_{topo} - Y_{fundo})^2 + (Z_{topo} - Z_{fundo})^2} \quad (1)$$

Onde X, Y e Z correspondem a concentração dos componentes (sal, DH e RH) nas fases de topo e fundo dos sistemas.

3.2 PARTIÇÃO DAS PROTEÍNAS

Após a determinação dos diagramas de fases de concentração dos compostos de fase de topo e fundo a P e T constantes, ou seja, levantamento das curvas binodais e a determinação das linhas de amarração dos sistemas, os S DFA foram empregados na avaliação da partição das proteínas.

Selecionou-se as proteínas BSA, lisozima e colágeno hidrolisado. A albumina de soro bovino (BSA) foi escolhida devido a ser uma das proteínas mais estudadas atualmente devido sua estabilidade, disponibilidade e baixo custo, além de ser considerada uma proteína padrão em diversas análises de caracterização proteica. O uso da lisozima se deveu ao fato desta ser uma proteína com ação enzimática, amplamente utilizada na indústria farmacêutica devido a sua função bactericida. Por fim, o colágeno hidrolisado foi selecionado devido a sua alta solubilidade em água e em soluções salinas, além de ser uma proteína amplamente utilizada pela indústria alimentícia, farmacêutica e de cosméticos.

Para os estudos de partição dessas três proteínas foram estabelecidos pontos de composição global sobre as linhas de amarração determinadas como descrito no item 4.1.4 para cada um dos S DFA estudados. As misturas foram preparadas gravimetricamente em microtubos tipo Eppendorf e posteriormente agitadas em agitador vórtex (MX-S, Gomixer), três vezes por cerca de 10 segundos. Todos os componentes foram adicionados em solução aquosa e a água restante foi substituída por uma solução contendo a proteína a ser particionada.

Os microtubos contendo as misturas foram centrifugados a 3500 rpm por 30 minutos para atingir a completa partição de cada biomolécula entre as fases dos sistemas (ZHANG *et al.*, 2016). As fases de topo e fundo foram separadas com auxílio de uma pipeta de Pasteur e quantificadas pelo método descrito na seção 3.3. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

3.3 QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNA NAS FASES

Para verificar o teor de proteína presente nas fases de topo e fundo de cada S DFA, utilizou-se o método de Bradford. Esse método foi escolhido por ser considerado um dos mais rápidos e sensíveis, além de estar sujeito a um número bem menor de interferentes do que outros métodos utilizados para esse fim.

Segundo ZAIA *et al.* (1998) a ureia pode ser considerada um interferente nas análises realizadas pelo método de Bradford fornecendo um resultado falso positivo em concentrações acima de 45 g.L⁻¹. Como a ureia foi uma das moléculas utilizadas na formação dos S DFA neste estudo, a possibilidade de falso positivo foi verificada. Para isso, uma solução de concentração conhecida da proteína BSA foi preparada e adicionada em soluções com amônia nas concentrações utilizadas no estudo, como descrito na TABELA 5. Em seguida as amostras foram avaliadas em triplicata pelo método de Bradford.

TABELA 5 - DADOS OBTIDOS PARA VALIDAÇÃO DO USO DO BRADFORD EM SOLUÇÕES COM UREIA.

Ureia em solução (%)	Absorbância 1	Absorbância 2	Absorbância 3	Concentração média (mg/ml)
5,0	0,243	0,241	0,243	5,09 ± 0,06
7,5	0,242	0,243	0,241	5,07 ± 0,05
10,0	0,240	0,241	0,242	5,02 ± 0,05
12,5	0,241	0,242	0,242	5,06 ± 0,03
15,0	0,241	0,242	0,241	5,04 ± 0,03
20,0	0,241	0,243	0,240	5,04 ± 0,08

FONTE: A autora (2018)

É possível observar que para concentrações de ureia entre 5,0 a 20,0 %, não houve influência significativa da ureia na determinação da concentração de BSA pelo método Bradford.

O método de Bradford é um método colorimétrico baseado na ligação do corante Coomassie Brilliant Blue G-250 com a proteína. A reação consiste em misturar 170µL da solução do corante (solução Bradford – 100 mg L⁻¹ de Coomassie Brilliant Blue G-205, 50 ml L⁻¹ de etanol 95% e 10 ml L⁻¹ de ácido fosfórico 85% para o preparo de 1 L de solução), 28µL de água ultrapura e 2µL de amostra. A mistura é homogeneizada e a absorbância determinada a 595 nm em um espectrofotômetro UV-VIS (UV-1800, Shimadzu). A curva de calibração para dosagem de proteínas pelo método de Bradford é construída utilizando-se a Albumina de soro bovino (BSA) como proteína padrão.

Todos os experimentos e quantificações foram realizados em duplicata para permitir a determinação do coeficiente de partição (K), a eficiência da extração (EE %) e

seus respectivos desvios padrão (σ). O coeficiente de partição (K) das proteínas foi determinado através da razão entre a concentração da biomolécula nas duas fases dos sistemas, EQUAÇÃO 2.

$$K = \frac{[Prot]_{fase\ 1}}{[Prot]_{fase\ 2}} \quad (2)$$

sendo que $[Prot]$ corresponde a concentração da proteína nas fases rica em cloreto de colina ou fosfato de potássio dibásico do sistema.

A eficiência da extração (EE%) foi calculada como a razão entre a concentração da proteína na fase preferencial de extração e concentração total do sistema, EQUAÇÃO 3.

$$EE\ (\%) = \frac{[Prot]_{1ou\ 2} \cdot V_{1ou\ 2}}{[Prot]_{1ou\ 2} \cdot V_{1ou\ 2} + [Prot]_{1ou\ 2} \cdot V_{1ou\ 2}} \times 100 \quad (3)$$

na qual V corresponde ao volume de cada fase, 1 corresponde a fase rica em $[N_{111(2OH)}]Cl$ e 2 corresponde a fase rica em sal (K_2HPO_4).

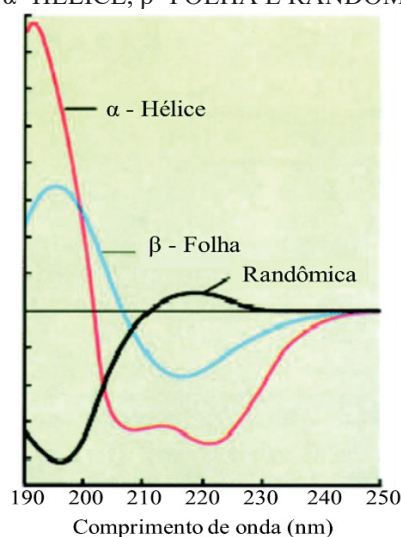
3.4 AVALIAÇÃO DA ESTRUTURA PROTEICA

3.4.1 Dicroísmo circular

O Dicroísmo Circular (CD, do inglês, *Circular Dichroism*) é uma técnica importante utilizada no estudo da estrutura secundária de proteínas em solução. A análise está baseada na diferença da absorção da luz circularmente polarizada entre o sentido horário e o anti-horário da cadeia polipeptídica (SREERAMA; WOODY, 2004; KELLY; JESS; PRICE, 2005).

Sistemas biológicos formados por proteínas, polissacarídeos e outros são majoritariamente formados de carbono, que em sua forma quaternária pode ser quiral, ou seja, absorve a luz circularmente polarizada à direita e a esquerda de maneira diversa. São essas diferenças que são detectadas pelos espectros de CD. Os espectros de dicroísmo circular são geralmente expostos em função da elipticidade molar $[\theta]$, na unidade $\frac{graus.cm^2}{10^{-1}.mol}$. O conjunto de ligações peptídicas, com uma série de diferentes ângulos de ligação gera um espectro de CD único, como é mostrado na FIGURA 10.

FIGURA 10 - ESPECTROS DE DICROISMO CIRCULAR CARACTERÍSTICO PARA ESTRUTURAS α - HÉLICE, β - FOLHA E RANDOMIZADA



FONTE: Matthews & Van Holde (1998)

A estrutura secundária de uma proteína pode ser α -hélice; folha β , α -hélice e folha β separadas ($\alpha+\beta$); α -hélice e folha β misturadas (α/β) e randômica.

Transcorrido os ensaios de partição e a quantificação do teor proteico nas fases de topo e fundo, realizou-se a análise de dicroísmo circular. Foram avaliadas as fases que apresentaram maior concentração de proteína para detectar qualquer alteração na estrutura proteica decorrente do processo de separação em S DFA.

A conformação das proteínas foi avaliada em um espectro polarímetro de CD (J-815, Jasco International CO., Japão) do laboratório de Bioquímica (UFPR). Os espectros foram obtidos utilizando cubeta de quartzo com caminho óptico de 10 mm e 1 cm de largura. A temperatura de análise foi 25 °C, sendo empregado o nitrogênio como gás de purga a uma vazão de 10 L.min⁻¹. Foram avaliadas amostras em concentração de 0,5 mg.mL⁻¹ nos comprimentos de onda de 205 a 340 nm, faixa essa que contempla a verificação da conformação da estrutura secundária e terciária da proteína. Os espectros são apresentados em função da elipticidade molar, calculada de acordo com a EQUAÇÃO 4.

$$MRE = \frac{\theta \times 100 \times MM}{C \times l \times n} \quad (4)$$

sendo:

MRE: Elipticidade molar, expressa em grau.cm².dmol⁻¹

θ : Elipticidade (grau);

MM: Massa molar da proteína (g.dmol⁻¹);

C: concentração da proteína ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$);

L: caminho óptico (cm);

n: número de resíduos da proteína;

3.4.2 Ressonância Magnética Nuclear

A técnica de RMN H^1 é amplamente utilizada para verificar as interações proteína- ligante, sendo capaz de detectar e quantificar as interações com alta sensibilidade. É possível identificar alterações na estrutura da proteína através da análise do número de ligações de H. Entretanto, devido à alta complexidade da estrutura da proteína, é necessário realizar um mapeamento isótopo da biomolécula. Como o foco do estudo é avaliar os sistemas e não as proteínas em si, optou-se por realizar a análise de maneira qualitativa por meio de uma comparação visual dos espectros.

As análises foram realizadas no Centro de RMN da Universidade Federal do Paraná em um espectrômetro Bruker, modelo avance DRX 400 MHz, onde todas as amostras foram devidamente diluídas em soluções de água deuterada (D_2O) com dimetil sulfóxido (DMSO), e acondicionadas em tubos de precisão para RMN.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 USO DE DES NA EXTRAÇÃO

4.1.1 Preparo do DES

Inicialmente foi realizado o preparo dos DES conforme descrito na secção 3.1.2. Foram obtidos quatro (4) diferentes DES, formados por $[N_{111}(2OH)]Cl$ como molécula receptora de hidrogênio (RH) e ureia, glucose, xilitol e sorbose como moléculas doadoras de hidrogênio (DH). Em todos os sistemas foram adicionados 25% de água em relação a massa total do sistema, para reduzir a viscosidade e auxiliar na a formação do solvente.

Os solventes foram desenvolvidos em 3 razões molares (RH:DH), sendo 2:1, 1:1 e 1:2 (TABELA 6).

TABELA 6 - COMPOSIÇÃO DOS DES DESENVOLVIDOS EM CADA RAZÃO MÁSSICA.

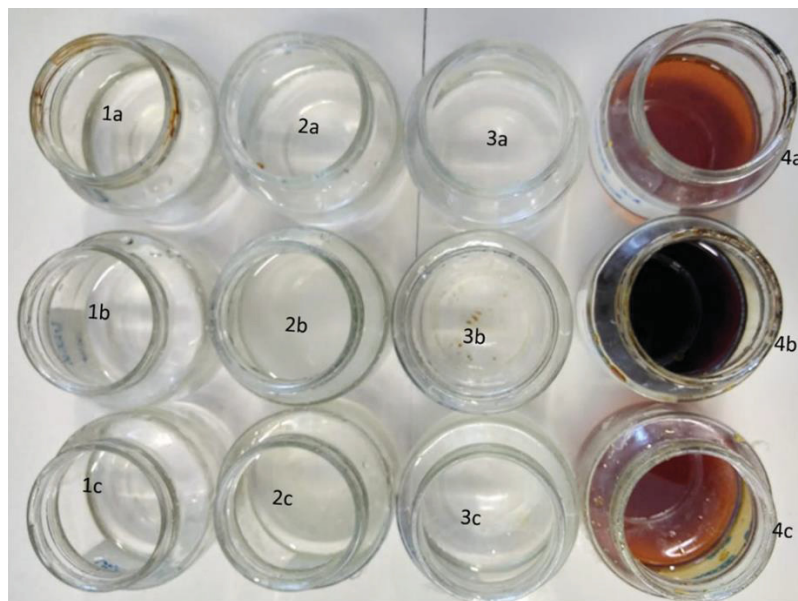
RH: DH		2:1			1:1			1:2		
		% RH	% DH	% _{H₂O}	%RH	%DH	% H ₂ O	%RH	% DH	% H ₂ O
$[N_{111}(2OH)] Cl$:Ureia + H ₂ O	CHCL.U	61,73	13,28	25,00	52,44	22,56	25,00	40,31	34,69	25,00
$[N_{111}(2OH)] Cl$:Glucose+ H ₂ O	CHCL.G	45,59	29,42	25,00	32,75	42,26	25,00	20,94	54,06	25,00
$[N_{111}(2OH)] Cl$:Xilitol+ H ₂ O	CHCL.X	48,55	26,45	25,00	35,89	39,11	25,00	23,59	51,41	25,00
$[N_{111}(2OH)] Cl$:Sorbose+ H ₂ O	CHCL.S	45,59	29,42	25,00	32,75	42,26	25,00	20,94	54,06	25,00

FONTE: A autora (2019)

Para obtenção dos solventes formados por ureia, glucose e xilitol foram necessárias 12 horas de agitação orbital em banho maria (Dubnoff) a 60 °C, enquanto que para o solvente formado por cloreto de colina e Sorbose foram necessárias 24 horas de agitação a 80 °C, para a obtenção de um líquido homogêneo e transparente como mostrado na FIGURA 11.

De acordo com estudos, a estabilidade das ligações de hidrogênio dos DES não é mantida quando estes são aplicados a SDFA (PASSOS *et al.*, 2016). No entanto, optou-se por sintetizá-los para facilitar a etapa subsequente; o levantamento das curvas binodais. Todos os recipientes contendo os DES foram vedados e armazenados a temperatura ambiente.

FIGURA 11 - SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS: 1.a) CHCl.U 2:1; 1.b) CHCl.U 1:1; 1.c) CHCl.U 1:2; 2.a) CHCl.G 2:1; 2.b) CHCl.G 1:1; 2.c) CHCl.G 1:2; 3.a) CHCl.X 2:1; 3.b) CHCl.X 1:1; 3.c) CHCl.X 1:2; 4.a) CHCl.S 2:1; 4.b) CHCl.S 1:1; 4.c) CHCl.S 1:2



FONTE: A autora (2018)

Os DES obtidos com ureia, glucose e xilitol apresentaram características físicas semelhantes, sendo os três (3) transparentes e incolores. Os DES formados por xilitol (CHCl.X) apresentaram maior viscosidade em relação aos outros DES produzidos. No solvente obtido com sorbose obteve-se um líquido homogêneo e transparente, porém com cor caramelo. Como o objetivo é aplicar os DES em SDFA, a utilização de solventes coloridos pode ser um agente facilitador para visualizar a separação das fases.

Extração de proteínas com DES

Inicialmente optou-se por avaliar a extração de proteína diretamente da matriz vegetal complexa com o uso de DES para em seguida realizar a etapa de separação e purificação aplicando o extrato de DES na formação do SDFA. Para isso grãos de soja foram triturados em moinho para obtenção de soja em pó.

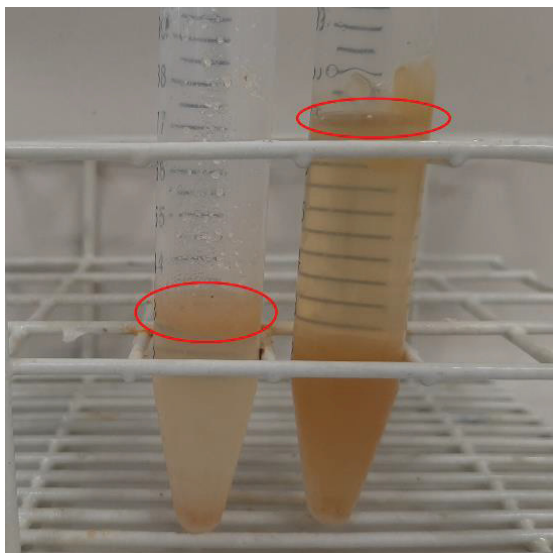
Em uma célula de vidro encamisada com circulação de água a 25 °C foram adicionados o DES e a matriz em pó em uma razão 20:1, e submetidos a uma hora de agitação.

Em todos os DES avaliados não foi possível cumprir o período de extração pré determinado (1 hora) pois o sistema adquiriu uma característica pastosa, o que impedia a

agitação subsequente e tornou inviável a quantificação proteica e a aplicação do DES na formação do SDFA.

Desta forma, optou-se por realizar a extração e a separação simultaneamente em SDFA formado por DES. A extração se deu em um período de uma hora de agitação seguido do processo de separação “*over night*.” Decorrido o tempo era possível observar a formação das duas fases, porém em todos os sistemas havia a formação de uma camada lipídica sobre a fase de topo como mostra a FIGURA 12. Realizou-se a separação das fases, inclusive desta camada lipídica e a quantificação proteica foi realizada pelo método de Bradford, constatando que no gel formado estava presente a maior concentração de proteína.

FIGURA 12 - SDFA COM PELÍCULA LIPÍDICA FORMADA DURANTE A EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA DA MATRIZ DE SOJA.



FONTE: A autora (2018)

Para conhecer a matriz e entender a formação desta terceira fase bem como determinar soluções para eliminá-la, realizou-se a caracterização físico química dos grãos de acordo com os métodos descritos pela AOAC (1984) e IAL (1985).

A média do teor dos componentes encontrados em base seca foi de 41,7% de proteína; 23,5% de lipídeos; 8,9% de umidade; 4,3% de cinzas e 21,6% de carboidratos.

Com intuito de verificar a influência da composição da matriz, o mesmo processo de separação em SDFA formado por DES foi aplicado ao isolado proteico de soja, o qual é constituído de cerca de 85% de proteína e obtido de flocos desengordurados de soja

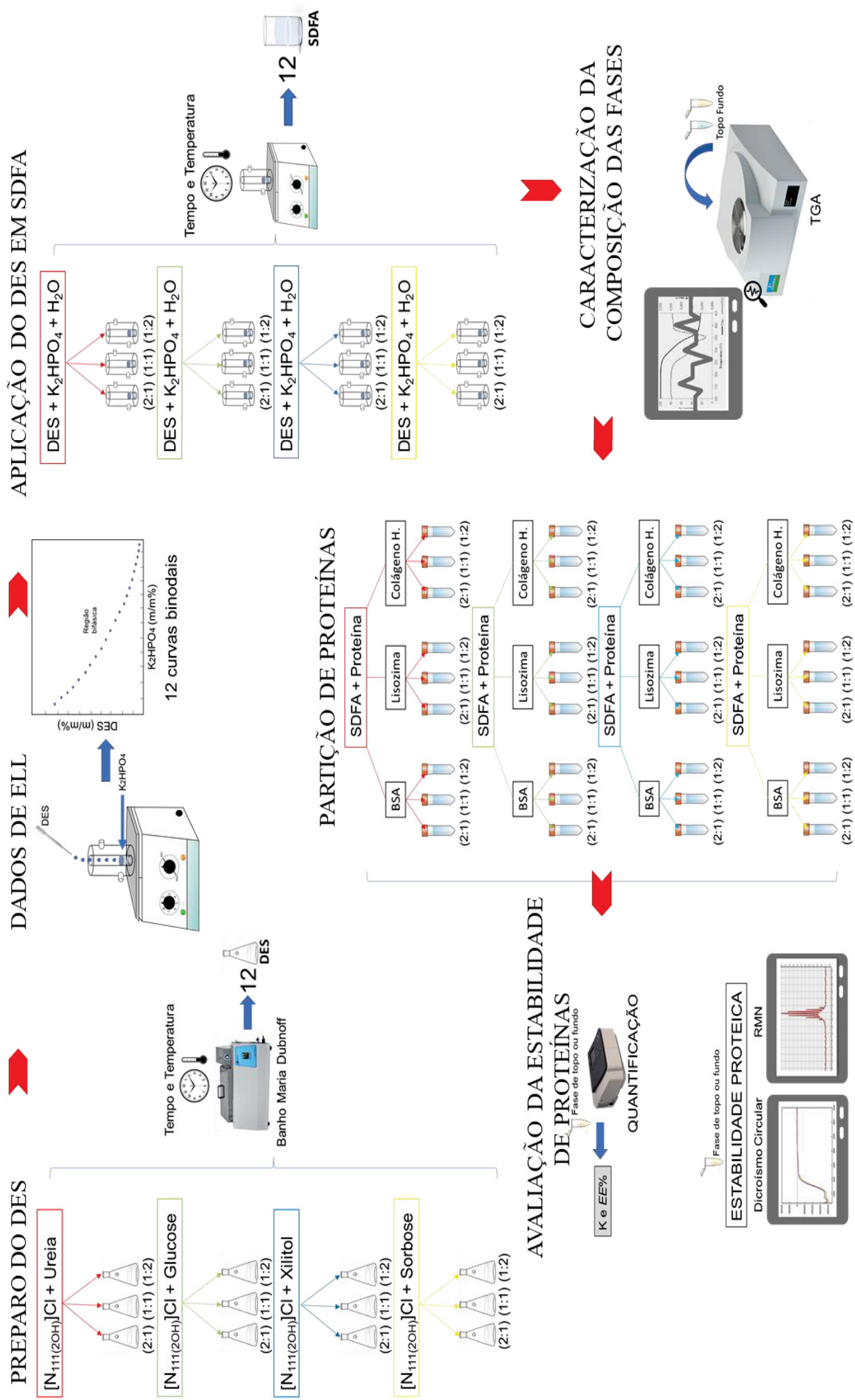
(HUA, CHUI; WANG, 2004). Neste caso houve a formação de fases sem a presença da película lipídica e foi possível realizar a quantificação proteica das fases.

Apesar do alto teor proteico da soja, concluiu-se que, para realizar a extração e separação diretamente da matriz, seria necessário retirar a fração lipídica da amostra, minimizando o efeito da formação da película.

Para não comprometer o andamento da pesquisa, optou-se por seguir o estudo utilizando somente as proteínas padrões BSA, Lisozima e Colágeno hidrolisado.

Na FIGURA 13 um resumo esquemático do desenvolvimento prático do trabalho é apresentado para facilitar a compreensão.

FIGURA 13. RESUMO ESQUEMÁTICO DO DESENVOLVIMENTO PRÁTICO DO TRABALHO.

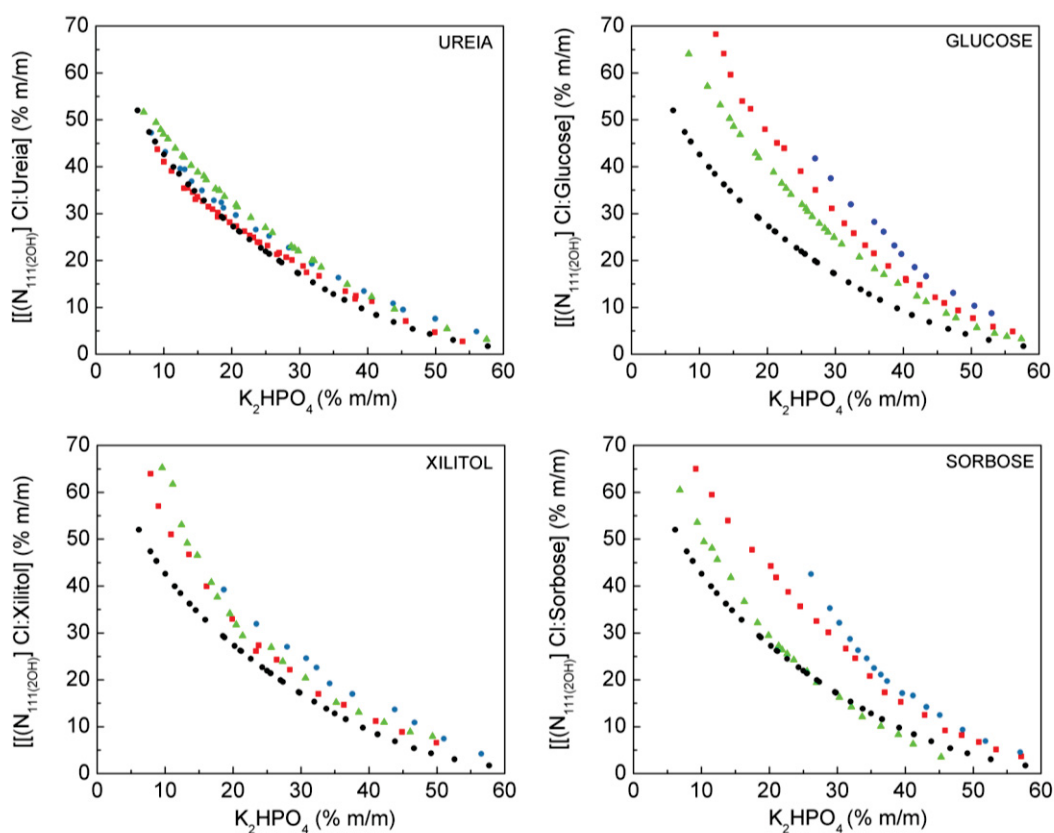


4.2 DETERMINAÇÃO DOS DADOS DE EQUILÍBRIO

Para determinação dos dados de equilíbrio, inicialmente realizou-se o levantamento das curvas binodais. Estas foram obtidas utilizando-se os DES sintetizados inicialmente, o K_2HPO_4 , o qual de acordo com a série de *Hofmeister* apresenta capacidade de causar *salting-out*, e H_2O . Além dos sistemas formados por DES, foi realizado o levantamento da curva binodal formada apenas por $[N_{111(2OH)}]Cl + K_2HPO_4 + H_2O$, a fim de avaliar a influência dessas moléculas doadoras de hidrogênio (ureia, glucose, sorbose e xilitol) no comportamento dos SDFA. Todos os ensaios foram realizados a $25\text{ }^\circ\text{C}$ para evitar a possível solidificação dos DES.

Todas as curvas binodais estão apresentadas na FIGURA 14 e os dados descritos estão apresentados no APÊNDICE A.

FIGURA 14 - DIAGRAMAS DE FASES OBTIDOS A $25\text{ }^\circ\text{C}$ E PRESSÃO ATMOSFÉRICA DOS SDFA COMPOSTOS POR DES+ K_2HPO_4 + H_2O , UTILIZANDO DIFERENTES DOADORES DE HIDROGÊNIO A DIFERENTES RAZÕES MASSICAS (\blacktriangle) 2:1, (\blacksquare) 1:1 E (\bullet) 1:2 E (\odot) SISTEMA TERNÁRIO FORMADO POR $[N_{111(2OH)}]Cl + K_2HPO_4 + H_2O$.



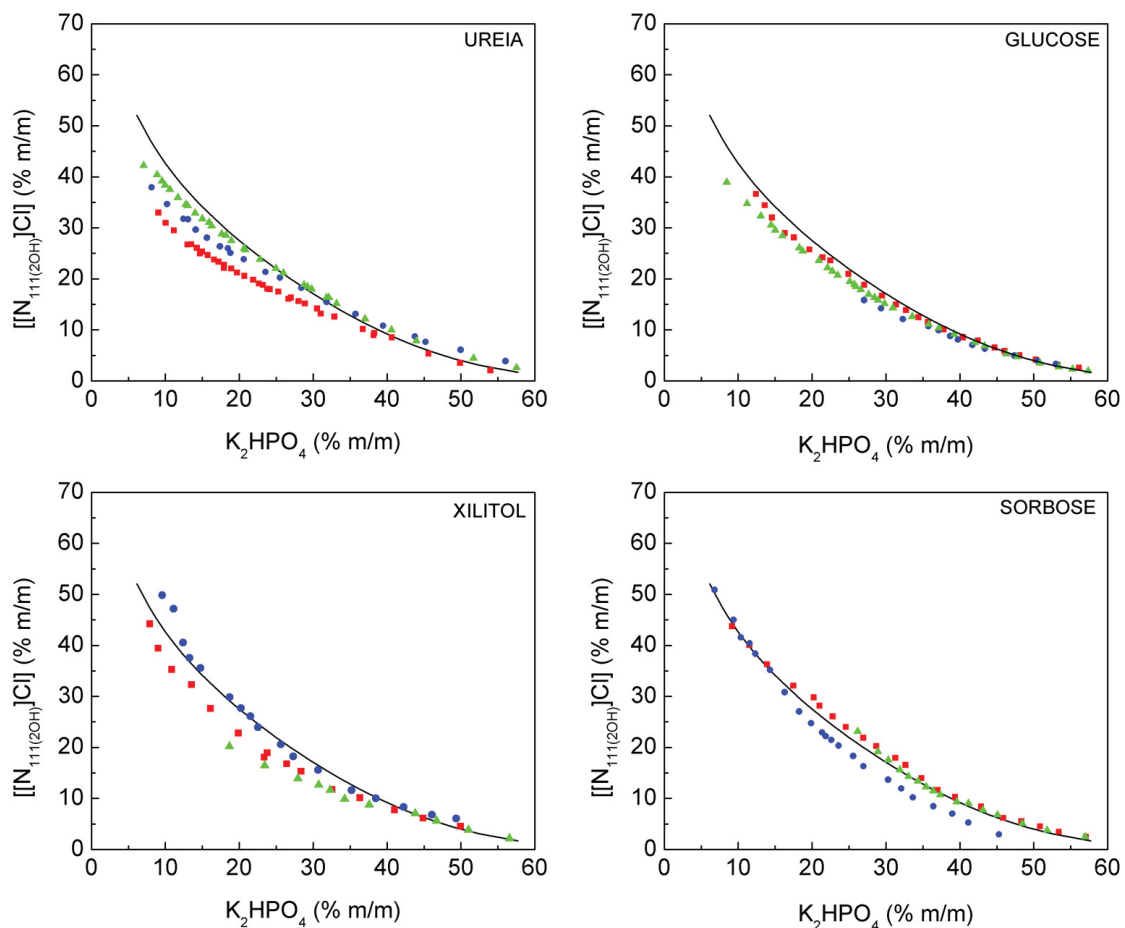
FONTE: A autora (2018)

Em todas as curvas binodais acima apresentadas, a área abaixo da curva indica a região monofásica do SDFa e a área acima da curva indica a região bifásica dos sistemas.

Observou-se que todas as curvas binodais dos SDFa formados com as moléculas doadoras de hidrogênio apresentaram comportamento semelhante à curva obtida para o sistema ternário ($[(N_{111}(2OH)]Cl + K_2HPO_4 + H_2O$). Quanto maior a capacidade do DES em formar fases, mais próxima da origem dos eixos está situada a binodal. Observa-se em todos os sistemas estudados que quanto maior a concentração da molécula doadora de hidrogênio, menor é a região bifásica obtida, ou seja, a presença do doador no SDFa diminui a região heterogênea do sistema. Açúcares com maior peso molecular apresentaram maior redução da região heterogênea devido a menor fração de cloreto de colina presente (glucose \approx sorbose $>$ xilitol). Esses resultados corroboram com os dados obtidos por Passos *et al.* (2016) e Farias *et al.* (2017) que obtiveram comportamentos semelhantes de diagramas de fases na avaliação da influência de glucose, ácido acético, ácido láctico, ácido cítrico e ureia como moléculas doadoras de hidrogênio.

Uma vez observado o comportamento semelhante nos sistemas quaternários, optou-se por avaliar as curvas binodais em função da concentração do cloreto de colina na mistura inicial do DES, ou seja, em base livre de doador de hidrogênio (FIGURA 15).

FIGURA 15 - DIAGRAMA DE FASES DOS SDFA COMPOSTOS POR DES + K_2HPO_4 + H_2O EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE $[N_{111(20H)}]Cl$ COM DIFERENTES DOADORES DE HIDROGÊNIO NAS TRÊS RAZÕES MÁSSICAS ESTUDADAS COM $[N_{111(20H)}]Cl$: (\blacktriangle) 2:1, (\blacksquare) 1:1, (\bullet) 1:2 E (—) PARA O SISTEMA TERNÁRIO FORMADO POR $[N_{111(20H)}]Cl$ + K_2HPO_4 + H_2O .



FONTE: A autora (2019)

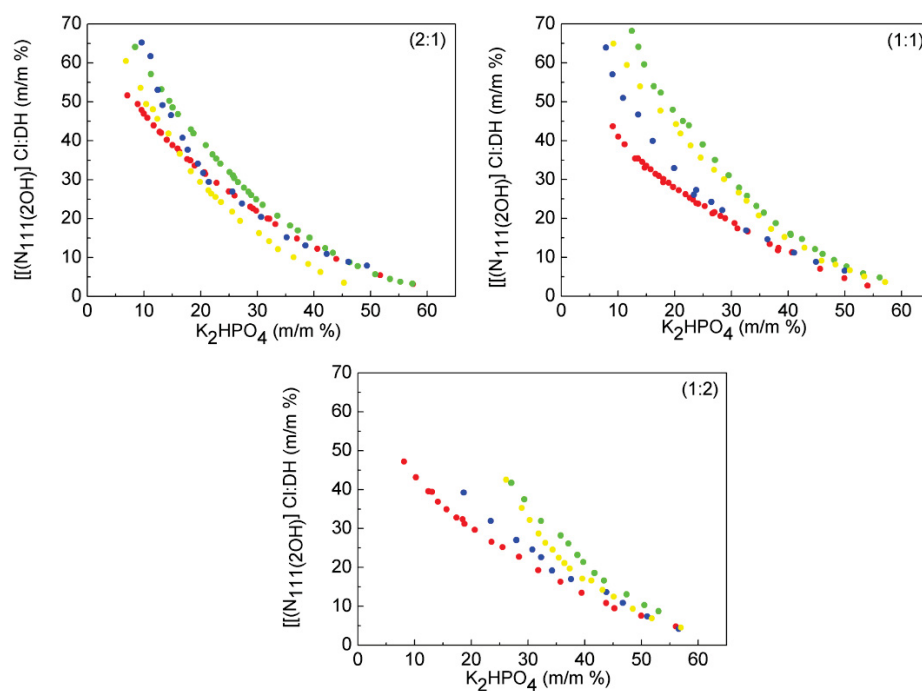
A sobreposição das curvas comprova essa semelhança comportamental, a qual segundo pesquisadores (PASSOS *et al.*, 2016, FARIAS; PASSOS; *et al.*, 2017), indica que a molécula doadora de hidrogênio pouco interfere na formação das duas fases aquosas, e que esta ocorre predominantemente pela presença do cloreto de colina.

Embora o doador não afete o comportamento da curva binodal, não é possível afirmar essa influência sobre as linhas de amarração e principalmente sobre o coeficiente de partição das proteínas. Tem-se observado em diversos trabalhos, inclusive do grupo LATOS (PASSOS *et al.*, 2016, FARIAS; PASSOS; *et al.*, 2017, FARIAS *et al.*, 2017), que o doador de hidrogênio é capaz de alterar as propriedades físico-químicas das fases em equilíbrio e, conseqüentemente, a partição de biomoléculas nesses sistemas. Portanto, mesmo tendo pouco efeito sobre a janela de operação dos SDFA, ou seja, faixa de

concentração na qual o sistema é heterogêneo, a influência dos doadores de hidrogênio sobre a separação de biomoléculas nos SDFA deve ser avaliada.

Na FIGURA 16 têm-se a representação dos diagramas de fases dos quatro sistemas em mesma razão molar, para avaliar o efeito do DH e não da sua concentração.

FIGURA 16. DIAGRAMA DE FASES DOS SDFA COMPOSTOS POR DES + K₂HPO₄ + H₂O OBTIDOS A 25 °C E PRESSÃO ATMOSFÉRICA COM DIFERENTES DOADORES DE HIDROGÊNIO (●) UREIA, (●) GLUCOSE, (●) XILITOL E (●) SORBOSE NAS TRÊS RAZÕES MÁSSICAS ESTUDAS.



FONTE: A autora (2019)

É possível observar que a natureza do doador apresentou influência na formação da região bifásica. Em relação aos açúcares utilizados como DH, os sistemas formados por $[N_{111}(2OH)Cl]+glucose+K_2HPO_4+H_2O$ nas três razões molares foram os que apresentaram menor região bifásica. Com exceção do sistema formado por sorbose em razão molar (2:1) que apresentou a maior região bifásica, todos os outros sistemas apresentaram comportamento semelhante nas 3 razões molares. Nesse caso o sistema formado por xilitol é o que apresentou melhor desempenho nas 3 razões molares, por apresentarem a curva binodal mais próxima do eixo, e maior região a ser aplicada em processos de separação.

Para determinação do diagrama de fases (constituente da fase de topo x constituinte da fase de fundo a P e T constantes), é necessária a obtenção da curva binodal e das linhas de amarração. Em estudos que buscam avaliar o comportamento das fases, é necessário a determinação de um número de linhas de amarração que satisfaçam o grau de liberdade necessário para realizar a modelagem termodinâmica dos dados de equilíbrio. No entanto, o enfoque deste trabalho é avaliar o potencial de SDFa na separação de proteínas. Desta forma, para cada um dos sistemas selecionados foram determinadas uma (1) linha de amarração.

4.3 DETERMINAÇÃO DAS LINHAS DE AMARRAÇÃO

4.2.1 Validação da metodologia analítica (TGA)

A composição das fases em equilíbrio, conforme descrito na seção 3.1.4.1, foram determinadas por análise termogravimétrica (TGA), a qual leva em consideração a diferença entre a temperatura de decomposição de cada componente.

O uso do TGA é encontrado na literatura para a determinação do teor de água em DES (DAI *et al.*, 2013), quantificação de DES em compósitos (XU; WANG *et al.*, 2016) e quantificação de fases de SDFa (FARIAS *et al.*, 2017). Na FIGURA 17 são apresentadas as curvas de TGA de amostras da fase de topo e de fundo, do SDFa composto por $[N_{111}(2OH)]Cl : UREIA + K_2HPO_4 + H_2O$.

Para certificar-se da capacidade do uso desta técnica na quantificação das fases dos SDFa desenvolvidos nesse estudo, soluções de concentrações conhecidas, de forma a simular as fases de topo e fundo, conforme descritas na TABELA 7, foram quantificadas por TGA. Observa-se que a diferença média entre os valores determinados por TGA e os valores reais (preparados por gravimetria) apresentam pequenas variações indicando a precisão da técnica empregada.

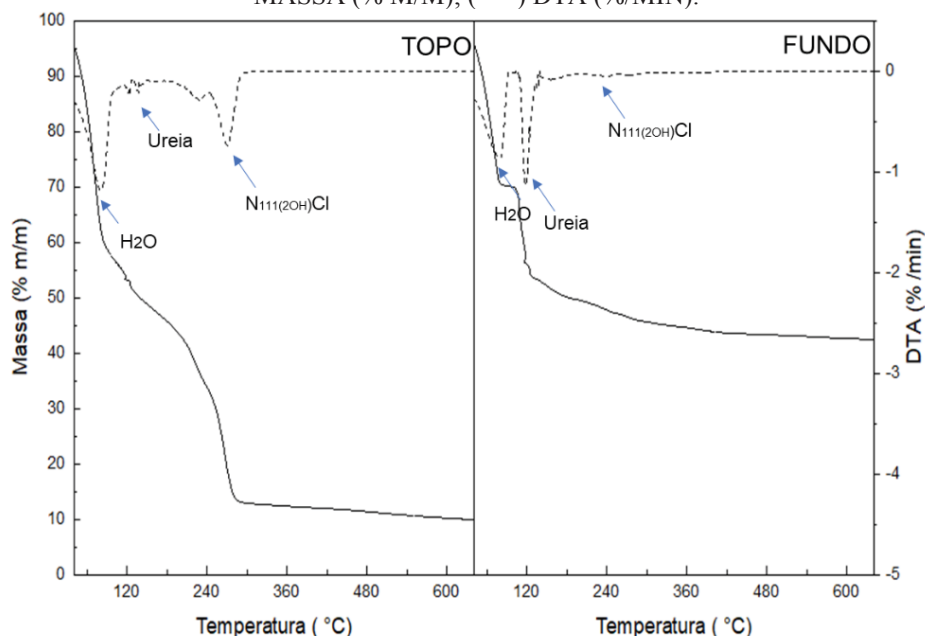
TABELA 7. CONCENTRAÇÕES DOS COMPONENTES DAS FASES SIMULADAS PARA VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE TGA, E AMOSTRAS QUANTIFICADAS POR TGA, ONDE: (1) K_2HPO_4 ; (2) DH; (3) $N_{111(2OH)}Cl$; (4) H_2O^* , T: FASE DE TOPO E F: FASE FUNDO.

	Concentração conhecida				Concentração determinada por TGA					
		[1]	[2]	[3]	[4]	[1]	[2]	[3]	[4]	
Ureia	T	10	25	15	50	T	10,27±0,02	24,68±0,01	15,79±0,02	48,17±0,06
	F	50	12	8	30	F	50,39±0,01	11,17±0,02	8,67±0,03	29,68±0,03
Glucose	T	20	15	25	40	T	20,41±0,02	14,31±0,01	25,82±0,02	39,51±0,05
	F	40	10	15	35	F	39,08±0,05	10,48±0,03	14,26±0,06	36,07±0,02
Xilitol	T	10	15	50	25	T	10,19±0,03	14,87±0,01	50,02±0,01	24,86±0,01
	F	40	10	15	35	F	39,37±0,02	11,16±0,04	14,16±0,05	35,27±0,03
Sorbose	T	15	20	35	30	T	16,17±0,05	18,05±0,06	34,72±0,03	30,94±0,06
	F	35	10	20	35	F	36,29±0,05	8,26±0,06	21,39±0,02	34,13±0,01

*As concentrações são expostas em % com relação a massa total dos sistemas.

FONTE: A autora (2019)

FIGURA 17 - EXEMPLO DO GRÁFICO DE TGA PARA A QUANTIFICAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DAS FASES CONHECIDAS DO S DFA: [$N_{111(2OH)}Cl$: UREIA + K_2HPO_4 + H_2O , (—) PERDA DE MASSA (% M/M); (- - -) DTA (%/MIN).

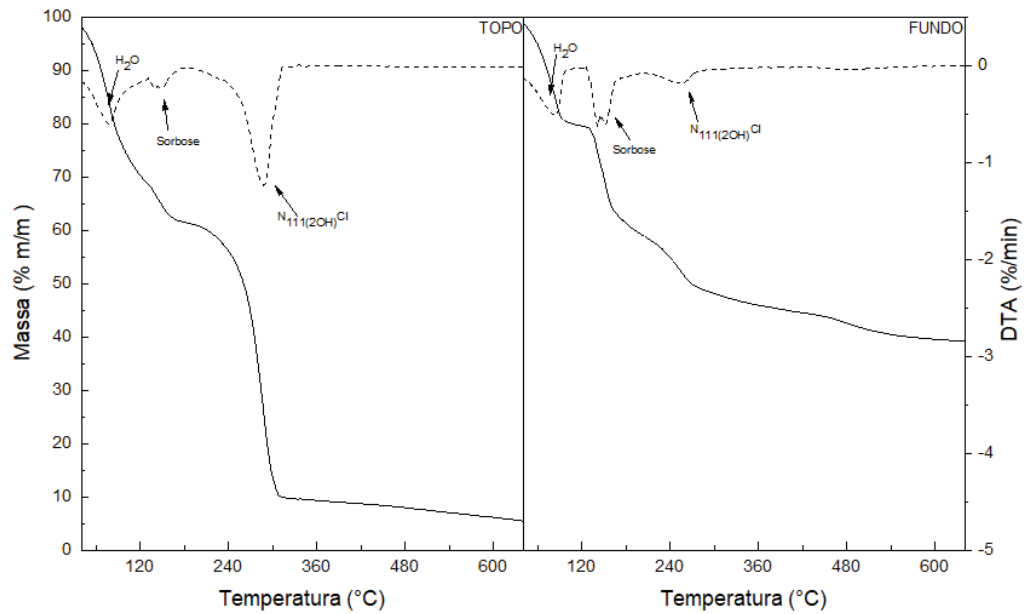


FONTE: A autora (2018)

4.3.1 Determinação das linhas de amarração dos S DFA

Com a validação da metodologia e conhecendo os pontos de fusão/decomposição característico de cada componente, realizou-se a quantificação das linhas de amarração dos S DFA avaliados neste trabalho. Na FIGURA 18 tem-se o exemplo dos gráficos obtidos para o sistema formado por $[N_{111(2OH)}Cl]$: sorbose + K_2HPO_4 + H_2O na razão molar (1:1). As curvas de TGA para os demais sistemas são apresentadas no APENDICE A.

FIGURA 18 - EXEMPLO DE ESPECTRO DE TGA PARA A QUANTIFICAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DAS FASES DO SDFA: $[N_{111}(2OH)]Cl$:SORBOSE + $K_2HPO_4 + H_2O$ (1:1), (—) PERDA DE MASSA (% M/M); (- - -) DTA (%/MIN).



FONTE: A autora (2018)

A composição global foi selecionada através da determinação de um ponto que compreendesse a região bifásica de cada sistema nas três razões molares.

Na TABELA 8 são apresentadas as composições globais, da fase de topo e fase de fundo para os SDFA avaliados neste trabalho.

TABELA 8 - DADOS EXPERIMENTAIS DE ELL PARA OS SDFA A 25 °C E PRESSÃO ATMOSFÉRICA.

DH	Composição Global (% m/m)				Fase de Topo (% m/m)				Fase de Fundo (% m/m)				CLA
	K ₂ HPO ₄	DES	[N _{111(20H)}]Cl	DH	K ₂ HPO ₄	H ₂ O	[N _{111(20H)}]Cl	DH	[N _{111(20H)}]Cl	DH	K ₂ HPO ₄	H ₂ O	
					[N _{111(20H)}]Cl: RH (2:1) + K ₂ HPO ₄ + H ₂ O								
Ureia	28,0	28,0	43,9	10,1	11,0	35,0			8,2	14,0	41,2	36,6	46,9
Glucose	35,0	35,0	47,6	9,0	5,8	37,6			5,8	14,2	44,6	35,4	57,3
Xilitol	35,0	35,0	49,7	7,1	6,1	37,1			8,5	12,2	43,0	36,3	55,5
Sorbose	40,0	20,0	44,8	9,5	7,1	38,6			4,8	11,2	48,3	35,7	57,4
					[N _{111(20H)}]Cl: RH (1:1) + K ₂ HPO ₄ + H ₂ O								
Ureia	28,0	28,0	43,4	10,2	7,5	38,9			5,3	12,1	51,2	31,4	58,0
Glucose	35,0	35,0	51,5	9,8	6,8	31,9			8,7	14,8	45,3	31,2	57,8
Xilitol	35,0	35,0	40,6	9,7	5,4	44,3			10,2	12,7	40,6	36,5	46,6
Sorbose	40,0	20,0	45,8	8,1	7,8	38,3			10,7	16,4	42,7	30,2	50,2
					[N _{111(20H)}]Cl: RH (1:2) + K ₂ HPO ₄ + H ₂ O								
Ureia	28,0	28,0	44,8	10,1	9,6	35,5			4,6	13,7	49,8	31,9	57,0
Glucose	35,0	35,0	51,6	11,0	4,3	33,1			7,5	12,2	46,6	33,7	61,1
Xilitol	35,0	35,0	N.S	N.S	N.S	N.S			N.S	N.S	N.S	N.S	-
Sorbose	40,0	20,0	N.S	N.S	N.S	N.S			N.S	N.S	N.S	N.S	-

^a As incertezas padrão (u) são u(m) = 0,1 %, u(T) = 0,2 °C e u(P) = 10 kPa.

FONTE: A autora (2018)

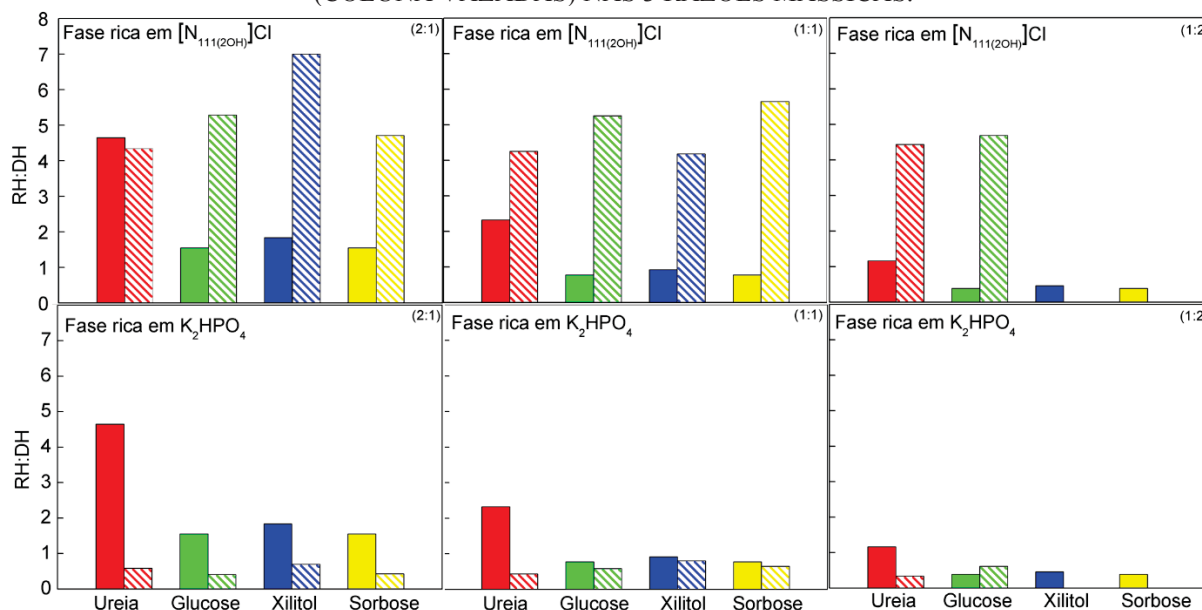
Os resultados indicam que houve a formação de uma fase rica em cloreto de colina (fase de topo) e outra rica em K_2HPO_4 (fase de fundo).

É possível observar na TABELA 8 que os sistemas formados por $[N_{111}(2OH)]Cl$: xilitol e $[N_{111}(2OH)]Cl$: sorbose em razão molar 1:2, não apresentaram a formação das duas fases aquosas no ponto de composição global em que foi avaliado. Com relação ao comprimento da linha de amarração (CLA), o sistema $[N_{111}(2OH)]Cl$: glucose (1:2) + $K_2HPO_4 + H_2O$, foi o que apresentou maior comprimento de linha de amarração (61,10), enquanto que, o sistema formado por $[N_{111}(2OH)]Cl$: xilitol (1:1) + $K_2HPO_4 + H_2O$, apresentou o menor CLA de 46,60. Maiores comprimentos de linha de amarração são resultantes de maiores diferenças na composição das fases de topo e fundo do SDFA, o que se torna relevante se tratando da aplicação em processos de partição de solutos.

Avaliando a concentração de $[N_{111}(2OH)]Cl$ e DH (ureia, glucose, xilitol e sorbose) nas fases, é notável a partição preferencial das moléculas doadoras de hidrogênio para fase de fundo, indicando instabilidade do DES como um único composto quando aplicado em SDFA.

Na TABELA 9, assim como na FIGURA 19, são apresentadas as razões mássicas dos constituintes dos DES (RH:DH) na formação do solvente e nas fases em equilíbrio (topo e fundo). Observa-se que as razões molares obtidas na formação dos DES não são mantidas em nenhum dos sistemas. Esse fato comprova que as ligações de hidrogênio que formam os DES foram quebradas, promovendo a partição não estequiométrica dos constituintes dos DES entre as fases em equilíbrio. Esse comportamento já era esperado e corrobora os resultados obtidos por Passos *et al.* (2016) e Farias *et al.* (2017). Portanto, os SDFA avaliados devem ser tratados como sistemas quaternário, *i.e.*, $[N_{111}(2OH)]Cl + RH + K_2HPO_4 + H_2O$.

FIGURA 19 - RAZÃO MÁSSICA ENTRE RECEPTOR (RH) E DOADOR (DH) DE HIDROGÊNIO (NO DES INICIAL (COLUNAS CHEIAS) E EM CADA UMA DAS FASES APÓS A SEPARAÇÃO (COLUNA VAZADAS) NAS 3 RAZÕES MÁSSICAS.



FONTE: A autora (2018)

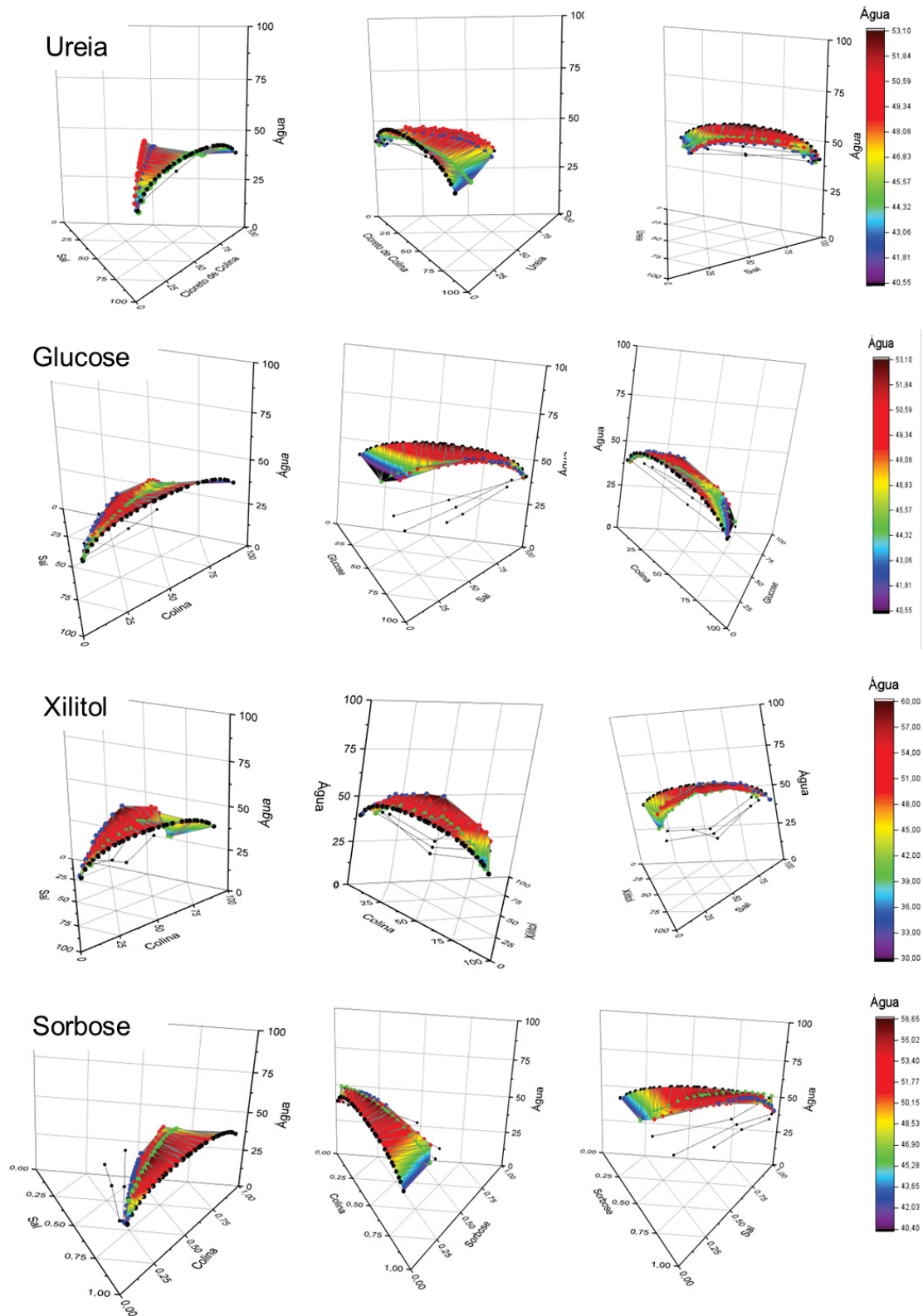
TABELA 9 - DADOS EXPERIMENTAIS DAS RAZÕES MÁSSICAS ENTRE RECEPTOR DE HIDROGÊNIO (RH) E DOADOR DE HIDROGÊNIO (DH) NA MISTURA INICIAL DO DES E NAS FASES DE TOPO E FUNDO DOS SDFA.

Fase rica em $[N_{111(2OH)}]Cl$						
	2:1		1:1		1:2	
	DES _{inicial}	SDFA	DES _{inicial}	SDFA	DES _{inicial}	SDFA
Ureia	4,65	4,35	2,32	4,25	1,16	4,44
Glucose	1,55	5,29	0,78	5,26	0,39	4,69
Xilitol	1,84	7,00	0,92	4,19	0,46	-
Sorbose	1,55	4,72	0,78	5,65	0,39	-
Fase rica em K_2HPO_4						
	2:1		1:1		1:2	
	DES _{inicial}	SDFA	DES _{inicial}	SDFA	DES _{inicial}	SDFA
Ureia	4,65	0,59	2,32	0,44	1,16	0,34
Glucose	1,55	0,41	0,78	0,59	0,39	0,61
Xilitol	1,84	0,70	0,92	0,80	0,46	-
Sorbose	1,55	0,43	0,78	0,65	0,39	-

FONTE: A autora (2018).

Os sistemas quaternários são mais complexos que os ternários, e nem sempre a representação pseudoternária é suficiente para representar graficamente o sistema. Na FIGURA 20 o comportamento de fases dos SDFA avaliados (curva binodal e linhas de amarração) são apresentadas. Nota-se que algumas linhas de amarração não estão ancoradas nas respectivas curvas binodais. Isso se deve ao fato de que as curvas binodais não cobriram toda a região de duas fases em razão da maior complexidade da representação quaternária em relação à ternária.

FIGURA 20 - REPRESENTAÇÃO TRIDIMENSIONAL DOS SISTEMAS QUATERNÁRIOS $[N_{111(20H)}]Cl$ + DOADOR DE HIDROGÊNIO + K_2HPO_4 + H_2O EM DIFERENTES RAZÕES $[N_{111(20H)}]Cl$: DH: (●) 2:1; (●) 1:1 E (●) 1:2 E PARA O SISTEMA TERNÁRIO (●) $[N_{111(20H)}]Cl$ + K_2HPO_4 + H_2O .



FONTE: A autora (2019).

4.4 APLICAÇÃO DO SDFA NA PARTIÇÃO DE PROTEÍNAS

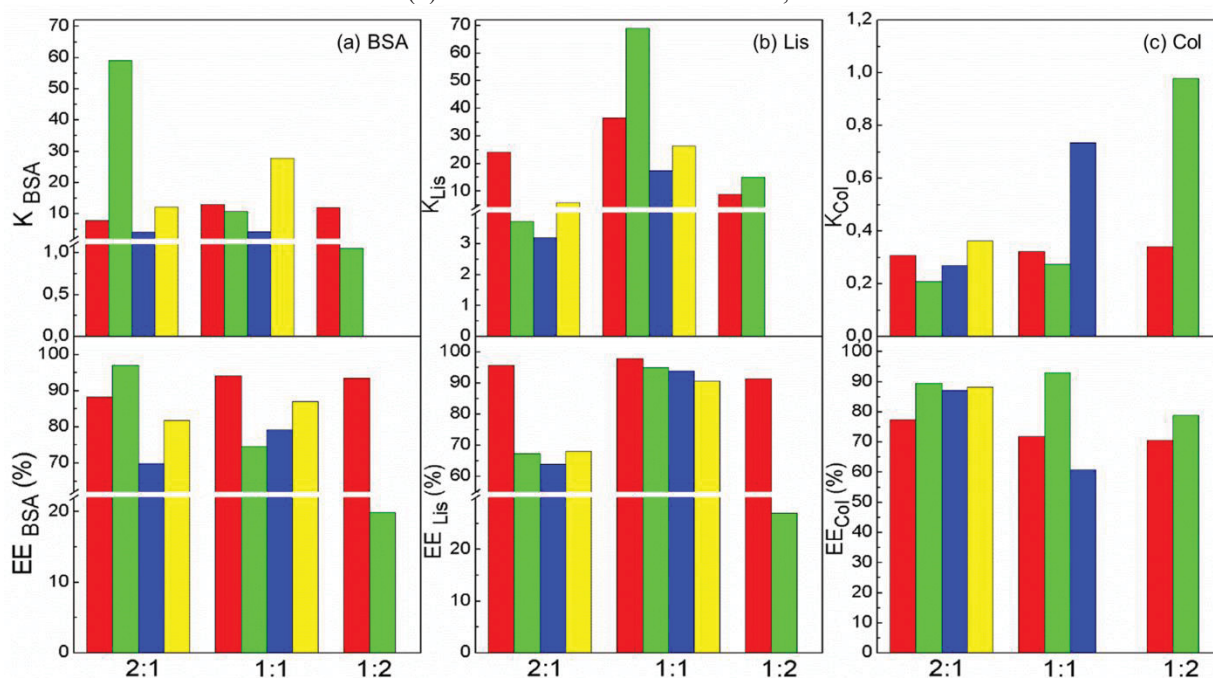
Sabendo que a determinação do diagrama de fases (curvas binodal e linhas de amarração) dos sistemas de duas fases aquosas serve como base para realizar a partição de biomoléculas e que nesta etapa do trabalho já é conhecida a composição e a concentração de cada uma das fases destes sistemas, estes foram utilizados para avaliar a capacidade desses sistemas em particionar as proteínas BSA, lisozima e colágeno hidrolisado.

Os ensaios de partição foram realizados como descrito na seção 4.2 nas mesmas composições globais das linhas de amarração determinadas.

A quantificação do teor proteico nas fases em equilíbrio foi realizada empregando-se o método de Bradford, o qual utiliza a BSA como proteína padrão. Para isso foi necessário a construção de uma curva padrão, na qual obteve-se um coeficiente R^2 de 0,99505 conforme mostrado na FIGURA B1 (APÊNDICE B).

Após a quantificação da concentração de proteína nas fases, o coeficiente de partição (K) e a eficiência de extração ($EE\%$) foram determinados através das equações (2) e (3), sendo os resultados apresentados na TABELA 10, assim como na FIGURA 21.

FIGURA 21 - COEFICIENTE DE PARTIÇÃO (K) E EFICIÊNCIA DA EXTRAÇÃO (EE) DA BSA, LISOZIMA E COLAGENO NOS SDFA FORMADOS POR UREIA (■), GLUCOSE (■), XILITOL (■) E SORBOSE (■) NAS RAZÕES MOLARES 2:1, 1:1 E 1:2.



FONTE: A autora (2018).

Os dados experimentais detalhados podem ser observados na TABELA 10.

TABELA 10 - DADOS EXPERIMENTAIS RELATIVOS À FIGURA 18, PARA O COEFICIENTE DE PARTIÇÃO (K) E EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO (EE %).

BSA						
	2:1		1:1		1:2	
	K	EE(%)	K	EE(%)	K	EE(%)
Ureia	7,90	88,26	13,00	94,05	11,92	93,56
Glucose	58,99	97,04	10,77	74,65	1,05	19,85
Xilitol	4,24	69,85	4,32	79,14	-	-
Sorbose	12,12	81,76	27,72	87,04	-	-
LISOZIMA						
	2:1		1:1		1:2	
	K	EE(%)	K	EE(%)	K	EE(%)
Ureia	24,09	95,82	36,71	97,81	8,87	91,54
Glucose	3,71	67,33	68,99	94,96	15,12	27,02
Xilitol	3,19	63,96	17,55	93,91	-	-
Sorbose	5,74	67,98	26,45	90,72	-	-
COLÁGENO						
	2:1		1:1		1:2	
	K	EE(%)	K	EE(%)	K	EE(%)
Ureia	0,31	77,34	0,32	71,80	0,34	70,60
Glucose	0,21	89,63	0,27	93,04	0,98	78,92
Xilitol	0,27	87,12	0,73	60,75	-	-
Sorbose	0,36	88,19	-	-	-	-

FONTE: A autora (2018)

Albumina de soro bovino

Na FIGURA 20a estão apresentados os dados de $EE(\%)$ e K para a partição da proteína BSA. Observa-se que todos os valores de coeficiente de partição foram maiores que um ($K > 1$), o que indica que a BSA apresenta partição preferencial pela fase de topo, ou seja, fase rica em cloreto de colina.

Com relação ao efeito das moléculas doadores de hidrogênio, o SDFA formado por glucose em razão molar 2:1 apresentou o maior valor de K ($K = 58,99$), onde a eficiência de extração apresentou o mesmo comportamento, *i.e.*, $EE = 97,04\%$.

Em contra partida o menor valor de K foi obtido no SDFA também formado por glucose porem na razão molar de 1:2 ($K = 1,05$), assim como o menor valor de eficiência de extração (19,85%). Como discutido anteriormente, apesar dos doadores de hidrogênio não influenciarem na formação das fases, observa-se que os sistemas com menor proporção de doador de hidrogênio apresentaram maior eficácia. Com exceção deste sistema, todos os outros apresentaram $EE \geq 70\%$.

Os SDFA formados por ureia foram utilizados de forma comparativa, uma vez que estes apresentam altos valores de $EE\%$ quando se trata de proteínas. Neste estudo os

SDFA compostos por ureia apresentaram os maiores valores para eficiência de extração (aproximadamente 92%). Assim como os dados obtidos por ZENG; WANG *et al.* (2014) os sistemas com ureia são os que apresentam maior eficiência de extração de proteínas.

Nos ensaios da BSA outra molécula que apresentou resultados relevantes, uma vez que é um composto pouco explorada para estudos em SDFA, foi a sorbose. O sistema com razão molar 1:1 formado por sorbose apresentou a maior capacidade de extração ($EE= 87,05\%$) em comparação aos outros açúcares, apresentando-se como um potencial formador de sistemas em processos de partição ou extração da BSA.

Lisozima

Na FIGURA 20b são apresentados os dados de coeficiente de partição e eficiência de extração para a lisozima. Para esta proteína observa-se também uma partição preferencial, em todos os sistemas, para a fase de topo ($K>1$). Os maiores valores de coeficiente de partição, bem como de eficiência de extração, foram obtidos nos sistemas em razão molar 1:1, sendo a maior $EE(\%)$ obtida no sistema formado por $[N_{111}(2OH)]Cl$: Glucose (94,96 %), valores próximos aos obtidos pelo sistema formado por ureia, o qual foi utilizado como comparativo, uma vez que é amplamente encontrado na literatura. O sistema em razão molar 1:2 apresentou a menor EE (27,02 %) ou seja, baixa de eficiência de extração da lisozima em sistemas com maior proporção de doador de hidrogênio na mistura. Esses dados são satisfatórios para o trabalho, pois, quando comparados aos sistemas formados por ureia, todos os DH utilizados em razão molar 1:1 podem ser utilizados com eficácia na partição dessa proteína.

Colágeno hidrolisado

Com relação a partição do colágeno pode-se observar que os valores de coeficiente de partição obtidos são menores que um ($K<1$), como representado na FIGURA 20c. Isto indica que o colágeno, ao contrário das outras proteínas avaliadas neste trabalho, apresenta maior afinidade pela fase rica em sal (fase de fundo). Como descrito por Da Silva e Penna (2012), o colágeno hidrolisado apresenta alta solubilidade em soluções salinas aquosas, o que justifica a partição preferencial pela fase de fundo.

A partição do colágeno hidrolisado apresentou maior *EE*(%) (93,04%) para o sistema $[N_{111(2OH)}]Cl:Glucose+K_2HPO_4+H_2O$ na razão 1:1, sendo superior a *EE* dos SDFA formados por ureia.

No ensaio de partição desta proteína em sistemas formados por sorbose na razão 1:2, não foi possível realizar a quantificação da proteína, devido a formação de precipitado no sistema.

Até o momento do início do desenvolvimento deste trabalho não haviam relatos na literatura sobre a avaliação da partição de colágeno em SDFA. A *EE* (%) do colágeno hidrolisado foi superior a 60% em todos SDFA avaliados, dado este que torna o estudo pertinente para possíveis aplicações dos SDFA nessa proteína, a qual é amplamente utilizada na indústria cosmética e farmacêutica. Portanto, muito embora as moléculas doadoras de hidrogênio não apresentem influência significativa no comportamento de fases dos SDFA, a partição das proteínas é afetada pelo DH. Desta forma, é possível que a seleção adequada do doador de hidrogênio promova um aumento da eficiência de extração da biomolécula de interesse. Essa característica confere aos sistemas de duas fases aquosas compostos por DES um caráter de *designer solvent*. Outro aspecto relevante quanto aos resultados obtidos refere-se à possibilidade de substituição da ureia, um componente com comprovado efeito desnaturante sobre as proteínas (AUTON; BOLEN, 2005; FONSECA *et al.*, 2006) , por componentes menos agressivos (biocompatíveis), neste caso, os açúcares.

4.5 AVALIAÇÃO DAS ESTRUTURAS DAS PROTEÍNAS SUBMETIDAS À SEPARAÇÃO EM SDFA

Para avaliar a integridade estrutural das proteínas após os ensaios de partição realizou-se análise de Dicroísmo Circular e Ressonância Magnética Nuclear.

4.5.1 Avaliação da estrutura das proteínas por Dicroísmo Circular (DC)

O dicroísmo circular é amplamente utilizado quando se deseja avaliar alterações sobre as estruturas secundárias, sendo possível, por meio desta técnica, também quantificar numericamente a porcentagem de cada tipo de estrutura secundária (α -hélice, β -folha, randômica) na estrutura da proteína.

A metodologia padrão para análise de DC consiste em avaliar a estrutura da proteína em uma solução tampão de fosfato. Neste estudo, as proteínas apresentavam-se em solução de SDFA, na qual além do fosfato de potássio, temos a presença das moléculas doadoras e receptora de hidrogênio. A elevada concentração destes compostos na solução, mesmo após realizar-se algumas diluições, faz com que estes sejam altamente absorvidos na análise. Os compostos se tornam interferentes e dificultam a quantificação do tipo de estrutura secundária nas proteínas. Por este motivo foi empregada a análise em caráter qualitativo, por meio da verificação visual dos espectros, bem como a comparação com os espectros característicos de cada proteína.

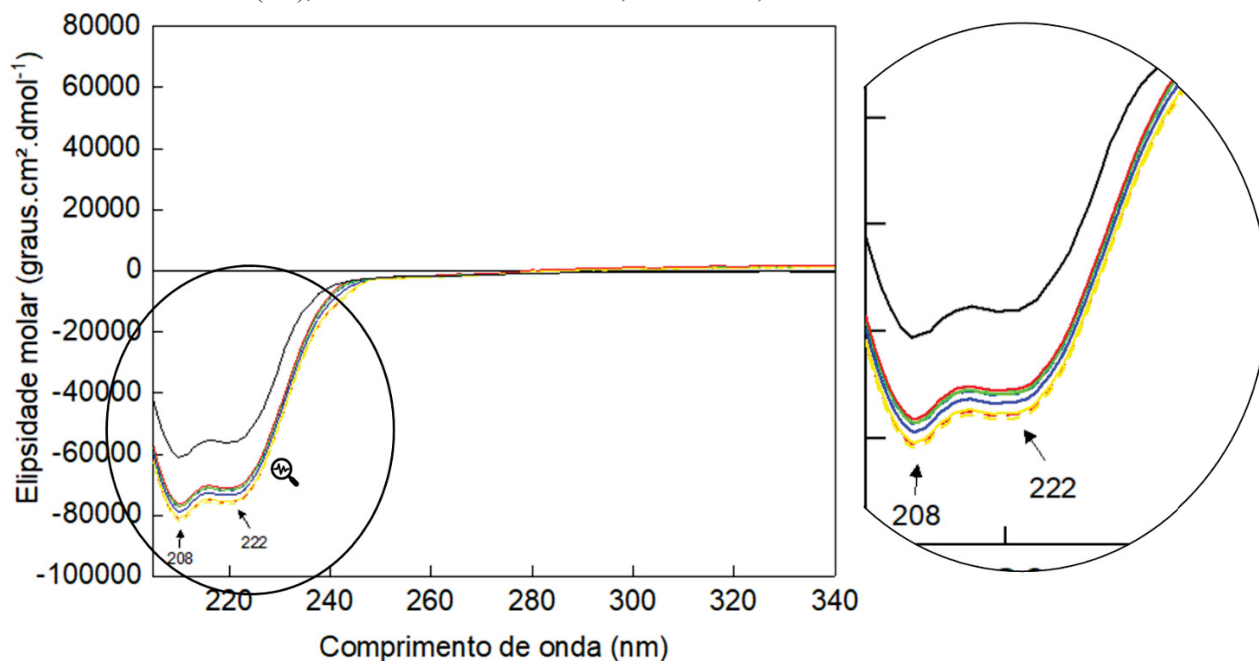
Para minimizar os efeitos dos interferentes, o branco utilizado na análise era composto da respectiva fase de cada SDFA sem a adição das proteínas.

Na seção anterior, quando foi descrita a quantificação das proteínas nas fases, observou-se que a BSA e a Lisozima particionaram-se preferencialmente na fase de topo, enquanto que o colágeno partionou para a fase de fundo, ou seja, nessas fases encontravam-se a maior concentração das respectivas proteínas. Devido a isso, a análise de DC, foi aplicada apenas nas fases com partições preferenciais para cada proteína.

Visto que não foi observado a separação de fases em dois dos três SDFA obtidos na razão molar 1:2, a partir desta etapa do trabalho optou-se por prosseguir com as amostras obtidas para os SDFA nas razões molares 2:1 e 1:1, nas quais obteve-se resultados para todos os sistemas.

De acordo com dados da literatura, o espectro de DC da BSA apresenta características da presença de estrutura α - helice. Na FIGURA 22 é apresentado os espectro de dicroísmo circular para a BSA nos SDFA.

FIGURA 22 - ESPECTRO DE DICROÍSMO CIRCULAR DA PROTEÍNA BSA NOS SDFA [N_{111(20H)}]CL: DH+ K₂HPO₄ + H₂O, ONDE AS LINHAS CONTÍNUAS (—) REPRESENTAM OS SISTEMAS EM RAZÃO MOLAR 2:1 E AS LINHAS PONTILHADAS SISTEMAS EM RAZÃO MOLAR (1:1), SENDO OS DH'S: UREIA, GLUCOSE, SORBOSE E XILITOL.



FONTE: A autora (2019).

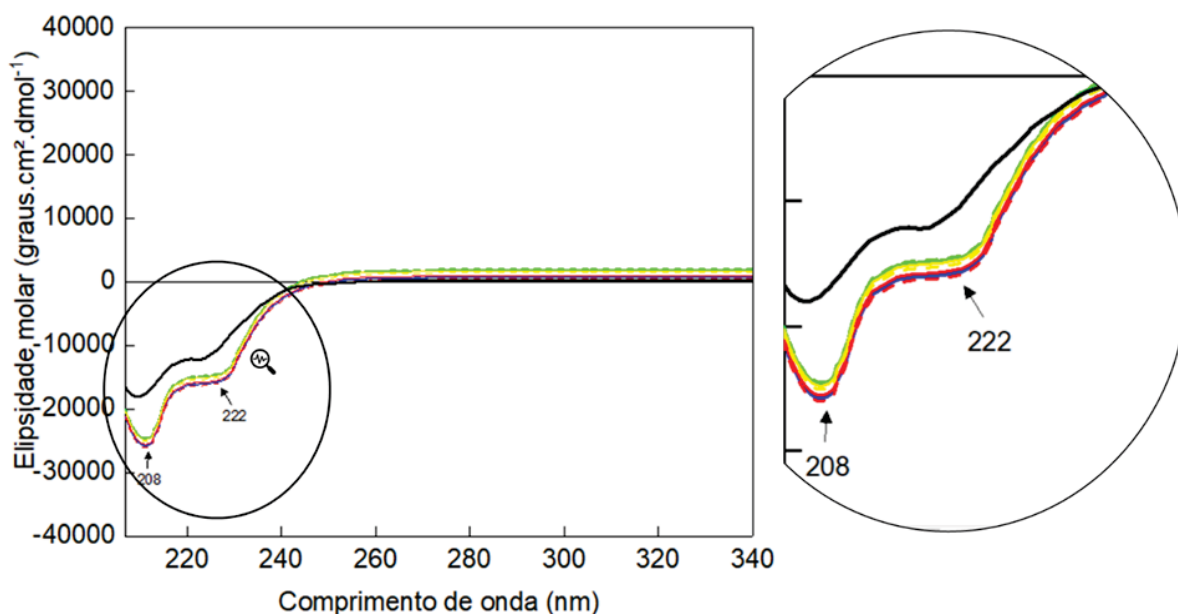
A linha contínua na cor preta representa o espectro obtido para a BSA em solução tampão, ou seja, proteína nativa. Observa-se que para todos os sistemas as curvas mantiveram as mesmas características. As curvas obtidas apresentam mínimos globais em 208 e 222 nm, padrão característico de uma proteína que apresenta estrutura secundária do tipo α -hélice. Esse comportamento é semelhante ao obtido por ITRI *et al.* (2004).

É possível notar que houve uma redução no valor de elipticidade molar nas amostras das fases dos SDFA com relação ao padrão. Isso foi atribuído à presença dos outros compostos dos sistemas os quais são altamente absorvidos, bem como as diferentes concentrações de proteína obtida em casa fase. Apesar disso, o comportamento das curvas não apresentam deslocamento dos picos, o que indicaria alterações na estrutura secundária da BSA.

Como já foi discutido anteriormente, não foi possível realizar a quantificação das estruturas da proteínas devido a presença dos interferentes. Entretanto, é possível concluir que o uso dos SDFA na partição das proteínas não provocou desnaturação ou alteração na estrutura da BSA, uma vez que todas as curvas mantiveram as características da unidade principal, *i.e.*, α -hélice.

Na FIGURA 23 é apresentado os espectro de de dicroísmo circular para a Lizosima em todos os SDFA.

FIGURA 23 - ESPECTRO DE DICROÍSMO CIRCULAR DA PROTEÍNA LISOZIMA NOS SDFA [N_{111(20H)}]CL: DH+ K₂HPO₄ + H₂O, ONDE AS LINHAS CONTÍNUAS (—) REPRESENTAM OS SISTEMAS EM RAZÃO MOLAR 2:1 E AS LINHAS PONTILHADAS SISTEMAS EM RAZÃO MOLAR (1:1), SENDO OS DH'S: UREIA, GLUCOSE, SORBOSE E XILITOL..



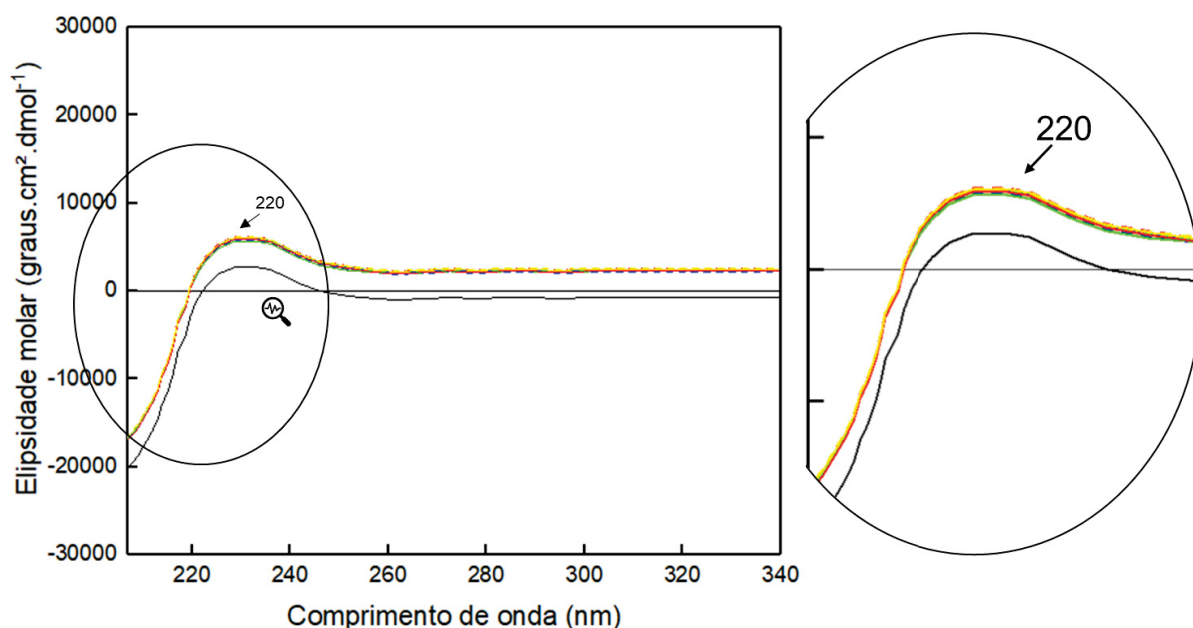
FONTE: A autora (2019).

As curvas obtidas para a análise da lisozima também apresentaram características de estrutura α -hélice, com mínimos globais em 208 e 222nm. Da mesma forma como ocorrido na análise da BSA, houve uma redução no valor da elipticidade molar para as amostras obtidas dos SDFA devido a concentração da proteína e a absorção dos outros componentes do sistema.

Observa-se que, assim com no caso da BSA, a Lisozima manteve suas características mesmo após os ensaios de partição, uma vez que todas elas apresentaram o mesmo perfil, quando comparado a curva da proteína em solução tampão.

Por fim, na FIGURA 24 é apresentado os espectros de dicroísmo circular para o colágeno hidrolisado em todos os sistemas. Observa-se a presença de estruturas com características randômicas com um pico de elipticidade em 220 nm e a tendência do espectro indica a existência de um mínimo global em 195 nm. É possível observar as mesmas características para a curva obtida da proteína antes dos ensaios de partição, indicando que não houve alteração na estrutura proteica.

FIGURA 24 - ESPECTRO DE DICROÍSMO CIRCULAR DA PROTEÍNA COLÁGENO HIDROLISADO NOS SDFA $[N_{111(20H)}]CL$: $DH + K_2HPO_4 + H_2O$, ONDE AS LINHAS CONTÍNUAS (—) REPRESENTAM OS SISTEMAS EM RAZÃO MOLAR 2:1 E AS LINHAS PONTILHADAS (---) SISTEMAS EM RAZÃO MOLAR (1:1), SENDO OS DH'S: UREIA, GLUCOSE, SORBOSE E XILITOL.



FONTE: A autora (2019).

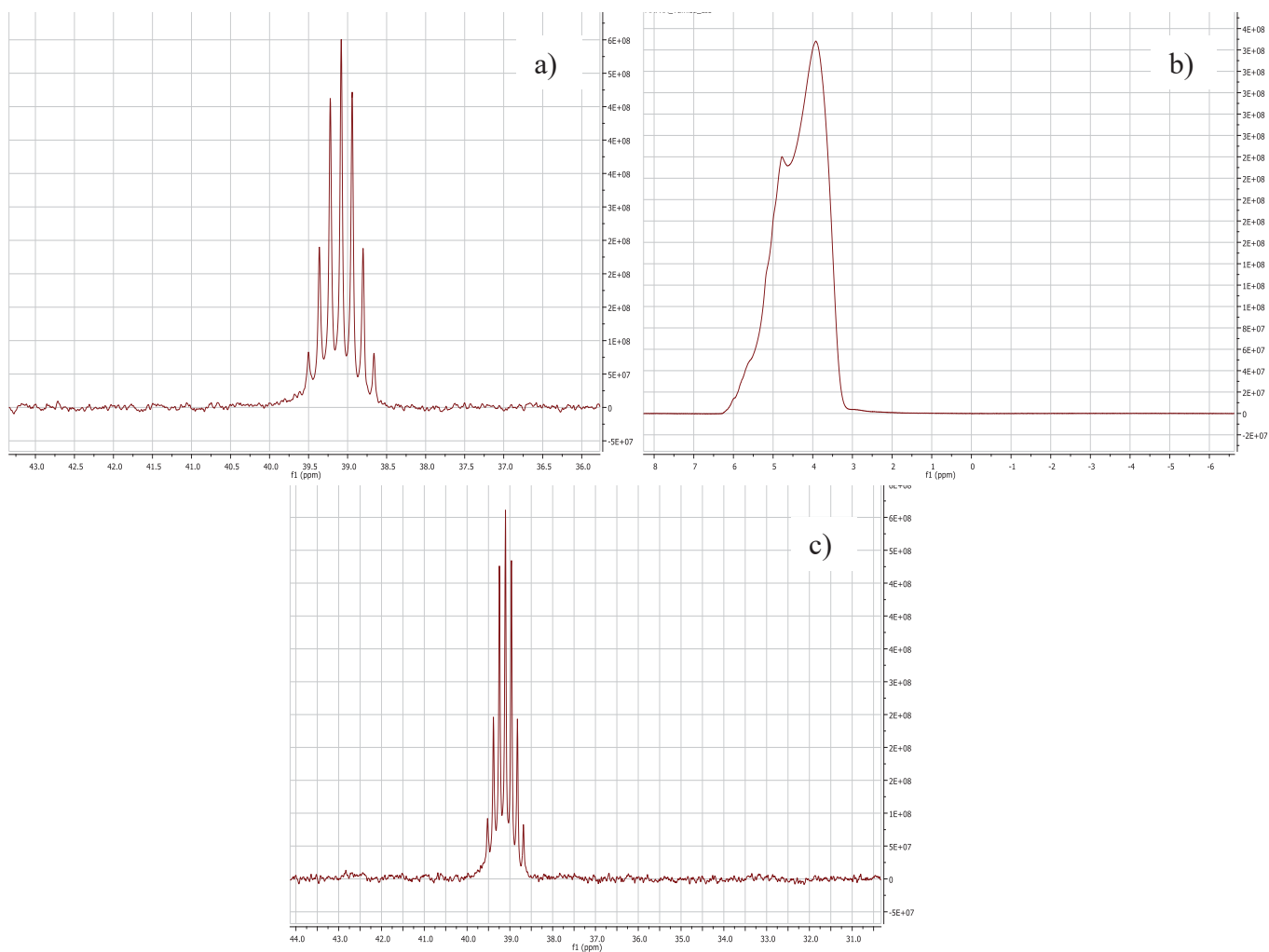
Como notado nas FIGURAS 22, 23 e 24 os sistemas formados por $[N_{111(20H)}]CL$:Ureia também foram avaliados pela técnica de dicroísmo circular. Mesmo a ureia sendo considerado um agente com poder desnaturante, nas concentrações estudadas, esta não afetou a estrutura secundária das proteínas.

Em todas as análises de dicroísmo circular observou-se que os componentes dos SDFA são altamente absorvidos, uma vez que são constituídos de alta concentração de sal quando comparados a uma solução tampão. Isso impede o cálculo do teor do tipo de estrutura secundária presente nas amostras. Com isso, torna-se necessário que trabalhos futuros avaliem os parâmetros envolvidos no preparo da amostra. A diálise das amostras a fim de promover a redução do teor de sal é uma das alterações que devem ser testadas. Apesar da técnica de dicroísmo circular ser amplamente utilizada para análise de estabilidade da estrutura proteica, o uso de outras análises que se adequem a composição dos SDFA para verificar a estrutura das proteínas faz-se necessário. Nesse contexto, o emprego da técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foi avaliada neste trabalho, sendo apresentada na sequência.

4.5.2 Avaliação de estrutura das proteínas por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A técnica de RMN é amplamente utilizada em estudos sobre a estrutura de proteínas. Inicialmente foi realizado o ensaio das proteínas em solução aquosa para que fosse possível proceder a análise comparativa com as biomoléculas após os ensaios de partição. Também foram analisadas as fases sem a presença da biomolécula, para conhecer o comportamento dos compostos que constituíam os sistemas no espectro de ressonância magnética nuclear.

FIGURA 25 - ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNETICA NUCLEAR DAS PROTEÍNAS EM SOLUÇÃO AQUOSA a) BSA; b) LISOZIMA E c) COLÁGENO HIDROLISADO.



FONTE: A autora (2019).

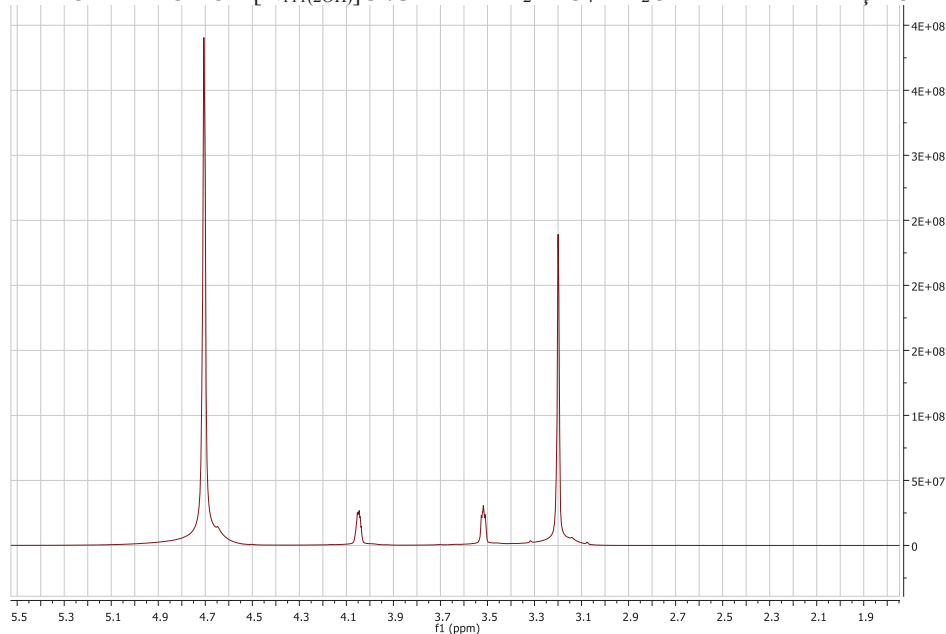
Nas FIGURAS 25a,b,c têm-se os espectros da BSA, Lisozima e do Colágeno hidrolisado respectivamente em solução aquosa, realizados para avaliar o comportamento das biomoléculas antes dos ensaios de partição.

Após os ensaios de partição todas as fases foram separadas e preparadas como descrito anteriormente. Entretanto, observou-se nas amostras preparadas a formação de um precipitado o que não permitiu a realização na análise.

Como tentativa de eliminar a formação do precipitado aumentou-se o nível de diluição das amostras, no entanto, após decorrer certo período a formação de precipitado foi novamente observada.

Foi detectado que alguns compostos formadores dos S DFA utilizados não eram solúveis no solvente deuterado, isso ocasionava a formação de precipitado com o decorrer do tempo. Visto que o DMSO é utilizado para se obter espectros de alta qualidade, uma vez que detecta sinais de hidrogênio “ativo” como grupos OH, -NH, -NH₂ e -SH, uma adaptação na metodologia foi realizada. O DMSO foi adicionado em um tubo capilar o qual foi acondicionado dentro do tubo de RMN para só então adicionar a amostra. O objetivo desse arranjo era evitar o contato direto das amostras (S DFA + proteína) com o DMSO. Com essa adaptação não houve formação de precipitado. Entretanto, a alta concentração dos compostos que formam os S DFA, impediu a real detecção da proteína, a qual encontrava-se em baixas concentrações (FIGURA 26).

FIGURA 26 - ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DA FASE DE TOPO DO SISTEMA FORMADO POR [N₁₁₁(2OH)]Cl:UREIA + K₂HPO₄ + H₂O PARA A PARTIÇÃO DA BSA.



FONTE: A autora (2019).

Após todos os ensaios, verificou-se que para tornar possível a quantificação por RMN seria necessário realizar a diálise das amostras, para reduzir ou retirar os componentes formadores do sistema, ou o mapeamento da proteína e então verificar a possibilidade de aplicação da análise nesse tipo de sistema.

Assim como para a análise de dicroísmo circular, para realizar os ensaios de RMN de amostras em SDFA é necessário um estudo aprofundado da técnica, para adaptá-la as composições dos sistemas de duas fases aquosas. Apesar de não ser possível comprovar, através dos dados experimentais obtidos pelas técnicas de DC e RMN, que as proteínas não foram afetadas pela presença dos SDFA, o contrário também não pode ser afirmado, já que qualitativamente pela técnica de DC não houve alteração na estrutura secundária das proteínas avaliadas. Desta forma, os sistemas quaternários de duas fases aquosas formados por açúcares como molécula doadora de hidrogênio podem, a princípio, ser aplicados para partição de proteínas. Entretanto, o faz-se necessário estudo de novas técnicas e metodologias que não sofram influência dos componentes do SDFA e que possibilitem esta verificação estrutural das proteínas.

5 CONCLUSÃO

Na primeira parte do trabalho através da avaliação do comportamento de fases, ou seja, determinação de curvas binodais e linhas de amarração é possível observar que as moléculas RH e DH utilizadas atuaram como reguladoras das propriedades das fases dos S DFA.

A análise Termogravimétrica (TGA) apresentou-se eficaz com precisão na determinação da composição das fases dos sistemas, pelas quais foi possível observar a partição não estequiométrica dos constituintes dos DES, corroborando o caráter quaternários desses sistemas.

A presença das moléculas doadoras de hidrogênio, glucose, xilitol e sorbose assim como a ureia não apresentaram efeito no comportamento de fases, no entanto, estas devem ser adicionadas de maneira específica a cada soluto a ser avaliado, uma vez que eles apresentaram influência na etapa de partição das biomoléculas.

O Xilitol e a Sorbose apresentados como moléculas doadoras de hidrogênio e aplicados na formação de S DFA pela primeira vez neste estudo, apresentaram potencial capacidade na formação dos sistemas e na partição de biomoléculas, quando comparados a ureia, molécula amplamente utilizada nesta área de pesquisa.

Na etapa de aplicação dos S DFA na separação das proteínas, observou-se altos valores de eficiência. Foi observado, por exemplo, eficiência de 97,04% para o S DFA formado por glucose em razão molar 2:1 na partição da BSA e de 93,91% para o S DFA desenvolvido com xilitol em razão molar 1:1 na partição da lisozima.

Verificou-se nos ensaios de partição que as proteínas BSA e Lisozima apresentaram partição preferencial pela fase de topo rica em cloreto de colina, enquanto o colágeno hidrolisado particionou-se preferencialmente pela fase de fundo, rica em sal. Com isso, conhecendo-se o comportamento individual das biomoléculas, torna-se possível estudos de partição simultânea de proteínas, ou seja, particionar duas ou mais biomoléculas em um mesmo sistema.

Na etapa final do trabalho foram avaliados os possíveis efeitos da separação em S DFA sobre a estrutura das proteínas. Em uma primeira análise estes sistemas se mostraram inóxios as proteínas, uma vez que não se observou alteração na estrutura proteica por meio da análise de dicroísmo circular. O uso da técnica de ressonância magnética nuclear para avaliar a estrutura dessas proteínas foi também avaliado.

Entretanto, a presença dos constituintes dos SDFAs nas amostras, comprometeu a confiabilidade desses resultados.

Para melhor entendimento destes sistemas são necessários estudos futuros adaptando as técnicas de identificação e quantificação das estruturas das proteínas para sistemas de duas fases aquosas, tais como promover a dialise prévia das amostras a fim de eliminar os contaminantes. Também se faz necessário avaliar o efeito da temperatura, concentração e outras variáveis, a fim de conhecer o comportamento dos SDFAs e das biomoléculas de interesse.

Com estes dados, fica evidente o potencial do emprego dos SDFAs na etapa de separação de proteínas, bem como dos constituintes dos DES, os quais têm sido amplamente empregados na etapa de extração de compostos bioativos de matrizes diversas.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, A. P.; BOOTHBY, D.; CAPPER, G.; DAVIES, D.L.; RASHEED, R.K. Deep Eutectic Solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: Versatile alternatives to ionic liquids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 29, p. 9142–9147, 2004.
- ABBOTT, A. P.; CAPPER, G.; DAVIES, D.L.; RASHEED, R.K.; TAMBYRAJAH, V. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. **Chemical Communications (Cambridge, England)**, n. 1, p. 70–71, 2003.
- ALBERTSSON, P. Å. A. Erratum: Partition of proteins in liquid polymer-polymer two phase systems (Nature (1958) 182, 4640). **Nature**, v. 182, n. 4640, p. 918, 1958.
- ALBERTSSON, P. A. A. Partition of cell particles and macromolecules. 3rd Edition, John Wiley, New York, 1986.
- ANANTHAPADMANABHAN, K. P.; GODDARD, E. D. Aqueous Biphasic Formation in Polyethylene Oxide-Inorganic Salt Systems. **Langmuir**, v. 3, n. 1, p. 25–31, 1987.
- ANTUNES, A.J. Funcionalidade de proteínas do soro de leite bovino. Barueri: Manole, 135 p, 2003.
- AMBROSIO, A. L. B.; FRANCHINI, K. G. Cristalografia macromolecular: a biologia sob a ótica dos raios X. **Ciência e Cultura**, v. 69, n. 3, p. 29-39, 2017.
- ASENJO, J. A.; ANDREWS, B. A. Aqueous two-phase systems for protein separation: A perspective. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 49, p. 8826–8835, 2011.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY - AOAC. Official methods for analysis. 14.ed. Arlington: 1108p, 1984.
- AUTON, M.; BOLEN, D. W. Predicting the energetics of osmolyte-induced protein folding/unfolding. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, PNAS, v. 102, n. 42, p. 15065-15068, 2005.
- BENAVIDES, J.; RITO-PALOMARES, M.; ASENJO, J. A. *Aqueous Two-Phase Systems*. **Comprehensive Biotechnology**, p. 697–713, 2011.
- BENI, D.; BENCINI, A. Developing ROS Scavenging Agents for Pharmacological Purposes: Recent Advances in Design of Manganese-Based Complexes with Anti-Inflammatory and Anti-Nociceptive Activity. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 26, p. 4431, 2012
- BI, W.; TIAN, M; ROW, K. H. Evaluation of alcohol-based deep eutectic solvent in extraction and determination of flavonoids with response surface methodology optimization. **Journal of Chromatography A**, v. 1285, p. 22–30, 2013.
- CACACE, M G; LANDAU, E M; RAMSDEN, J J. The Hofmeister series: salt and solvent effects on interfacial phenomena. **Quarterly Reviews of Biophysics**, v. 30, n. 3, p. 241–277, 1997.

CAPOBIANGO, M.; VIERIA, C. R.; SANTIAGO E SILVA, A. L.; COELHO, J. V.; SEGALL, S. D.; SILVESTRE, M. P. C. Extração Química e Enzimática das proteínas do fubá de milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n.4, p. 884-890, 2006.

CARREIRA, R. L.; ORNELLAS, C. B. D.; MORAIS, H. A.; MOTTA, S.; SILVESTRE, M. P. C. Influence of precipitation and ultrafiltration on the peptide profile of casein hydrolysates. **Ciênc. agrotec.**, v. 27, n.2, p.414-421, 2003

CLARK, J. H.; TAVENER, S. J. Alternative Solvents: Shades of Green. **Organic Process Research & Development**, v.11, p. 149–155, 2007

DA SILVA, Luís H. M.; LOH, Watson. Calorimetric Investigation of the Formation of Aqueous Two-Phase Systems in Ternary Mixtures of Water, Poly(ethylene oxide) and Electrolytes (Or Dextran). **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 104, n. 43, p. 10069–10073, 2000.

DA SILVA, T. F; PENNA, A. L. B. Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 3, p. 530–539, 2012.

DAI, Y.; WITKAMP, G.J.; VERPOORTE, R.; CHOI, Y.H. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. **Analytica Chimica Acta**, v. 766, p. 61–68, 2013.

DAI, Y.; VERPOORTE, R.; CHOI, Y. Natural deep eutectic solvents providing enhanced stability of natural colorants from safflower (*Carthamus tinctorius*). **Food Chemistry**, v. 159, p. 116–121, 2014.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4. ed., Porto Alegre: Artmed, 900p, 2010.

DONG, L.; WAN, J.; CAO, X.. Separation of transglutaminase using aqueous two-phase systems composed of two pH-response polymers. **Journal of Chromatography A**, 2018.

FARIAS, F. O.; PASSOS, H.; LIMA, Á. S.; MAFRA, M.R.; COUTINHO, J.A.P. Is It Possible to Create Ternary-like Aqueous Biphasic Systems with Deep Eutectic Solvents? **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 5, n. 10, p. 9402–9411, 2017.

FARIAS, F. O.; SOSA, F. H. B.; IGARASHI-MAFRA, L.; COUTINHO, J.A.P.; MAFRA, M.R. Study of the pseudo-ternary aqueous two-phase systems of deep eutectic solvent (choline chloride:sugars) + K₂HPO₄ + water. **Fluid Phase Equilibria**, v. 448, p. 143–151, 2017.

FLEMING, A. Penicillin, Nobel Lecture, p. 83-93, 1945.

FONSECA, L.C.; CORRÊA, N. C. R.;GARROTE-FILHO, M. S.; CUNHA, C. C.; PENHA-SILVA, N. Effects of the solvent composition on the stability of proteins in aqueous solutions. Revisão. **Química Nova**, v.29, n. 3, p. 543-548, 2006.

FORATO, L. A.; BRITTO, D.; SCRAMIN, J. A.; COLNAGO, L. A.; ASSIS, O. B. G. Mechanical and Wetting Properties of Zein Films Extracted From Corn Gluten Meal. Embrapa Instrumentação. **Polímeros**, 2012.

FOREMAN, M.R.S.J.; HOLGERSSON, S.; McPHEE, C., TYUMENTSEV, M.S. Activity coefficients in deep eutectic solvent: Implications for the solvent extraction of metals. **New Journal of Chemistry**, v. 42, p. 2006–2012, 2018.

FRANCISCO, M.; VAN DEN BRUINHORST, A.; KROON, M. C. Low-transition-temperature mixtures (LTTMs): A new generation of designer solvents. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 52, n. 11, p. 3074–3085, 2013.

FREIRE, M. G.; CLÁUDIO, A. F. M.; ARAÚJO, J. M. M.; COUTINHO, J. A. P.; MARRUCHO, I. M.; LOPES, J. N. C.; REBELO, L. P. N. Aqueous biphasic systems: A boost brought about by using ionic liquids. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 14, p. 4966–4995, 2012.

GARCÍA, A.; RODRÍGUEZ-JUAN, E.; RODRÍGUEZ-GUTIÉRREZ, G.; RIOS, J. J.; FERNÁNDEZ-BOLAÑOS. Extraction of phenolic compounds from virgin olive oil by deep eutectic solvents (DESSs). **Food Chemistry**, v. 197, p. 554–561, 2016.

GARCIA, G.; APARICIO, S.; ULLAH, R.; ATILHAN, M. Deep eutectic solvents: Physicochemical properties and gas separation applications. **Energy and Fuels**, v. 29, n. 4, p. 2616–2644, 2015.

GÓMEZ-GUILLÉN, M.C.; GIMÉNEZ, B.; LÓPEZ-CABALLERO, M.E.; MONTERO, M.P. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. **Food Hydrocolloids**, v.25, n. 8, p. 1813-27, 2011.

GORE, S.; BASKARAN, S.; KOENIG, B. Efficient synthesis of 3,4-dihydropyrimidin-2-ones in low melting tartaric acid–urea mixtures. **Green Chemistry**, v. 13, n. 4, p. 1009, 2011.

GORKE, J. T.; SRIENC, F.; KAZLAUSKAS, R. J. Hydrolase-catalyzed biotransformations in deep eutectic solvents. **Chemical Communications**, n. 10, p. 1235, 2008.

GRAF, N., LIPPARD, S.J. Redox activation of metal-based prodrugs as a strategy for drug delivery. **Advanced Drug Delivery Review**, v. 64, n.11, p. 993-1104, 2012.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2876–2890, 2007.

GRILO, A. L.; AIRES-BARROS, M. R.; AZEVEDO, A. M. Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems: Fundamentals, Applications and Trends. **Separation and Purification Reviews**, v. 45, n. 1, p. 68–80, 2016.

HAJDUCH, M.; RAKWAL, R.; AGRAWAL, G.K.; YONEKURA, M.; PRETOVA, A. High-resolution two-dimensional electrophoresis separation of proteins from metal-stressed rice (*Oryza sativa* L.) leaves: Drastic reductions/fragmentation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and induction of stress-related proteins. **Electrophoresis**, v. 22, n. 13, p. 2824–2831, 2001.

HARANO, Y.; KINOSHITA, M. On the physics of pressure denaturation of proteins. **Journal of Physics Condensed Matter**, v. 18, n. 7, 2006.

HATTI-KAUL, R. Aqueous Two-Phase Systems. **Mol. Biotechnol.**, v. 19, n. 3, p. 697–713, 2001.

HAWKINS, I.; HANDY, S. T. Synthesis of aurones under neutral conditions using a deep eutectic solvent. **Tetrahedron**, v. 69, n. 44, p. 9200–9204, 2013.

HERBERHOLD, H.; ROYER, Catherine A.; WINTER, Roland. Effects of Chaotropic and Kosmotropic Cosolvents on the Pressure-Induced Unfolding and Denaturation of Proteins: An FT-IR Study on Staphylococcal Nuclease. **Biochemistry**, v. 43, n. 12, p. 3336–3345, 2004.

HOFMEISTER, F. F. Zur Lehre von der Wirkung der Salze. **Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie**, v. 25, n. 1, p. 1–30, 1888.

HUA, Y.; CHUI, S.W.; WANG, O. Gelling property of soy protein–gum mixtures. **Food Hydrocolloids**, v.17, p.889-894, 2004.

HUDDLESTON, J.; VEIDE, A; KÖHLER, K.; FLANAGAN, J.; ENFORS, S. O.; LYDDIATT, A. The molecular basis of partitioning in aqueous two-phase systems. **Trends in biotechnology**, v. 9, n. 11, p. 381–388, 1991.

HUDDLESTON, J. G.; WILLAUER, H. D.; ROGERS, R. D. Phase Diagram Data for Several PEG + Salt Aqueous Biphasic Systems at 25 ° C. p. 1230–1236, 2003.

IAL. Instituto Adolfo Lutz. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos de composição de alimentos. 3. ed. São Paulo, v.1, 1985.

IMPERATO, G.; EIBLER, E.; NIEDERMAIER, J.; KONIG, B. Low-melting sugar–urea–salt mixtures as solvents for Diels–Alder reactions. **Chem. Commun.**, n. 9, p. 1170–1172, 2005.

ITRI, R.; CAETANO, W.; BARBOSA, L. R. S.; BAPTISTA, M. S. Effect of urea on bovine serum albumin in aqueous and reverse micelle environments investigated by small angle X-ray scattering, fluorescence and circular dichroism. **Brazilian Journal of Physics**, v. 34, n. 1, p. 58-63, 2004.

JEONG, K.M.; LEE, M.S.; NAM, M.W.; ZHAO, J.; JIN, Y.; LEE, D-K.; KWON, S.W.; JEONG, J.H.; LEE, J. Tailoring and recycling of deep eutectic solvents as sustainable and efficient extraction media. **Journal of Chromatography A**, v. 1424, p. 10–17, 2015.

JESSOP, P. G. Searching for green solvents. **Green Chemistry**, v. 13, n. 6, p. 1391, 2011.

KAUL, A. The Phase Diagram. In: R, H.-K. (Ed.). **Aqueous Two-Phase Systems: Methods and Protocols**. Totowa, NJ: Humana Press Inc., v. 11p. 11–21, 2000.

KELLY, S.M; JESS, T.J; PRICE, N.C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1751, n. 2, p. 119–139, 2005.

KRISSANSEN, G.W. Emerging health properties of whey proteins and their clinical implications. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 26, n. 6, p. 713– 723, 2007.

- LAMBERT, J. B.; MAZZOLA, E. P. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: An Introduction to Principles, Applications, and Experimental Methods. **Pearson Professional**, 368p, 2003.
- LI, N.; WANG, Y.; XU, K.; HUANG, Y.; WEN, Q.; DING, X. Development of green betaine-based deep eutectic solvent aqueous two-phase system for the extraction of protein. **Talanta**, v. 152, p. 23–32, 2016.
- LO NOSTRO, P.; NINHAM, B. W. Hofmeister Phenomena: An Update on Ion Specificity in Biology. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 4, p. 2286–2322, 2012.
- LU, Y.; HAO, T.; HU, S.; HAN, J.; TAN, Z.; YAN, Y. Measurement and correlation of phase diagram data for acetone and sulfate aqueous two-phase systems at different temperatures. **Thermochimica Acta**, v. 568, p. 209–217, 2013.
- MARTÍNEZ-ARAGÓN, M.; BURGHOFF, S.; GOETHEER, E. L. V.; DE HAAN, A. B. Guidelines for solvent selection for carrier mediated extraction of proteins. **Separation and Purification Technology**, v. 65, n. 1, p. 65–72, 2009.
- MARTINS, M. A. R.; PINHO, S. P.; COUTINHO, J. A. P. Insights into the Nature of Eutectic and Deep Eutectic Mixtures. **Journal of Solution Chemistry**, n. 0123456789, 2018.
- MATTHEWS.; HOLDE, V. McGraw-Hill-Interamericana de España, S.A.U. Secuenciación de ácidos Nucleicos: Método de Maxam-Gilbert. *Bioquímica 2ª ed.*, 1998.
- MCKEON, K. D.; Albumin Adsorption: Inferences of Protein Interactions Measured by Sedimentation both Between Species and Induced by Denaturing. v. 45, p. 17, 2010.
- MERCHUK, J. C.; ANDREWS, B. A.; ASENJO, J. A. Aqueous two-phase systems for protein separation studies on phase inversion. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v. 711, n. 1–2, p. 285–293, 1998.
- MONDAL, D.; MAHTO, A.; VEERABABU, P.; BHATT, J.; PRASAD, K.; NATARAJ, S. K. Deep eutectic solvents as a new class of draw agent to enrich low abundance DNA and proteins using forward osmosis. **RSC Advances**, v. 5, n. 109, p. 89539–89544, 2015.
- MOREIRA, M. B.; FRANCISCATO, D. S.; TOLEDO, K. C. F.; SOUZA, J. R. B. S.; NAKATANI, H. S.; SOUZA, V. R. Investigation of the fluorescence quenching of bovine and human serum albumin by ruthenium complex. **Química Nova**, v. 15, p. 1-6, 2014
- MURAKAMI, L. M. Z.; RULLER, R. Uso da técnica de dicroísmo circular para avaliação de proteínas com aplicações biotecnológica. Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, 2016.
- NICOLETI, J.F.; TELIS, V. R. N. Viscoelastic and thermal properties of collagen–xanthan gum and collagen–maltodextrin suspensions during heating and cooling. *Food Biophysics*, v.4, n.3, p. 135-146, 2009.
- PANG, J.; SHA, X.; CHAO, Y.; CHEN, G.; HAN, C.; ZHU, W.; LI, H.; ZHANG, Q. Green aqueous biphasic systems containing deep eutectic solvents and sodium salts for the extraction of protein. **RSC Adv**, v. 7, n. 78, p. 49361–49367, 2017.

- PASSOS, H.; TAVARES, D. J. P.; FERREIRA, A. M.; FREIRE, M. G.; COUTINHO, J.A. P. Are Aqueous Biphasic Systems Composed of Deep Eutectic Solvents Ternary or Quaternary Systems? **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 4, n. 5, p. 2881–2886, 2016.
- QASBA, P. K.; KUMAR, S. Molecular divergence of lysozymes and α -lactalbumin. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, n. 4, p. 255–306, 1997.
- QUENTAL, M. V.; CABAN, M.; PEREIRA, M. M.; STEPNOWSKI, P.; COUTINHO, J. A. P.; FREIRE, M. G. Enhanced extraction of proteins using cholinium-based ionic liquids as phase-forming components of aqueous biphasic systems. **Biotechnology Journal**, v. 10, n. 9, p. 1457–1466, 2015.
- QUIROGA, A.L.B. Dossiê de Proteínas, **Food Ingredients Brasil**, n. 28, p. 46, 2014.
- RADOŠEVIĆ, K.; CVJETKO BUBALO, M.; GAURINA SRČEK, V.; GRGAS, D.; LANDEKA DRAGIČEVIĆ, T.; RADOJČIĆ REDOVNIKOVIĆ, I. Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 112, p. 46–53, 2015.
- ROGERS, R. D.; BOND, A H.; BAUER, C. B.; ZHANG, J.; GRIFFIN, S. T. Metal ion separations in polyethylene glycol-based aqueous biphasic systems: Correlation of partitioning behavior with available thermodynamic hydration data. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v. 680, n. 1–2, p. 221–229, 1996.
- SAMPAIO, D. DE A.; SOSA, F. H. B. S.; MARTINS, A. D.; MAFRA, L. I.; YAMAMOTO, C. I.; DE SOUZA, M. O.; DE CASTILHOS, F.; MAFRA, M. R. Assessment of Sodium Salt Anions (SO₂-4 and NO-3) Influence on Caffeine Partitioning in Polyethylene Glycol and 1-Butyl-3-Methylimidazolium Tetrafluoroborate Based ATPS. **Journal of Solution Chemistry**, v. 45, p. 1857–1878, 2016.
- SANGLARD, M. G.; FARIAS, F. O.; SOSA, F. H. B.; SANTOS, T. P. M.; IGARASHI MAFRA, L.; MAFRA, M. R. Measurement and correlation of aqueous biphasic systems composed of alcohol (1-propanol/2-propanol/tert-butanol) + (NH₄)₂SO₄ + H₂O at 298 K and a textile dye partition. **Fluid Phase Equilibria**, v. 466, p. 7–13, 2018.
- SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T.C. Spectrometric Identification of Organic Compounds. 7th ed., John Wiley & Sons Inc., USA, p. 95-98, 1981.
- SIMÕES, R.; BEIRA, J.; MALCATA, R. Estrutura da Lisozima. *Metabolismo e Endocrinologia*, 2006.
- SIMONET, F.; GARNIER, C.; DOUBLIER, J. L. Partition of proteins in the aqueous guar/dextran two phase system. *Food Hydrocolloids*, v. 16, n. 6, p. 591-600, 2000.
- SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5^a edição. Porto Alegre: Bookman, 2002.
- SMITH, E. L.; ABBOTT, A. P.; RYDER, K. S. Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 21, p. 11060–11082, 2014.

SOUZA, S. M. A.; SOBRAL, P. J. A.; MENEGALLI, F. C. Extraction of bovine meat myofibrillar proteins for elaboration edible films. **Food Science and Technology**, v. 24, n. 4, p. 619-626, 2004.

SREERAMA, N.; WOODY, R. W. Computation and Analysis of Protein Circular Dichroism Spectra. **Methods in Enzymology**, v. 383, n. 1, p. 318–351, 2004.

SVENSSON, P.; SCHRODER, W.; AKERLUND, H-E.; ALBERTSSON, P-A. Fractionation of thylakoid membrane components by extraction in aqueous polymer two-phase systems containing detergent. **Journal of Chromatography A**, v. 323, n. 2, p. 363–372, 1985.

TIEKINK, E. R.; Metallotherapeutic drugs and metal-based diagnostic agents – the use of metals in medicine; Tiekink, E. R.; Gielen, M., eds.; John Wiley & Sons: Hoboken, 2005.

UNSAI, E, IRMAK, T.; DURUSOY, E.; TUNCEL, M.; TUNCEL, A.. Monodisperse porous polymer particles with polyionic ligands for ion exchange separation of proteins. **Analytica Chimica Acta**, v. 570, n. 2, p. 240–248, 2006.

VAJPAL, N.; NISIUS, L.; WIKTOR, M.; GRZESIEK, S. High-pressure NMR reveals close similarity between cold and alcohol protein denaturation in ubiquitin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 5, p. E368–E376, 2013.

WALRAND, S.; CHIOTELLI, E.; NOIRT, F.; MWEWA, S.; LASSEL, T. Consumption of a functional fermented milk containing collagen hydrolysate improves the concentration of collagen-specific amino acids in plasma. **Journal Agricultural Food Chemistry**. v. 56, n. 16, p. 5, 2008.

WANG, S.; PENG, X.; ZHONG, L.; JING, S.; CAO, X. Choline chloride/urea as an effective plasticizer for production of cellulose films. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 133-139, 2015.

WANG, T.; XU, W. J.; WANG, S. X.; KOU, P.; WANG, P.; WANG, X. Q.; FU, Y. J. Integrated and sustainable separation of chlorogenic acid from blueberry leaves by deep eutectic solvents coupled with aqueous two-phase system. **Food and Bioprocess Processing**, v. 105, p. 205–214, 2017.

WOLF, K. L.; SOBRAL, P. J. A.; TELIS, V. R. N. Physicochemical characterization of collagen fibers and collagen powder for self-composite film production. **Food Hydrocolloids**, v.23, n, 7, p. 1886-1894, 2009.

WOLSCHIN, F.; WIENKOOP, S.; WECKWERTH, W. Enrichment of phosphorylated proteins and peptides from complex mixtures using metal oxide/hydroxide affinity chromatography. **Proteomics and Systems biology**, v.5, p. 4389-4397, 2005.

XU, K.; WANG, Y.; DING, X.; HUANG, Y.; LI, N.; WEN, Q. Magnetic solid-phase extraction of protein with deep eutectic solvent immobilized magnetic graphene oxide nanoparticles. **Talanta**, v. 148, p. 153–162, 2016.

XU, K.; WANG, Y.; HUANG, Y.; LI, N.; WEN, Q. A green deep eutectic solvent-based

aqueous two-phase system for protein extracting. **Analytica Chimica Acta**, v. 864, p. 9–20, 2015.

YANG, D.; HOU, M.; NING, H.; ZHANG, J.; MA, J.; YANG, G.; HAN, B. Efficient SO₂ absorption by renewable choline chloride–glycerol deep eutectic solvents. **Green Chemistry**, v. 15, n. 8, p. 2261, 2013.

YUZUGULLU, Y.; DUMAN, Y. Avc. Aqueous Two-Phase (PEG4000/Na₂SO₄) Extraction and Characterization of an Acid Invertase from Potato Tuber (*Solanum tuberosum*). **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 45, n. 7, p. 696–711, 2015.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C.T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: Vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 787–793, 1998.

ZASLAVSKY, B. Y. *Aqueous Two-Phase Partitioning: Physical Chemistry and Bioanalytical Applications*. New York: [s.n.], 1995.

ZENG, Q.; WANG, Y.; HUANG, Y.; DING, X.; CHEN, J.; XU, K. Deep eutectic solvents as novel extraction media for protein partitioning. **The Analyst**, v. 139, n. 10, p. 2565, 2014.

ZHANG, H.; WANG, Y.; XU, K.; LI, N.; WEN, Q.; YANG, Q.; ZHOU, Y.; WEN, I.; YANG, Q.; ZHOU, Y. Ternary and binary deep eutectic solvents as a novel extraction medium for protein partitioning. **Anal. Methods**, v. 8, n. 46, p. 8196–8207, 2016.

ZHANG, H.; WANG, Y.; ZHOU, Y.; XU, K.; LI, N.; WEN, Q.; YANG, Q. Aqueous biphasic systems containing PEG- based deep eutectic solvents for high-performance , p. 170partitioning of RNA. *Talanta*, v. 170, p. 266-274, 2017.

ZHANG, Q.; VIGIER, K.O.; ROYER, S.; JÉROME, F. Deep eutectic solvents: Syntheses, properties and applications. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 21, p. 7108–7146, 2012.

APÊNDICE A

TABELA A1 - DADOS EXPERIMENTAIS DE BINODAL PARA OS SISTEMAS: [N_{111(2OH)}]Cl: UREIA+ K₂HPO₄+ H₂O A 25 °C E PRESSÃO ATMOSFÉRICA. ^a

2:1		1:1		1:2	
K ₂ HPO ₄ (% m/m)	[N _{111(2OH)}]Cl: Ureia (%m/m)	K ₂ HPO ₄ (% m/m)	[N _{111(2OH)}]Cl: Ureia (%m/m)	K ₂ HPO ₄ (% m/m)	[N _{111(2OH)}]Cl: Ureia (%m/m)
7,1	51,64	9,09	43,68	8,16	47,23
8,9	49,43	10,05	41,02	10,24	43,16
9,6	47,92	11,18	39,07	12,45	39,56
9,96	46,96	13,01	35,39	13,08	39,43
10,60	45,90	13,51	35,45	14,11	36,90
11,70	43,94	14,30	34,53	15,64	34,93
12,77	42,29	14,69	33,06	17,40	32,82
13,01	42,03	14,99	33,55	18,48	32,37
14,03	40,26	15,76	32,63	18,80	31,23
15,01	38,88	16,61	31,47	20,62	29,66
15,93	38,00	17,21	30,91	23,56	26,60
16,26	37,20	17,97	29,30	25,52	25,22
17,61	35,27	17,99	30,15	28,41	22,72
18,17	34,93	18,93	29,14	31,81	19,28
18,93	33,64	19,72	28,10	35,73	16,33
20,67	31,87	20,72	27,26	39,47	13,47
20,82	31,45	21,91	26,22	43,77	10,85
22,81	29,16	22,67	25,26	45,23	9,49
24,96	26,98	23,22	24,87	49,97	7,57
25,97	25,92	23,81	23,90	56,04	4,83
28,76	23,05	24,13	23,79		
29,24	22,56	25,31	23,17		
29,80	22,02	26,69	21,28		
31,82	20,02	27,02	21,60		
32,13	19,97	28,06	20,67		
33,18	18,57	28,90	20,05		
37,01	14,88	30,54	18,77		
40,59	12,25	31,05	17,43		
43,96	9,62	32,89	16,66		
51,70	5,44	36,76	13,42		
57,51	3,16	38,21	11,81		
		38,30	12,41		
		40,67	11,27		
		45,64	7,04		
		49,92	4,66		
		54,01	2,70		

^a As incertezas padrão (u) são u(m) = 0,1 %, u(T) = 0,5 °C e u(P) = 10 kPa.

FONTE: A autora (2018)

TABELA A2 - DADOS EXPERIMENTAIS DE BINODAL PARA OS SISTEMAS: [N_{111(2OH)}]Cl: GLUCOSE+ K₂HPO₄+ H₂O A 25 °C E PRESSÃO ATMOSFÉRICA. ^a

2:1		1:1		1:2	
K ₂ HPO ₄ (% m/m)	[N _{111(2OH)}]Cl: Glucose (%m/m)	K ₂ HPO ₄ (% m/m)	[N _{111(2OH)}]Cl: Glucose (%m/m)	K ₂ HPO ₄ (% m/m)	[N _{111(2OH)}]Cl: Glucose (%m/m)
8,44	64,08	12,44	68,23	27,05	41,74

11,20	57,14	13,62	64,10	29,35	37,53
13,06	53,20	14,61	59,60	32,30	31,95
14,47	50,27	16,33	53,97	35,75	28,21
15,03	48,58	17,56	52,33	37,12	26,13
15,99	46,83	19,67	47,96	38,71	23,19
18,28	42,90	21,45	45,06	39,74	21,36
18,72	41,90	22,50	43,93	41,71	18,57
20,92	38,86	24,94	39,01	43,40	16,64
22,10	36,48	27,10	35,02	47,36	13,07
22,76	35,40	29,51	31,08	50,49	10,33
23,46	34,10	31,37	27,88	53,01	8,73
25,10	31,96	32,74	25,79		
25,72	31,06	34,42	23,21		
25,92	30,45	35,72	21,47		
26,59	29,37	37,82	18,79		
27,64	27,93	40,40	16,03		
28,44	26,87	40,47	15,78		
28,93	26,04	42,45	14,73		
29,80	24,95	44,73	12,11		
30,93	23,53	46,08	10,89		
33,55	20,72	48,10	9,31		
35,80	18,21	50,30	7,66		
37,15	16,96	53,24	5,84		
39,23	15,09	56,14	4,81		
42,00	12,39				
43,35	11,22				
46,32	8,74				
47,74	7,77				
50,83	5,69				
53,44	4,49				
53,44	4,49				
55,26	3,76				
57,39	3,27				

^a As incertezas padrão (u) são $u(m) = 0,1\%$, $u(T) = 0,5\text{ }^\circ\text{C}$ e $u(P) = 10\text{ kPa}$.

FONTE: A autora (2018)

TABELA A3 - DADOS EXPERIMENTAIS DE BINODAL PARA OS SISTEMAS: $[\text{N}_{111}(\text{2OH})]\text{Cl}$: XILITOL+ K_2HPO_4 + H_2O A $25\text{ }^\circ\text{C}$ E PRESSÃO ATMOSFÉRICA. ^a

2:1		1:1		1:2	
K_2HPO_4 (% m/m)	$[\text{N}_{111}(\text{2OH})]\text{Cl}$: Xilitol (%m/m)	K_2HPO_4 (% m/m)	$[\text{N}_{111}(\text{2OH})]\text{Cl}$: Xilitol (%m/m)	K_2HPO_4 (% m/m)	$[\text{N}_{111}(\text{2OH})]\text{Cl}$: Xilitol (%m/m)
9,57	65,22	7,91	63,94	18,67	39,23
12,41	53,06	9,04	57,02	23,44	31,94
13,26	49,15	10,89	50,99	27,95	27,04
11,14	61,74	13,55	46,72	30,77	24,59
16,80	40,75	16,13	39,92	32,31	22,62
17,70	37,68	19,90	32,95	34,25	19,20
19,52	34,12	23,41	26,10	37,58	16,99
20,46	31,75	23,80	27,33	43,81	13,68
21,43	29,41	26,46	24,25	46,72	10,89
25,62	26,94	28,39	22,14	51,03	7,43
27,30	23,88	32,60	16,95	56,56	4,21
30,67	20,40	36,35	14,63		
14,75	46,56	41,04	11,18		
35,19	15,20	44,90	8,86		
38,51	13,09	49,97	6,56		
42,24	10,91				

49,36	7,91		
46,08	8,88		

^a As incertezas padrão (u) são $u(m) = 0,1 \%$, $u(T) = 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ e $u(P) = 10 \text{ kPa}$.

FONTE: A autora (2018)

TABELA A4 - DADOS EXPERIMENTAIS DE BINODAL PARA OS SISTEMAS: $[\text{N}_{111(2\text{OH})}]\text{Cl}$:
SORBOSE+ K_2HPO_4 + H_2O A $25 \text{ }^\circ\text{C}$ E PRESSÃO ATMOSFÉRICA.^a

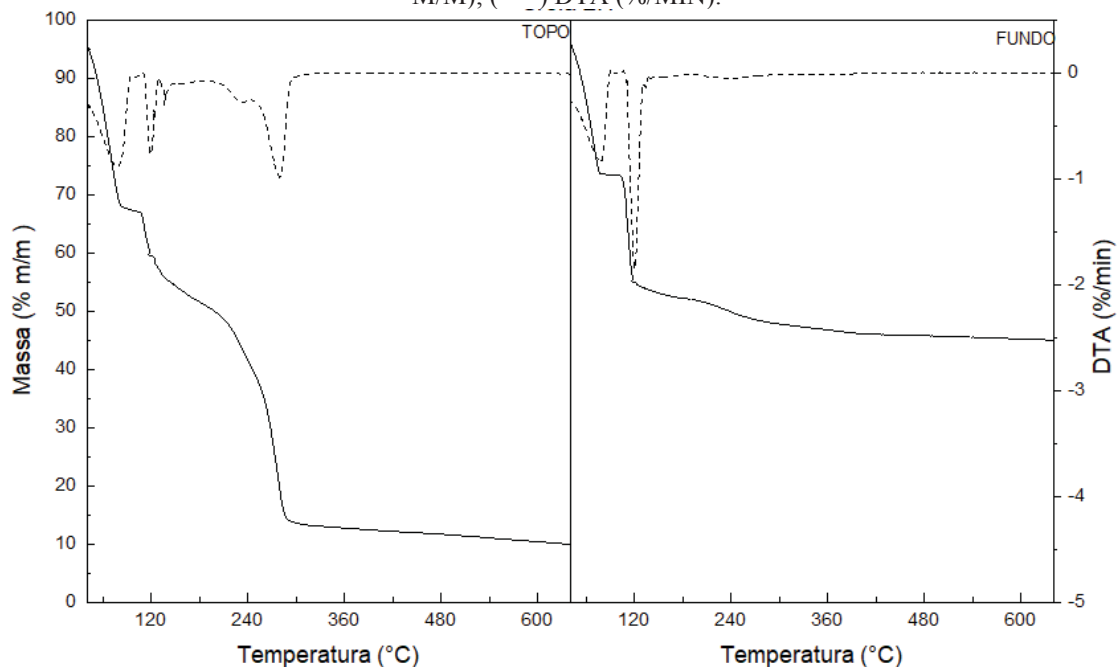
2:1		1:1		1:2	
K_2HPO_4 (% m/m)	$[\text{N}_{111(2\text{OH})}]\text{Cl}$: Sorbose (%m/m)	K_2HPO_4 (% m/m)	$[\text{N}_{111(2\text{OH})}]\text{Cl}$: Sorbose (%m/m)	K_2HPO_4 (% m/m)	$[\text{N}_{111(2\text{OH})}]\text{Cl}$: Sorbose (%m/m)
6,82	60,50	9,20	64,97	26,15	42,53
9,39	53,57	11,56	59,47	28,91	35,27
10,38	49,43	13,92	53,93	30,30	32,17
11,56	48,07	17,49	47,70	31,89	28,70
12,34	45,63	20,25	44,27	33,07	26,30
14,32	41,83	21,03	41,83	34,35	24,57
16,30	36,67	22,80	38,73	35,43	22,50
18,27	32,17	24,59	35,63	36,42	21,11
19,89	29,43	26,95	32,50	37,35	19,73
21,37	27,27	28,72	30,10	39,58	17,13
21,87	26,40	31,30	26,63	41,16	16,63
22,61	25,53	32,67	24,57	43,12	14,20
23,60	24,23	34,84	20,77	45,10	12,47
25,56	21,80	37,01	17,30	48,46	9,37
26,95	19,40	39,37	15,23	51,81	6,93
30,30	16,27	42,89	12,47	56,93	4,53
32,08	14,20	45,90	9,14		
33,66	12,13	48,35	8,16		
36,42	10,07	50,87	6,69		
38,99	8,33	53,40	5,11		
41,16	6,27	57,08	3,64		
45,30	3,50				

^a As incertezas padrão (u) são $u(m) = 0,1 \%$, $u(T) = 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ e $u(P) = 10 \text{ kPa}$.

FONTE: A autora (2018)

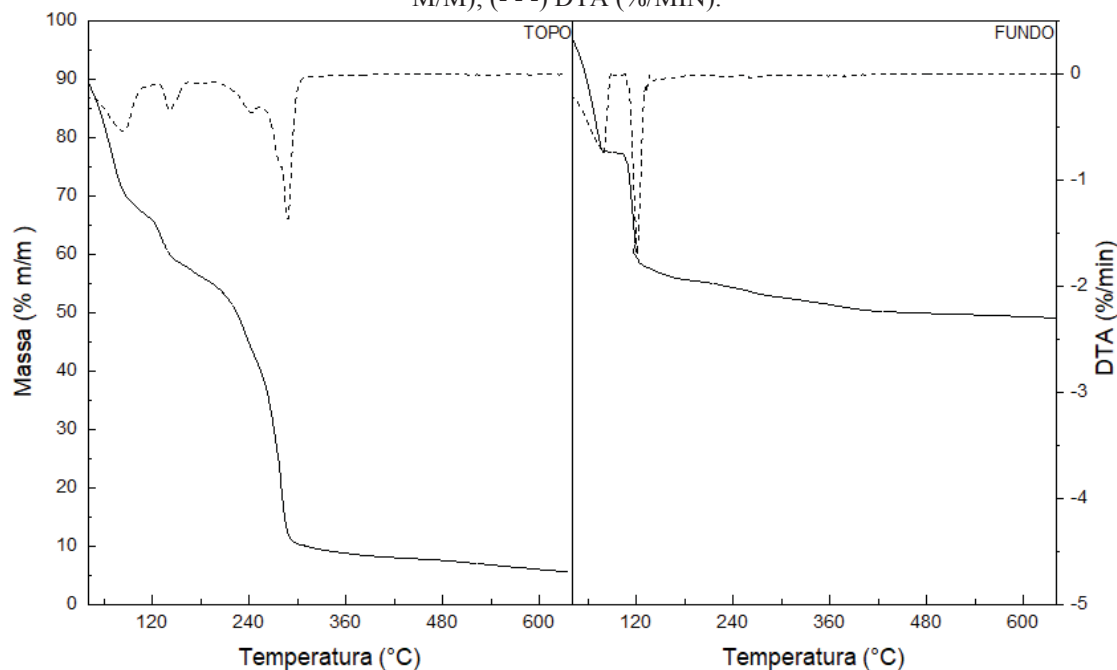
APÊNDICE B

FIGURA B1 - EXEMPLO DE ESPECTRO DE TGA PARA A QUANTIFICAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DAS FASES DO SDFA: $[N_{111(20H)}]Cl : UREIA + K_2HPO_4 + H_2O$ (2:1), (—) PERDA DE MASSA (% M/M); (- - -) DTA (%/MIN).



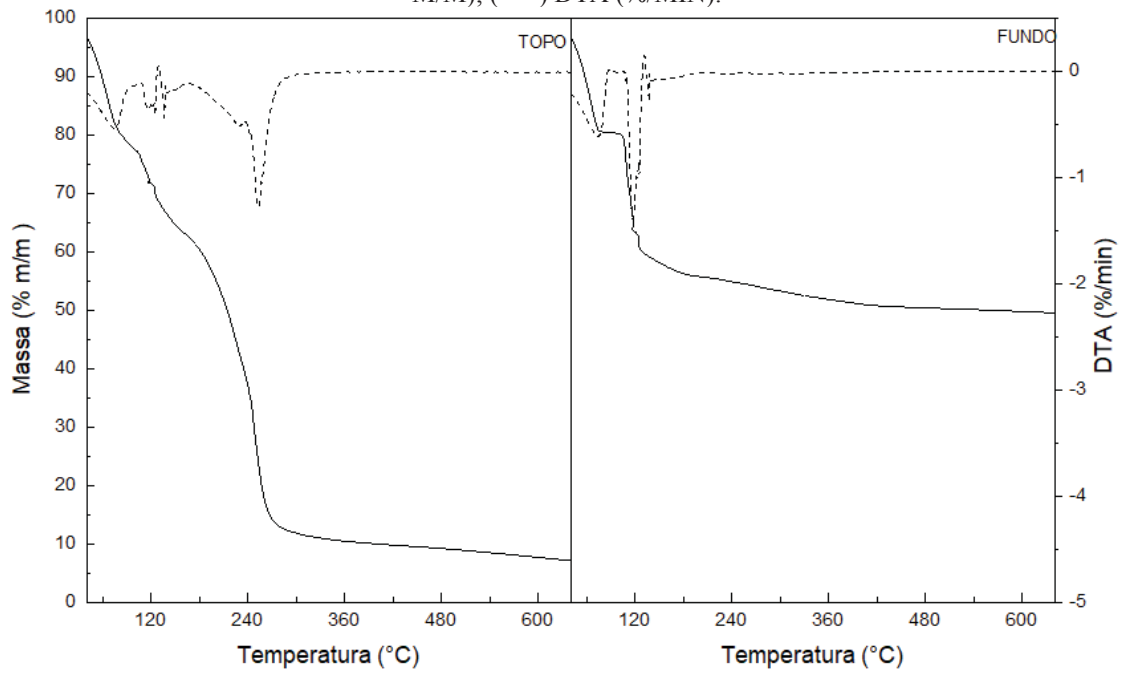
FONTE: A autora (2018)

FIGURA B2 - EXEMPLO DE ESPECTRO DE TGA PARA A QUANTIFICAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DAS FASES DO SDFA: $[N_{111(20H)}]Cl : UREIA + K_2HPO_4 + H_2O$ (1:1), (—) PERDA DE MASSA (% M/M); (- - -) DTA (%/MIN).



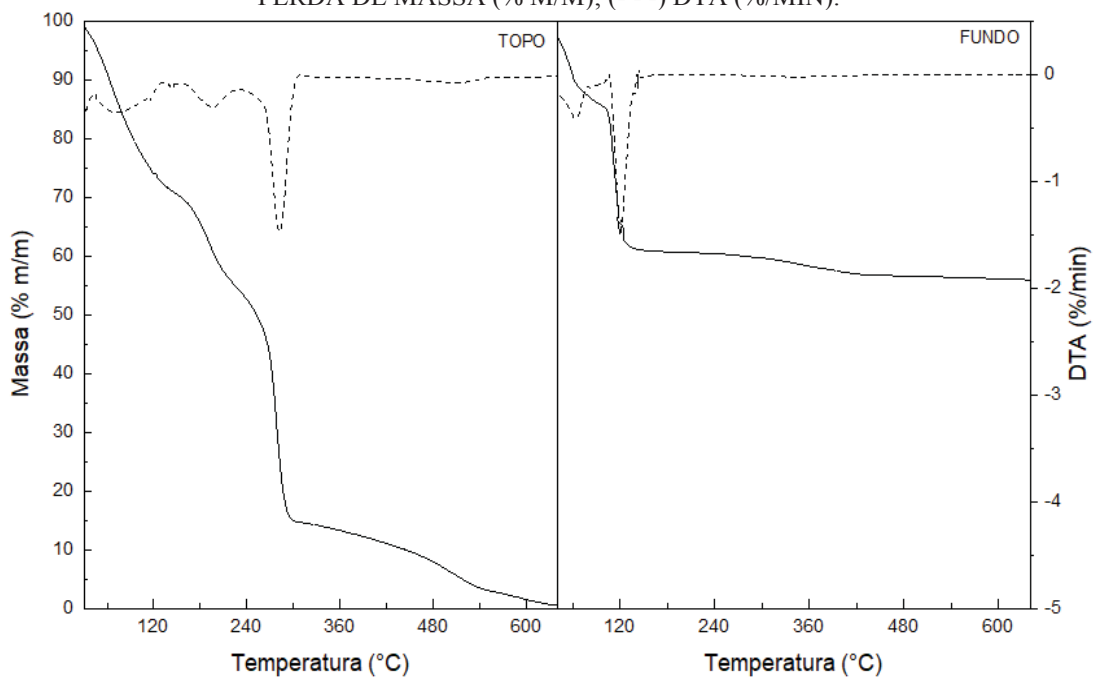
FONTE: A autora (2018)

FIGURA B3 - EXEMPLO DE ESPECTRO DE TGA PARA A QUANTIFICAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DAS FASES DO SDFA: $[N_{111}(2OH)]Cl : UREIA + K_2HPO_4 + H_2O (1:2)$, (—) PERDA DE MASSA (% M/M); (- - -) DTA (%/MIN).



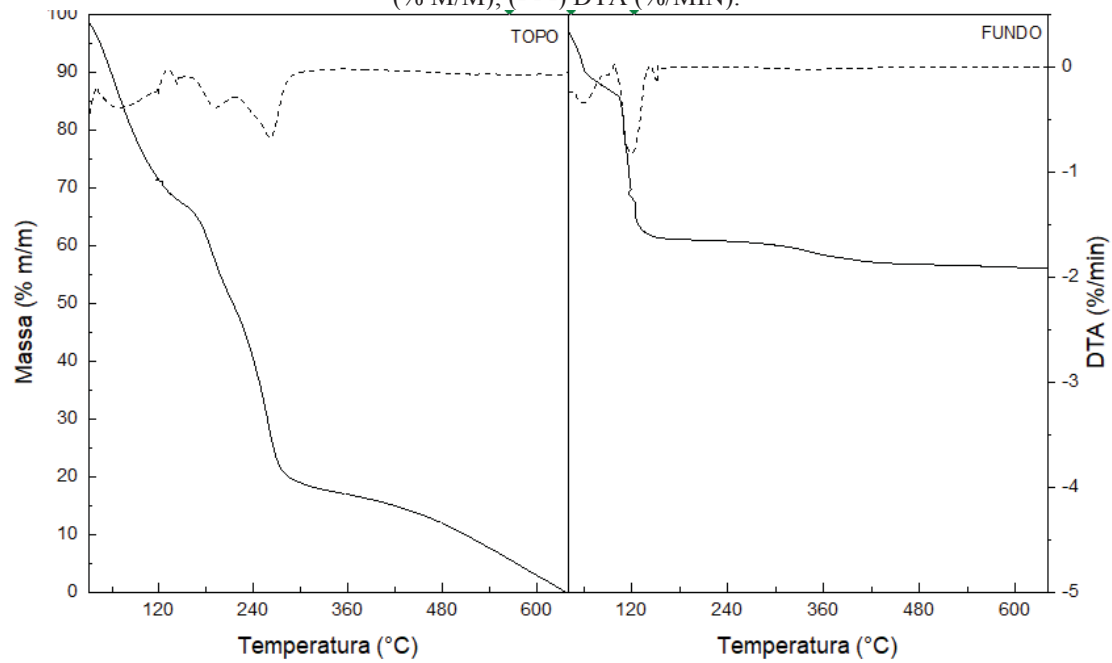
FONTE: A autora (2018)

FIGURA B4 - EXEMPLO DE ESPECTRO DE TGA PARA A QUANTIFICAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DAS FASES DO SDFA: $[N_{111}(2OH)]Cl : GLUCOSE + K_2HPO_4 + H_2O (2:1)$, (—) PERDA DE MASSA (% M/M); (- - -) DTA (%/MIN).



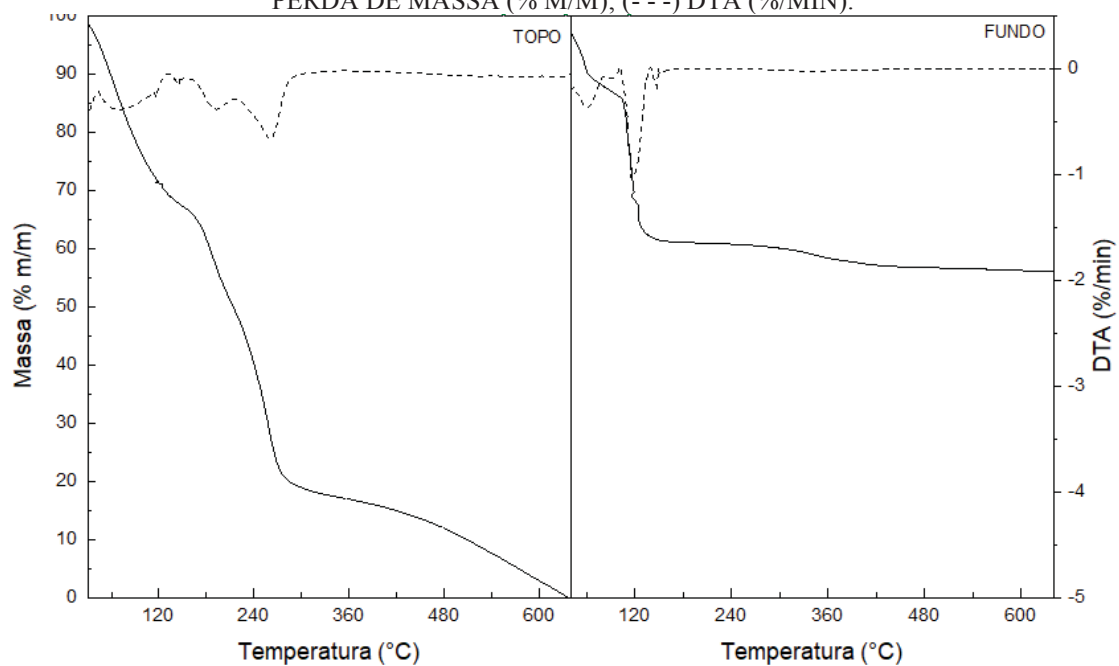
FONTE: A autora (2018)

FIGURA B5 - EXEMPLO DE ESPECTRO DE TGA PARA A QUANTIFICAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DAS FASES DO SDFA: [N_{111(2OH)}]Cl :GLUCOSE + K₂HPO₄ + H₂O (1:1), (—) PERDA DE MASSA (% M/M); (- - -) DTA (%/MIN).



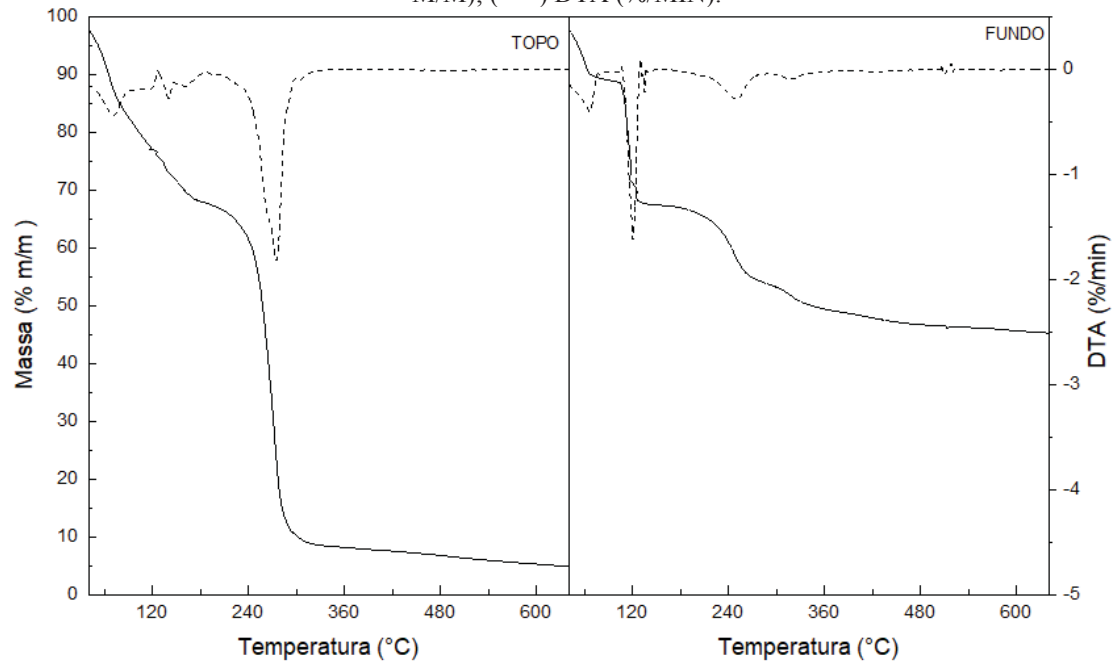
FONTE: A autora (2018)

FIGURA B6 - EXEMPLO DE ESPECTRO DE TGA PARA A QUANTIFICAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DAS FASES DO SDFA: [N_{111(2OH)}]Cl :GLUCOSE + K₂HPO₄ + H₂O (1:2), (—) PERDA DE MASSA (% M/M); (- - -) DTA (%/MIN).



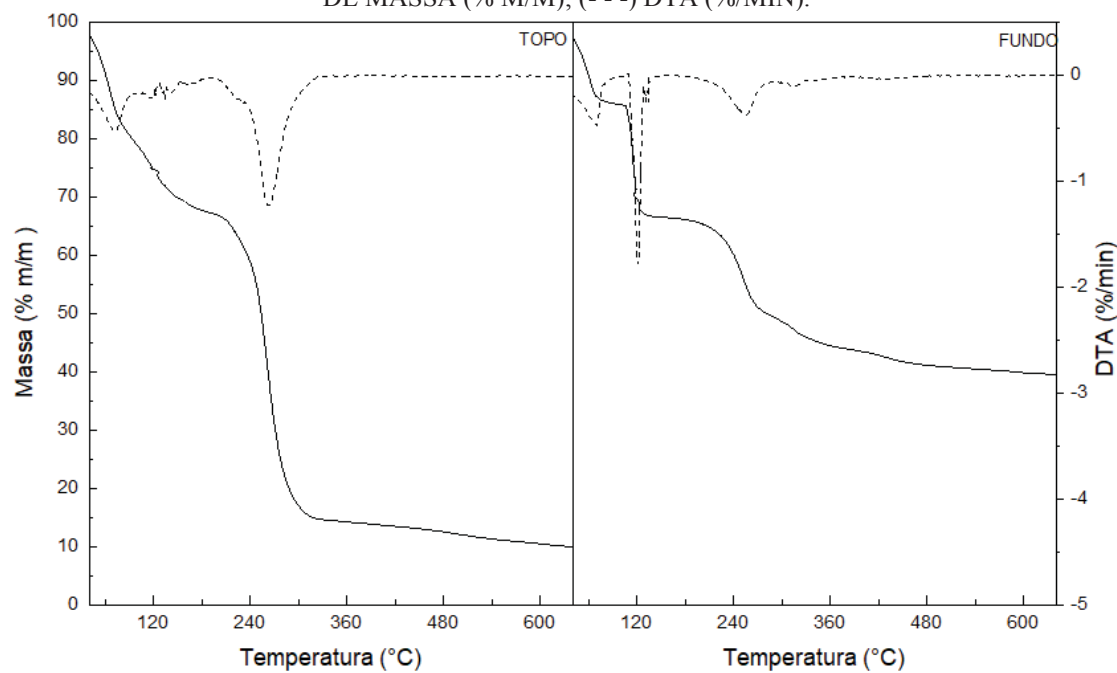
FONTE: A autora (2018)

FIGURA B7 - EXEMPLO DE ESPECTRO DE TGA PARA A QUANTIFICAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DAS FASES DO SDFA: $[N_{111(20H)}]Cl : XILITOL + K_2HPO_4 + H_2O (2:1)$, (—) PERDA DE MASSA (% M/M); (- - -) DTA (%/MIN).



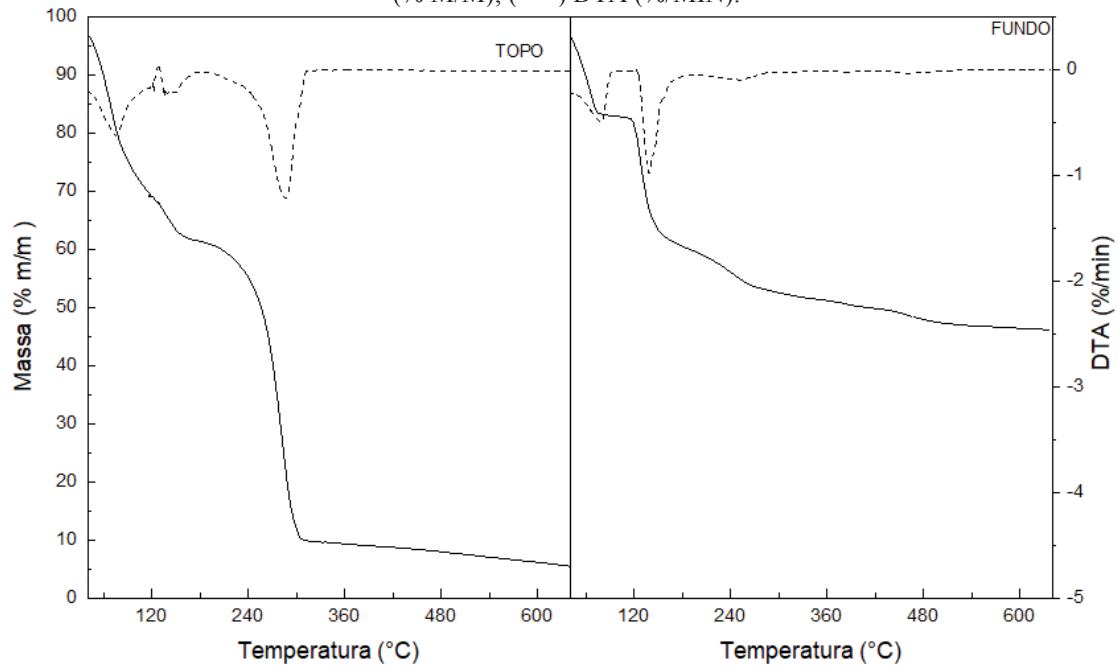
FONTE: A autora (2018)

FIGURA B8 - EXEMPLO DE ESPECTRO DE TGA PARA A QUANTIFICAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DAS FASES DO SDFA: $[N_{111(20H)}]Cl : XILITOL + K_2HPO_4 + H_2O (1:1)$, (—) PERDA DE MASSA (% M/M); (- - -) DTA (%/MIN).



FONTE: A autora (2018)

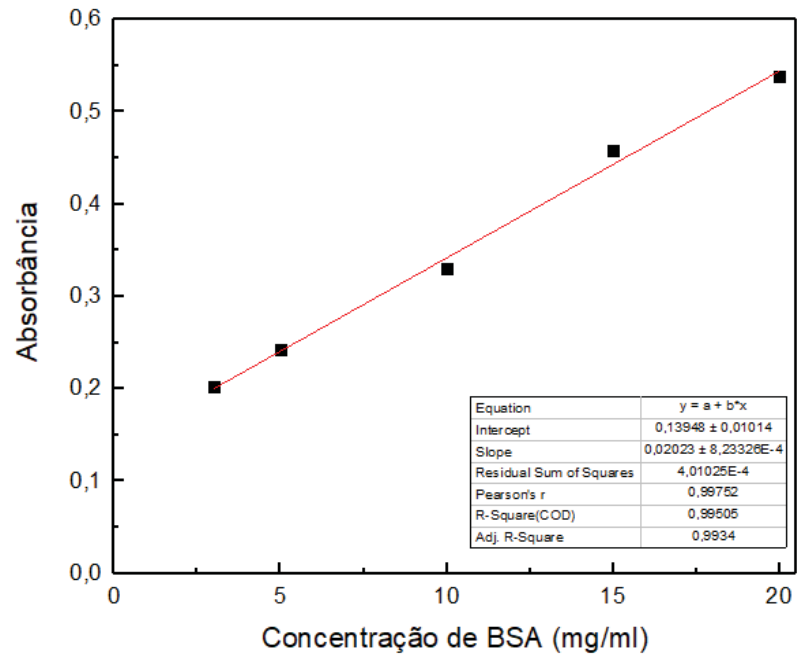
FIGURA B9 - EXEMPLO DE ESPECTRO DE TGA PARA A QUANTIFICAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DAS FASES DO SDFA: [N_{111(20H)}]Cl :SORBOSE + K₂HPO₄ + H₂O (2:1) , (—) PERDA DE MASSA (% M/M); (- - -) DTA (%/MIN).



FONTE: A autora (2018)

APÊNDICE C

FIGURA C1 - CURVA PADRÃO DA BSA OBTIDAS PARA QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE BRADFORD.



FONTE: A autora (2018)