

# Efeitos da massa molar e do pH sobre o equilíbrio termodinâmico do sistema bifásico aquoso PEG/fosfatos

Juliana Ferrari Ferreira

Doutoranda em Engenharia Química pelo Departamento de Engenharia de Sistemas Químicos, Faculdade de Engenharia Química – Unicamp.  
Campinas – SP [Brasil]  
jferrarif@hotmail.com

Giovana da Silva Padilha

Doutoranda em Engenharia Química pelo Departamento de Engenharia de Sistemas Químicos, Faculdade de Engenharia Química – Unicamp.  
Campinas – SP [Brasil]  
giovana\_padilha@yahoo.com.br

Elias Basile Tambourgi

Professor Doutor do Departamento de Engenharia de Sistemas Químicos, Faculdade de Engenharia Química – Unicamp.  
Campinas – SP [Brasil]  
eliastam@feq.unicamp.br

Sistemas bifásicos aquosos têm sido muito utilizados, em pesquisas, na separação e purificação de biomoléculas. São formados pela mistura de dois polímeros hidrofílicos, ou de um polímero e um sal. O objetivo principal deste trabalho foi caracterizar um sistema bifásico aquoso (SBA) a partir da preparação de soluções estoques de PEG com massas molares de 1500, 4000 e 6000 e tampões fosfato variando de 6 a 8, em condições normais. Nos diagramas de fases PEG/fosfato, foi observado um deslocamento da binodal para os valores de menores concentrações dos polímeros e com o aumento do peso molecular do PEG. Por outro lado, a variação do pH não mostrou um deslocamento significativo da binodal. Em relação às linhas de amarração, os valores das composições não se alteram muito, mesmo quando os polímeros são comparados entre si e a diferentes pHs.

**Palavras-chave:** Diagramas de fase. Linhas de amarração. Sistema bifásico aquoso.



## 1 Introdução

A purificação de produtos biotecnológicos produzidos por células microbianas ou de animais constitui etapa complexa, dadas as variadas características dos meios e das biomoléculas de interesse, tais como ácidos orgânicos, antibióticos, polissacarídeos, hormônios, aminoácidos peptídeos e proteínas (PESSOA JR.; KILIKIAN, 2005).

Muitas são as técnicas utilizadas para a recuperação e purificação desses produtos; entre elas existem as mais antigas como a precipitação, extração com solventes e filtração que, geralmente, têm alto poder de concentração e baixa purificação. Entretanto, técnicas mais modernas, tais como a cromatografia de afinidade, troca iônica, eletroforese, extração em duas fases aquosas e extração com micela reversa, recuperam e purificam, muitas vezes, até a homogeneidade (VIDEIRA; AIRES-BARROS, 1994).

O processo de separação e purificação de bioprodutos, também chamado *downstream processing*, é atualmente um segmento muito importante na indústria, pois pode chegar a representar de 50 a 90% do custo de produção; por isso, o desenvolvimento de um processo eficiente e de baixo custo é de extrema importância (DIAMOND; HSU, 1992).

A partir desse contexto, a purificação e separação de proteínas baseadas nos princípios de partição em sistemas de duas fases aquosas têm sido muito desenvolvidas nos últimos anos. Essa técnica de extração parece ser especialmente adequada para as primeiras etapas dos procedimentos de separação, podendo substituir as cromatográficas ou ser aplicada antes da cromatografia (BRADDOO et al., 1999; SHARMA et al., 2002; PESSOA JR.; KILIKIAN, 2005).

A extração em duas fases aquosas é uma técnica de baixo custo, alta seletividade e com

possibilidade de reciclagem dos reagentes. Além disso, as enzimas permanecem estáveis no sistema, devido à alta concentração de água e à utilização de reagentes não desnaturantes (ALBERTSSON, 1986).

Os sistemas de duas fases aquosas (SBA) formam-se pela adição de soluções aquosas de dois polímeros hidrofílicos, como PEG (polietileno glicol) e dextrana, ou de um polímero e um sal, como PEG e sal fosfato. A fase mais leve é rica em polietileno glicol, e a mais pesada, enriquecida com dextrana ou sais. Os polímeros e os sais são solúveis em água, mas 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 um ambiente ameno para o trabalho com compostos biologicamente ativos, preservando sua estabilidade molecular e permitindo, assim, seu processamento nesse meio (ALBERTSSON, 1986; COIMBRA, 1995).

Como nos processos biotecnológicos, existe um número muito limitado de solventes adequados a ser usado em enzimas e células, sendo a introdução dos sistemas de duas fases aquosas uma alternativa que possibilita o emprego da extração líquido-líquido nesses processos, já que esses sistemas se caracterizam por ajustar-se aos critérios requeridos pelos processos de biosseparações (MATIASSON et al., 1987).

Trabalhos realizados com sistema bifásico aquoso têm obtido resultados satisfatórios acerca desse tipo de purificação e estão-se tornando cada vez mais importantes. Bradoo et al. (1999) estudaram a purificação com SBA PEG/sal fosfato e NaCl em lipases neutras e ácidas de *Bacillus stearothermophilus* SB-1. Em outro estudo, Sarubbo (2000) empregou um sistema alternativo formado por PEG/goma de cajueiro para extração de soro de albumina bovino

(SBA). Menge e Schmid (1989) e Ferreira (2007) purificaram a bromelina e lipases de *Mucor miehei* a partir do sistema bifásico PEG/ fosfato, respectivamente.

A partir disso, neste trabalho, objetivou-se caracterizar um sistema bifásico aquoso que pode ser utilizado para partição de diversas biomoléculas nessa faixa de pH estudado.

## 2 Materiais e métodos

### 2.1 Materiais

Polímeros e sais: foi utilizado Polietileno glicol com massa molecular de 1500, 4000 e 6000 e solução estoque de Potássio Fosfato Monobásico e Fosfato de Potássio Dibásico. Todos os reagentes eram de grau analítico, e foram fornecidos pela Synth (Diadema-SP).

### 2.2 Métodos

Determinação do diagrama de equilíbrio de fases: a construção dos diagramas de fases foi feita utilizando diferentes composições de PEG e sal, segundo a metodologia descrita por Albertsson (1986). Solução de fosfato (20% p/p de  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) foi gotejada lentamente, à temperatura ambiente, em solução de PEG, até atingir a turbidez. Realizou-se o mesmo procedimento para obter pontos com alta concentração de PEG, utilizando soluções a 50% (p/p). As diferentes composições permitiram a construção da curva binodal do sistema para cada condição de processo. O preparo dos tampões seguiu a metodologia descrita por Morita e Assumpção (1995).

Determinação das linhas de amarração: Os pontos que deram origem às linhas de amarração (*tie-lines*) foram obtidos para cada condição de pH a partir da massa, em tubos graduados (15 mL) de solução concentrada de PEG (50% p/p) e de sal fosfato (20% p/p). Observou-se a formação

das fases superior (de topo) e inferior (de fundo) de igual volume.

## 3 Resultados e discussão

### 3.1 Diagrama de equilíbrio de fases

A determinação do diagrama de equilíbrio de fases é a primeira etapa para caracterizar os sistemas bifásicos aquosos que contêm informações de concentrações de PEG e sal necessários à formação das fases, composição das fases em equilíbrio e previsão qualitativa da partição de moléculas.

Neste trabalho, a escolha do PEG se deve à formação eficiente de fases em meio aquoso, sem provocar a diminuição da atividade funcional de biomoléculas. Outra vantagem do uso do PEG é decorrente de sua biodegradabilidade e não toxicidade (HARRIS, 1992). Embora existam diversos sais que formam duas fases com o PEG, escolheu-se o sal potássio fosfato por seu baixo custo quando comparado aos processos convencionais e ao alto coeficiente de partição de biomoléculas em relação a outros sais (ALBERTSSON, 1986).

Os diagramas de fases referentes aos PEGs 1500, 4000 e 6000 para os pHs 6, 7 e 8 são apresentados conforme mostram as Figuras 1, 2 e 3, respectivamente. A concentração do sal (% 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, na ordenada.

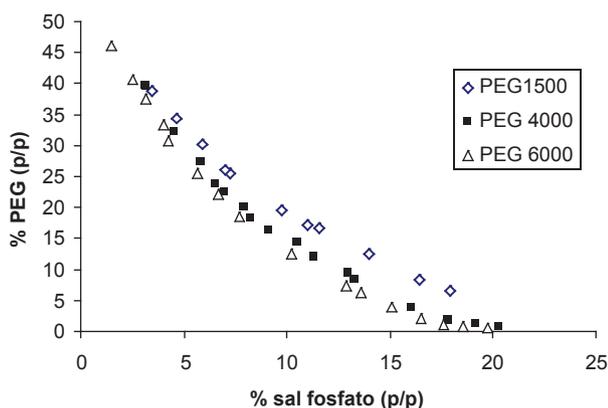
Neste trabalho, foi feita uma análise comparativa com PEG de diferentes pesos moleculares. Segundo Albertsson (1986), quanto menor a massa molar do polímero, maior a concentração necessária para a formação de fases. Isso corrobora as figuras que apresentaram maiores concentrações do polímero no PEG 1500 em relação aos PEGs 4000 e 6000, constatando que à medida que a linha de



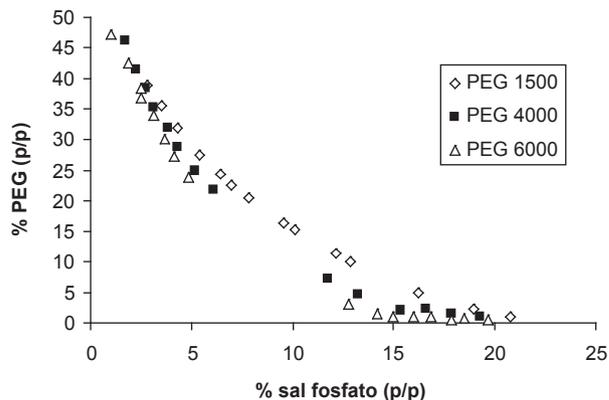
amarração se desloca para cima da binodal, as composições de PEG e sal vão-se elevando.

No entanto, em relação aos pHs, Videira e Aires-Barros (1994) verificaram que quando o pH diminui, a proporção de  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$  aumenta, e em decorrência da rejeição do PEG por grupos (ânions) multivalentes, uma maior concentração de sal ou polímero será necessária para obter um sistema bifásico. Os autores observaram que, para sistemas bifásicos PEG/fosfato, a redução do pH de 8,0 para 7,0 aumentou a concentração de polímeros e sais requeridos para a formação de fase.

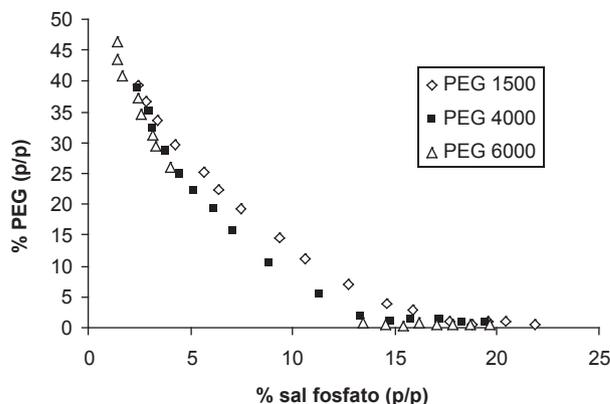
Pôde-se verificar, neste estudo, que a influência dos pHs sobre os SBAs não apresentou comportamento definido, ou seja, o deslocamento das binodais seguindo uma tendência; por esse motivo, os gráficos não foram apresentados. Ferreira (2007) verificou a não influência dos pHs sobre os SBAs e mostrou que o comportamento desses sistemas, em diferentes valores de pHs, apresenta um deslocamento não significativo das binodais. Pode-se afirmar que a estabilidade desses sistemas, ante as variações de pHs, e seu efeito sobre os SBAs, não possuem características próprias (DIAMOND; HSU, 1992; FERREIRA et al., 2007).



**Figura 1: Diagrama de fases SBA PEG/fosfato a pH 6**  
Fonte: os autores.



**Figura 2: Diagrama de fases SBA PEG/Fosfato a pH 7**  
Fonte: os autores.



**Figura 3: Diagrama de fases SBA PEG/fosfato a pH 8**  
Fonte: os autores.

### 3.2 Linhas de amarração

A partir da caracterização dos diagramas de fases foram obtidas as linhas de amarração para posterior purificação de biomoléculas que estivessem dentro dos pHs estudados. As linhas de amarração para as diferentes condições de pH e massas molares de PEG são apresentadas nas Tabelas de 1 a 9.

As linhas de amarração ou *tie-lines* são retas que ligam pontos no diagrama, representando a composição das duas fases em equilíbrio. Qualquer ponto sobre essa mesma linha fornecerá fases superiores e inferiores (de topo e de fundo) com a mesma composição final, porém com diferentes relações de volumes entre as fases (DA SILVA; LOH, 2006).

**Tabela 1: Composição total do sistema PEG1500/sal fosfato em pH 6,0**

Tie line	Composição total do sistema (%p/p)			Composição da fase superior (%p/p)			Composição da fase inferior (%p/p)		
	PEG	SAL	H <sub>2</sub> O	PEG	SAL	H <sub>2</sub> O	PEG	SAL	H <sub>2</sub> O
1	17,8	12,9	69,3	31,0	5,6	63,4	5,0	19,5	75,5
4	16,6	12,7	70,7	27,2	7,0	65,8	6,5	17,9	75,6
5	14,8	12,6	72,6	21,0	9,3	69,7	9,0	16,0	75,0

Fonte: os autores.

**Tabela 2: Composição total do sistema PEG1500/sal fosfato em pH 7,0**

Tie line	Composição total do sistema (%p/p)			Composição da fase superior (%p/p)			Composição da fase inferior (%p/p)		
	PEG	SAL	H <sub>2</sub> O	PEG	SAL	H <sub>2</sub> O	PEG	SAL	H <sub>2</sub> O
1	19,3	12,3	68,4	37,5	3,1	59,4	1,5	21,0	77,5
2	14,7	11,7	73,6	25,0	6,6	68,4	4,5	16,5	79,0
6	16,3	12,3	71,4	31,0	4,6	64,4	2,0	19,4	78,6

Fonte: os autores.

**Tabela 3: Composição total do sistema PEG1500/sal fosfato em pH 8,0**

Tie line	Composição total do sistema (%p/p)			Composição da fase superior (%p/p)			Composição da fase inferior (%p/p)		
	PEG	SAL	H <sub>2</sub> O	PEG	SAL	H <sub>2</sub> O	PEG	SAL	H <sub>2</sub> O
3	17,9	12,0	70,1	35,0	3,2	64,8	0,7	20,5	78,8
4	15,8	10,6	73,6	29,0	4,4	66,6	1,9	16,8	81,3
6	16,8	11,0	72,2	33,0	3,6	63,4	0,6	18,7	80,7

Fonte: os autores.

**Tabela 4: Composição total do sistema PEG4000/sal fosfato em pH 6,0**

Tie line	Composição total do sistema (%p/p)			Composição da fase superior (%p/p)			Composição da fase inferior (%p/p)		
	PEG	SAL	H <sub>2</sub> O	PEG	SAL	H <sub>2</sub> O	PEG	SAL	H <sub>2</sub> O
1	16,7	13,3	70,0	32,0	4,6	63,4	1,4	21,7	76,9
2	11,4	13,8	74,8	21,0	7,9	71,1	1,5	19,5	79,0
3	5,7	15,3	79,0	12,5	9,0	78,5	2,0	17,9	80,1

Fonte: os autores.

**Tabela 5: Composição total do sistema PEG4000/sal fosfato em pH 7,0**

Tie line	Composição total do sistema (%p/p)			Composição da fase superior (%p/p)			Composição da fase inferior (%p/p)		
	PEG	SAL	H <sub>2</sub> O	PEG	SAL	H <sub>2</sub> O	PEG	SAL	H <sub>2</sub> O
1	16,2	13,5	70,3	26,0	5,3	68,7	6,4	22,0	71,6
2	12,4	13,4	74,2	21,0	6,6	72,4	3,3	20,0	76,7
3	8,5	13,5	78,0	18,5	2,1	79,4	8,3	14,5	77,2

Fonte: os autores.

**Tabela 6: Composição total do sistema PEG4000/sal fosfato em pH 8,0**

Tie line	Composição total do sistema (%p/p)			Composição da fase superior (%p/p)			Composição da fase inferior (%p/p)		
	PEG	SAL	H <sub>2</sub> O	PEG	SAL	H <sub>2</sub> O	PEG	SAL	H <sub>2</sub> O
3	19,5	11,0	69,5	19,5	2,2	78,3	2,4	37,0	60,6
4	17,1	10,1	72,8	33,0	3,0	64,0	0,3	17,0	82,7
5	14,7	9,0	76,3	28,5	4,0	67,5	1,0	14,0	85,0

Fonte: os autores.

**Tabela 7: Composição total do sistema PEG6000/sal fosfato em pH 6,0**

Tie line	Composição total do sistema (%p/p)			Composição da fase superior (%p/p)			Composição da fase inferior (%p/p)		
	PEG	SAL	H <sub>2</sub> O	PEG	SAL	H <sub>2</sub> O	PEG	SAL	H <sub>2</sub> O
1	19,0	12,3	68,7	36,0	3,4	60,6	1,7	21,0	77,3
4	9,7	12,3	78,0	17,0	8,5	74,5	2,2	16,0	81,8
5	13,1	12,6	74,3	25,0	6,0	69,0	1,3	18,0	80,7

Fonte: os autores.

**Tabela 8: Composição total do sistema PEG6000/sal fosfato em pH 7,0**

Tie line	Composição total do sistema (%p/p)			Composição da fase superior (%p/p)			Composição da fase inferior (%p/p)		
	PEG	SAL	H <sub>2</sub> O	PEG	SAL	H <sub>2</sub> O	PEG	SAL	H <sub>2</sub> O
1	21,0	11,6	67,4	38,5	2,3	59,2	4,2	21,0	74,8
4	17,5	11,1	71,4	34,0	3,3	62,7	1,2	18,5	80,3
5	14,6	10,8	74,6	29,0	4,2	66,8	0,3	17,5	82,2

Fonte: os autores.

**Tabela 9: Composição total do sistema PEG6000/sal fosfato em pH 8,0**

Tie line	Composição total do sistema (%p/p)			Composição da fase superior (%p/p)			Composição da fase inferior (%p/p)		
	PEG	SAL	H <sub>2</sub> O	PEG	SAL	H <sub>2</sub> O	PEG	SAL	H <sub>2</sub> O
1	23,7	10,5	65,8	43,6	1,4	55,0	20	3,0	77,0
3	21,1	10,1	68,8	39,0	2,0	59,0	19,0	1,8	79,2
8	18,3	9,9	73,5	35,0	2,8	62,2	18,0	0,5	81,5

Fonte: os autores.

Com base nos resultados, verifica-se que não houve variação significativa entre as composições das *tie-lines* para os diferentes pesos moleculares do PEG em relação à variação de pH do sistema.

Existem muitos fatores que podem influenciar na partição de biomoléculas, entre os quais a natureza química dos componentes formadores dos SBAs, pH, temperatura, massa molar e concentração do polímero. Características como estrutura, hidrofobicidade, peso molecular, concentração e propriedades funcionais das moléculas também são fatores importantes que devem ser levados em consideração nos sistemas de partição (DA SILVA; LOH, 2006). Muitos pesquisadores têm encontrado bons resultados utilizando SBAs na partição de biomoléculas. Tais afirmações reforçam que o uso de SBAs é uma alternativa viável nas etapas preliminares de separação, principalmente no que se refere

à minimização do tempo de operação e número das etapas de purificação de biomoléculas (ANDREWS et al., 1999).

## 4 Conclusões

Analisando os resultados obtidos neste trabalho:

- na etapa de caracterização dos sistemas bi-fásicos aquosos formados por PEG/fosfato, determinaram-se os diagramas de fases e condições de pH e massa molar do polímero. A partir disso, em relação à massa molecular do PEG, pode-se concluir que foram necessárias menores concentrações de soluções para a formação de fases com PEG de maior massa molecular, conforme observado nos diferentes PEGs utilizados (PEG 1500, PEG 4000 e PEG 6000);

- por outro lado, não houve deslocamento significativo da binodal em relação aos diferentes pHs estudados nem influência do pH nas composições das linhas de amarração;
- em relação às *tie-lines*, notou-se que os valores das composições não se alteraram muito, mesmo quando os polímeros foram comparados entre si e a diferentes pHs;
- o uso dos SBAs para purificação de biomoléculas podem ser utilizados, evitando, assim, a desnaturação enzimática pela predominância de água no meio reacional.

### Effects of molar mass and ph on thermodynamics equilibrium of PEG/phosphate aqueous two-phase system

Aqueous two-phase systems have been largely used in research for separation and purification of biomolecules. These systems are obtained through the mixture of two polymers or one polymer and a salt solution. The main subject of this work was the characterization of aqueous two-phase systems from different poly (ethylene glycol) with molecular weights of 1500, 4000 and 6000 and potassium phosphate salts at pH varying from 6 to 8 at standard conditions. It was observed a displacement of the binodal towards lower polymer concentrations when PEG molecular weights increased. On the other hand, the variation of pH did not promote significant alterations on the binodal. In the tie lines, it was not possible to stabilize the values of compositions influence, even when the polymers had been compared with themselves and different pHs.

**Key words:** Aqueous two-phase systems. Phase diagrams. Tie-lines.

## Referências

ALBERTSSON, P. A. *Partition of cell particles and macromolecules*. 3. ed. New York: John Wiley & Sons, 1986.

ANDREWS, B.A.; HUENUPI, E.; ASENJO, J.A. *Industrial prospects of aqueous two-phase processes*. 11<sup>th</sup> International Conference on Partitioning in Aqueous Two-phase Systems, Alabama, USA, 1999.

BRADDOO, S.; SAXENA, R. K.; GUPTA, R. Partitioning and resolution of mixture of two lipases from *Bacillus stearothermophilus* SB-1 in aqueous two-phase system. *Proc. Bioch.* v. 35, p. 57-62, 1999.

COIMBRA, J. S. R. *Desempenho de um extrator tipo grasser na separação de proteínas do soro de queijo usando sistemas aquosos bifásicos*. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 1995.

DIAMOND, A. D.; HSU, J. T. Aqueous two phase systems for biomolecule separation *Adv. Bioch. Eng.*, v. 47, p. 89-135, 1992.

FERREIRA, J. F. *Caracterização e purificação da enzima bromelina em sistema de duas fases aquosas PEG/fosfato*. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas, 2007.

FERREIRA, G. B.; EVANGELISTA, A. F.; JUNIO, J. B. S.; SOUZA, R. R.; SANTANA, J. C. C.; TAMBOURGI, E. B.; JORDÃO, E. Partitioning optimization of proteins from *Zea mays* Malt in ATPS PEG 6000/CaCl<sub>2</sub>, *Braz. Arch. Biol. and Tech.*, v. 50, p. 557-564, 2007.

HARRIS, J.M. *Poly (ethylene glycol) chemistry: Biochemical and biomedical applications*. New York: Plenum Press, 1992.

MATIASSON, B.; LING, T. G. I. *Extraction in aqueous systems for biotechnology*. In: VENAL, N.S.; HUDSON, M.J. *Bioch. and Biotec.*, p. 270-292, 1987.

MENGE, U.; SCHMID, R. D. *Extraction and crystallization of lipase from *Mucor miehei**. Proceedings of 15<sup>th</sup> Scandinavian Symposium on Lipids, Denmark Lipidforum, p. 305-316, 1989.

MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R. M. V. *Manual de soluções, Reagentes e Solventes*. Padronização-Preparação-Purificação. 2. ed. São Paulo-SP: Edgard Blucher, 1995.

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

SARUBBO, L.A. *Caracterização de um novo sistema bifásico aquoso e aplicação em extração de proteínas com coluna de discos perfurados rotativos*. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia Química, Unicamp, Campinas, 2000.

SHARMA, R.; SONI, S.K.; VOHRA, R.M.; GUPTA, L.K., GUPTAS, J.K. Purification and characterisation of a thermostable alkaline lipase from a thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1. *Proc. Bioch.*, v. 37, p. 1075-1084, 2002.



SILVA, L. H. M. da; LOH, W. *Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas*, *Quím. Nova*, v. 29, p.1345-1351, 2006.

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

Recebido em 21 jan. 2009 / aprovado em 26 fev. 2008

**Para referenciar este texto**

FERREIRA, J. F.; PADILHA, G. da S.; TAMBOURGI, E. B. Efeitos da massa molar e do pH sobre o equilíbrio termodinâmico do sistema bifásico aquoso PEG/ fosfatos. *Exacta*, São Paulo, v. 7, n. 1, p. 49-56, 2009.