



Acta Scientiarum. Technology

ISSN: 1806-2563

eduem@uem.br

Universidade Estadual de Maringá

Brasil

da Silva Padilha, Giovana; Ferrari Ferreira, Juliana; Monte Alegre, Ranulfo; Basile Tambourgi, Elias
Efeitos do pH e massa molar do polímero sobre o sistema bifásico aquoso PEG/fosfato

Acta Scientiarum. Technology, vol. 33, núm. 1, 2011, pp. 1-4

Universidade Estadual de Maringá

Maringá, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=303226530002>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

Efeitos do pH e massa molar do polímero sobre o sistema bifásico aquoso PEG/fosfato

Giovana da Silva Padilha^{*}, Juliana Ferrari Ferreira, Ranulfo Monte Alegre e Elias Basile Tambourgi

*Universidade Estadual de Campinas, Cidade Universitária "Zeferino Vaz", Distrito de Barão Geraldo, 13083-970, Campinas, São Paulo, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: giovana_padilha@yahoo.com.br*

RESUMO. A extração líquido-líquido usando sistemas bifásicos aquosos (SBA) é uma técnica promissora na purificação de biomoléculas de interesse industrial e laboratorial. Este trabalho tem por objetivo apresentar um estudo do diagrama de equilíbrio de fases para diferentes massas molares de polietileno glicol (PEG) (400 e 4000) e fosfato de potássio a pHs que variam entre 6 e 11, em condições normais de temperatura e pressão. A influência do peso molecular do PEG em diferentes pHs foram estudados nos diagramas de fases formados. Foram preparadas concentrações de 100 e 50% (p p⁻¹) para o PEG 400 e 4000, respectivamente. A 20% (p p⁻¹ de KH₂PO₄/K₂HPO₄), a solução estoque do sal fosfato foi também preparada de forma a obter os pHs desejados (6, 7, 8 e 9). Para os pHs 10 e 11 além dos sais, foi utilizada uma solução de NaOH 1M. Os resultados mostraram que menores concentrações de soluções foram utilizadas para formar o SBA com o PEG de maior massa molar. Por outro lado, não houve influência do pH nas curvas de equilíbrio, ou seja, um deslocamento significativo da binodal em relação aos diferentes pHs.

Palavras-chave: polietileno glicol, sistemas bifásicos aquosos.

ABSTRACT. Effects of polymer pH and molar mass on the PEG/phosphate aqueous two-phase system. Liquid-liquid extraction using aqueous two-phase systems (ATPSs) is a promising technique for the purification of biomolecules of industrial and laboratory interest. This work presents a study of the phase diagrams for different poly(ethylene glycol) (PEG) molar masses (ranging from 400 to 4000) and potassium phosphate at pH varying from 6 to 11 in standard conditions. The influence of PEG molecular mass at different pHs was studied from the phase diagrams formed. Stock solutions of PEG 400 and 4000 (100 and 50% w w⁻¹, respectively) and phosphate (20% w w⁻¹ KH₂PO₄/K₂HPO₄) were prepared at the appropriate pH (6, 7, 8 and 9). For pHs 10 and 11, NaOH 1M was used in addition to the salts. The results showed that low concentrations were used to form the ATPS with high molecular mass PEG. On the other hand, there was no pH influence in the equilibrium curves – in other words, a significant shift of the binodal in different pHs.

Keywords: poly(ethylene glycol), aqueous two-phase system.

Introdução

A purificação de biomoléculas tem apresentado acentuado crescimento nos últimos anos. Métodos convencionais muitas vezes não são adequados para separar produtos de origem biológica, por isso novos sistemas de separação estão sendo estudados e desenvolvidos. Entre eles, o sistema bifásico aquoso é um método eficiente para extração de proteínas, enzimas e ácidos nucleicos. Os SBAs são geralmente formados pela incompatibilidade, em soluções, de dois polímeros hidrofílicos, naturais ou sintéticos, ou pela combinação de um polímero com um sal. A fase mais leve é rica em polietileno glicol enquanto a

fase mais pesada é enriquecida com dextrana ou sais. Os polímeros e os sais são solúveis em água, mas são incompatíveis entre si e se separam em duas fases. Eles constituem um meio conveniente e adequado para a extração de substâncias de origem biológica, pois a constituição das fases, entre 70 e 90% de água, proporciona ambiente ameno para o trabalho com compostos biologicamente ativos, preservando sua estabilidade molecular e permitindo, assim, o seu processamento neste meio (ALBERTSSON, 1971; CABEZAS, 1996). O polietileno glicol é o polímero padrão para os sistemas bifásicos aquosos. Sua utilização torna-se vantajosa pelo seu baixo custo, propriedades físicas e químicas favoráveis, pela não

diminuição da atividade das biomoléculas, além de ser biodegradável e atóxico (HARRIS, 1992). Apesar do sistema PEG/dextrana ser o usual, a dextrana é extremamente onerosa para ser utilizada industrialmente pelo elevado custo da purificação desse polímero. Como alternativa, está sendo proposto utilizar a dextrana não purificada, que mantém as propriedades de partição do sistema a fim de reduzir substancialmente os custos associados à aplicação deste em grande escala. Contudo, esses sistemas possuem alta viscosidade e separação muito lenta (KRONER et al., 1982). Para combater a falta de competitividade dos SBAs constituídos por PEG/dextrana, tem se recorrido a sistemas PEG/sais. Os mais empregados na aplicação em grande escala dessas técnicas de purificação são os sistemas PEG/fosfato, embora existam outros sais que formem duas fases com o PEG, tais como NaCl ou Na₂SO₄, o fosfato de potássio apresenta elevado coeficiente de partição de biomoléculas em relação aos outros (ALBERTSSON, 1971). Sistemas formados por PEG e sal são utilizados por apresentarem rápida separação de fases, baixo custo e, sobretudo, elevada seletividade na separação de moléculas com base na solubilidade. As composições das fases e as concentrações das misturas polímero-polímero ou polímero-sal necessárias para que ocorra a separação das fases podem ser representadas no diagrama de equilíbrio de fases, em que a coordenada representa a composição em massa da molécula que apresenta maior fase de topo (como o PEG) e a abscissa representa a composição da molécula de maior concentração na fase de fundo (como o sal ou a dextrana). Composições representadas por pontos acima da curva de equilíbrio, ou curva binodal, levam à formação de duas fases, e abaixo da curva, uma só fase (PESSOA JÚNIOR.; KILIKIAN, 2005). Cada SBA é caracterizado por um único diagrama de fases e são de grande importância para estudos de separação de biomoléculas, pois são usados como ponto de partida para a determinação da eficiência de partição do componente entre as fases, além de fornecer subsídios para auxiliar o desenvolvimento de modelos termodinâmicos (BADR; CABEZAS, 1996). Como o diagrama de fases pode sofrer influências de alguns fatores como a massa molar do polímero e o pH do sistema, e esses ainda não foram concluídos pelos pesquisadores (DIAMOND; HSU, 1992; ZUNIGA et al., 2003), o objetivo deste trabalho foi, portanto, a construção de diagramas de

fases utilizando a mistura PEG/sal fosfato com diferentes massas molares de PEG em uma faixa de pH de 6 a 11, para verificar a influência da variação desses fatores para posterior partição de biomoléculas.

Material e métodos

Materiais

Todos os reagentes utilizados foram de grau de pureza analítico. O polietileno glicol com massa molar de 400 foi adquirido da Sigma Chemical (St. Louis, USA), o fostato monobásico de potássio, fosfato dibásico de fosfato, hidróxido de sódio e o polietileno glicol de massa molar 4000 foram adquiridos da Synth (Diadema, Estado de São Paulo).

Métodos

Determinação dos diagramas de fases

Para os SBAs foram construídos os respectivos diagramas de fases. Por estes é possível ter acesso à concentração mínima de polímero e sal necessários à formação de um SBA e a composição das fases em equilíbrio. Segundo a metodologia proposta por Albertsson (1971), os diagramas de fases foram estabelecidos. Os sistemas bifásicos com diferentes composições (7,0 g) foram preparados em tubos de centrífuga graduados (15 mL), a estes foram colocados solução salina com posterior gotejamento da solução de PEG, para isso utilizou-se uma balança analítica (10⁻³ g) para pesagem das soluções nos tubos. O mesmo procedimento foi usado para obtenção dos pontos com alta concentração de PEG. A construção dos diagramas de fases foi a partir das diferentes composições das soluções de PEG e sal em condições normais de temperatura e pressão. Concentrações de 100 e 50% (p p⁻¹) foram preparadas para PEG 400 e 4000, respectivamente. A 20% a solução estoque do sal fosfato foi também preparada de forma a obter os pHs desejados (6, 7, 8 e 9). Para os pHs 10 e 11 além dos sais, foi utilizada uma solução de NaOH 1M para ajuste do pH. As diferentes composições permitiram a construção da curva binodal do sistema para cada massa molar de PEG em diferentes pHs. Neste trabalho, por convenção, a concentração do sal (% fosfato) que se distribui preferencialmente na fase inferior foi plotada na abscissa e a concentração do PEG (% PEG) que se distribui preferencialmente na fase superior foi plotada na ordenada.

Resultados e discussão

Os diagramas de fases PEG 400/fosfato e PEG 4000/fosfato em pHs que variam de 6 a 11 são apresentados nas Figuras 1 e 2, respectivamente. Analisando o comportamento dos sistemas em diferentes valores de pHs, notou-se que não houve deslocamento significativo das binodais, corroborando com estudos de Diamond e Hsu (1992) e de Ferreira et al. (2007). Por outro lado, para sistemas PEG/sal observou-se que a diminuição do pH provocou deslocamento da binodal no sentido de maior concentração dos constituintes das fases (FRANCO, 1992). No entanto, para estudos de SBA PEG/fosfato realizados por Videira e Aires-Barros (1994), a redução do pH de 8,0 para 7,0 aumentou a concentração do polímero e sais necessários para a formação de fases. Esse efeito pode ser explicado pelo aumento da proporção de $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ com a diminuição do pH. De fato como o ânion monovalente é menos efetivo no “salting-out” do PEG, maior concentração de sal e/ou polímero tornou-se necessária para obter um sistema bifásico. No que se refere à massa molar do PEG, segundo Albertsson (1971), quanto menor a massa molar do polímero, maior a concentração necessária para a formação de fases. Isso corrobora com as Figuras 3, 4, 5, 6, 7 e 8 que apresentaram maiores concentrações de PEG 400 em relação ao PEG 4000, facilitando a compreensão do efeito da massa molar de PEG sobre os pHs estudados.

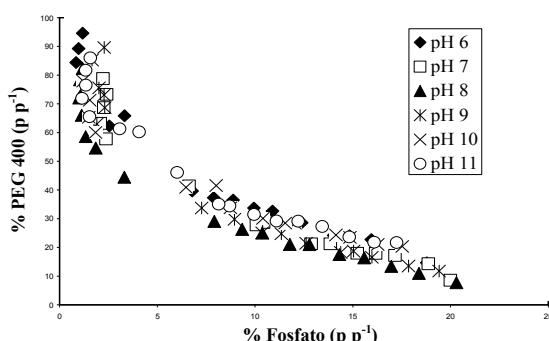


Figura 1. Curva de equilíbrio SBA PEG 400/Fosfato em condições normais de temperatura e pressão.

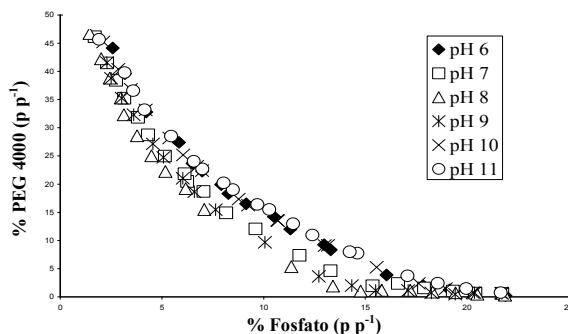


Figura 2. Curva de equilíbrio SBA PEG 4000/Fosfato em condições normais de temperatura e pressão.

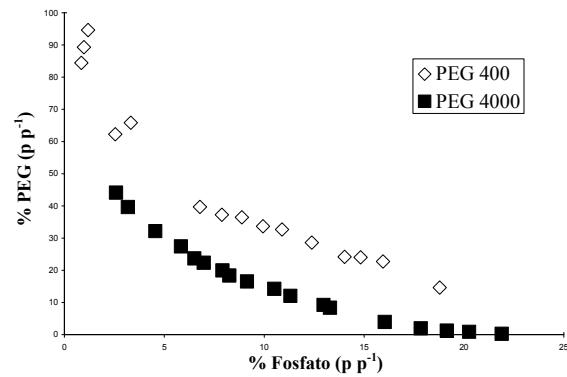


Figura 3. Curvas de equilíbrio SBA PEG/Fosfato a pH 6.

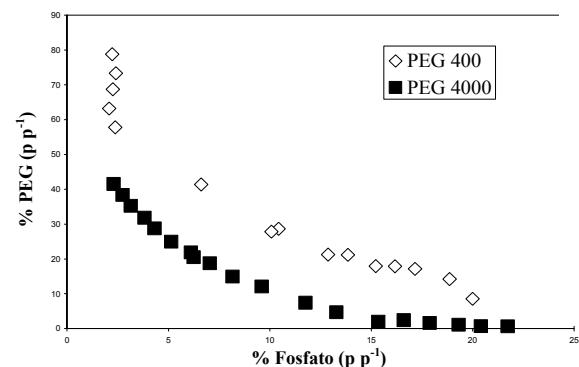


Figura 4. Curvas de equilíbrio SBA PEG/Fosfato a pH 7.

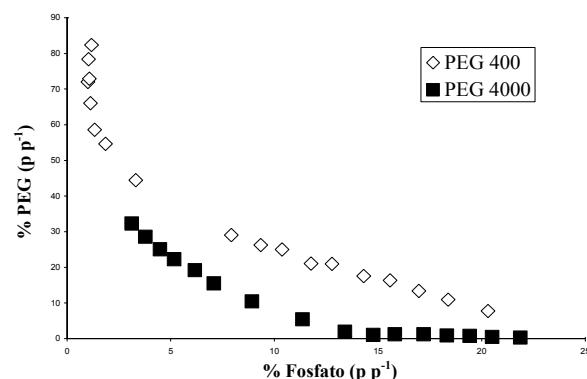


Figura 5. Curvas de equilíbrio SBA PEG/Fosfato a pH 8.

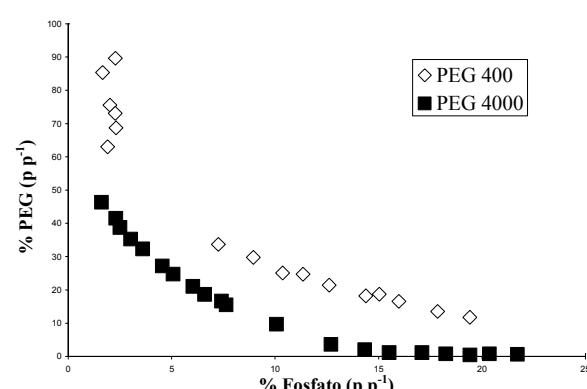


Figura 6. Curvas de equilíbrio SBA PEG/Fosfato a pH 9.

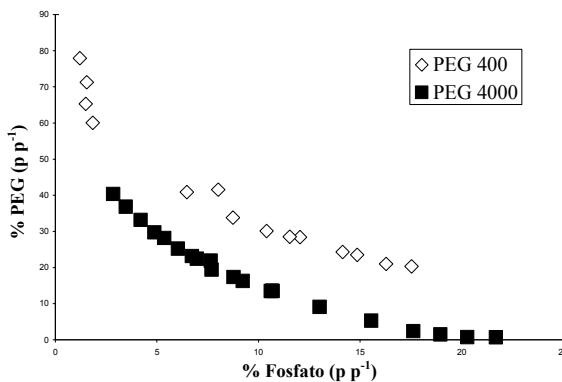


Figura 7. Curvas de equilíbrio SBA PEG/Fosfato a pH 10.

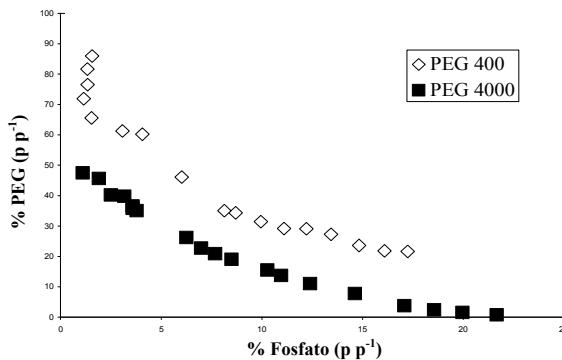


Figura 8. Curvas de equilíbrio SBA PEG/Fosfato a pH 11.

Conclusão

A partir dos experimentos realizados neste trabalho, pode-se concluir que para as diferentes massas molares dos polímeros utilizados (PEG 400 e PEG 4000), menores concentrações de soluções foram utilizadas para formar o SBA com o PEG de maior massa molar, isto se torna significativo em termos econômicos. Por outro lado, os resultados mostraram que não houve influência do pH nas curvas de equilíbrio, ou seja, um deslocamento significativo da binodal em relação aos diferentes pHs estudados.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq pelo suporte financeiro.

Referências

ALBERTSSON, P. A. **Partition of cell particles and macromolecule**. New York: John Wiley and Sons, 1971.

BADR, M. K.; CABEZAS, H. A thermodynamic model for the phase behavior of salt-polymer aqueous two-phase system. **Fluid Phase Equilibria**, v. 155, n. 17, p. 39-58, 1996.

CABEZAS, H. Theory of phase formation in aqueous two-phases systems. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v. 680, n. 17, p. 3-30, 1996.

DIAMOND, A. D.; HSU, J. T. Aqueous two phase systems for biomolecule separation. **Advances in Biochemistry Engineering**, v. 47, n. 135, p. 89-135, 1992.

FRANCO, T. T. **Use of modified proteins in aqueous two-phase systems. Effect of surface hydrophobicity and charge**. 1992. 184f. Thesis (Doctoral in Biochemical Engineering)-Departament of Agriculture and Food, University of Reading, Reading, 1992.

FERREIRA, G. B.; EVANGELISTA, A. F.; JUNIO, J. B. S.; SOUZA, R. R.; CURVELO SANTANA, J. C.; TAMBOURGI, E. B.; JORDÃO, E. Partitioning Optimization of Proteins from *Zea mays* Malt in ATPS PEG 6000/CaCl₂. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 3, p. 557-564, 2007.

HARRIS, J. M. **Poly (Ethylene Glycol) Chemistry: Biochemical and biomedical applications**. New York: Plenum Press, 1992.

KRONER, K. H.; STACH, W.; SCHUTTE, H.; KULA, M. R. Scale-up of formate dehydrogenase isolation by partition. **Journal of Chemistry Technology and Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 130-137, 1982.

PESSOA JÚNIOR, A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de produtos biotecnológicos**. Barueri: Manole, 2005.

VIDEIRA, M.; AIRES-BARROS, M. R. Liquid-liquid extraction of clavulanic acid using in aqueous two-phase system of polyethylene glycol and potassium phosphate. **Journal of Chromatography A**, v. 668, n. 1, p. 237-240, 1994.

ZUNIGA, A. D. G.; COIMBRA, J. S. R.; MINIM, L. A.; MEIRELLES, A. J. A. Extração líquido-líquido usando sistemas aquosos bifásicos: uma revisão. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 37, n. 2, p. 89-102, 2003.

Received on June 26, 2009.

Accepted on February 25, 2010.

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.