

OBTENÇÃO DE DADOS DE EQUILÍBRIO DE SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS FORMADOS POR POLIETILENOGLICOL E LÍQUIDO IÔNICO

O. R. R. GANDOLF^{1*}, G. R. F. GONÇALVES¹, J. G. PIMENTEL², R. C. F. BONOMO¹, R. C. I. FONTAN³, C. M. VELOSO³

¹Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Mestrando em Engenharia e Ciências de Alimentos.

²Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Mestranda em Ciências Ambientais

³Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Departamento de Tecnologia Rural e Animal

*e-mail: olga.gandolfi@hotmail.com

RESUMO

A busca crescente por processos seguros e eficazes de separação para materiais biológicos aliado as propriedades vantajosas do polietileno glicol (PEG) e líquidos iônicos (LI), levaram a aplicações promissoras e atraentes dos novos sistemas aquosos bifásicos. Diante disso, objetivou-se nesse trabalho a construção das binodais para sistemas aquosos bifásicos compostos por polietilenoglicol (PEG), líquido iônico (cloreto de 1-etil-3-metilimidazólio) e água. Os polímeros utilizados de diferentes massas molares foram PEG 1500 g.mol⁻¹ e PEG 4000 g.mol⁻¹. Os sistemas PEG 1500 + líquido iônico e PEG 4000 + líquido iônico foram analisados nas temperaturas de (20 e 50) °C. O efeito da temperatura nas curvas binodais foi analisado tendo em vista os dois tipos de PEG utilizados, sendo observado uma diminuição da área bifásica com o aumento da temperatura para ambos os sistemas utilizados. O efeito da massa molar também foi estudado, verificando um aumento da área bifásica nos sistemas com o PEG de maior massa molar.

1 INTRODUÇÃO

Em tempos de melhoria da engenharia molecular e projeção de proteínas, o desenvolvimento de novos e biocompatíveis métodos de extração, para a separação e purificação de enzimas e proteínas, vêm ganhando importância crescente. Dentre os processos existentes atualmente um método eficaz e economicamente viável, que é uma ramificação da extração líquido-líquido chamada de extração por Sistemas Aquosos Bifásicos (SAB's), vem destacando-se para a separação e purificação de biomoléculas. Este processo tem como princípio a utilização de duas fases aquosas imiscíveis que podem ser obtidas pela adição de duas soluções aquosas de dois polímeros hidrófilos naturais ou

sintéticos, de uma solução polimérica e uma solução salina e pela combinação de dois sais. Portanto, a separação/purificação das biomoléculas é realizada em ambiente adequado e sob condições amenas, visto que as fases de um SAB são compostas em sua maioria de água (70% a 90%), o que favorece seu uso na extração de compostos de origem biológica, uma vez que favorecem a estabilidade dos mesmos (ALBERTSSON, 1986; PEREIRA et al., 2013; SELBER et al., 2001). Esta técnica é amplamente utilizada na purificação de biomoléculas, onde as suas vantagens incluem seletividade favorável, baixo custo e adaptabilidade para o processamento contínuo da amostra e retenção da atividade biológica (KRONER et al., 1978).

SAB a base de polímeros têm sido largamente utilizados na separação e purificação de proteínas, enzimas, células do sangue e antibióticos (ALBERTSSON, 1986; ZASLAVSKY, 1995; PEREIRA et al., 2012). Entretanto, apesar de suas vantagens, SAB à base de polímeros apresentam fases com polaridades semelhantes, um fato que restringe sua aplicação, devido a baixos rendimentos de extração e/ou purificação. Já os SAB's formados por PEG e sal consiste de um grupo hidrofóbico constituída principalmente por polímeros, e uma fase hidrofílica (e iônica), compostas por sais inorgânicos de uma elevada densidade de carga (MAZZOLA et al., 2008). A gama limitada de diferenças de polaridades entre as duas fases limita assim a aplicabilidade de SAB à base de polímero convencional para fins de extração e/ou separação. No entanto, a substituição de um sal inorgânico de elevada densidade de carga e/ou um polímero por líquido iônico, pode fornecer um controle maior das polaridades das fases, uma vez o LI que pode ser escolhido adequadamente, tendo em conta a grande variedade de suas estruturas (PLECHKOVA e SEDDON 2008).

As diferenças limitadas entre as duas fases nestes sistemas convencionais, conduziu à procura de estratégias alternativas, tais como a derivatização do polímero ou a utilização de aditivos, a fim de melhorar os rendimentos de extração da molécula alvo (LI e KAO, 2003; ROSA et al., 2007; JIANG et al., 2009; PEREIRA et al., 2010).

Em particular, os novos sistemas aquosos bifásicos (SAB) à base de PEG-LI-água exibem uma gama hidrofóbico-hidrofílico mais ampla em comparação com sistemas convencionais. Esta característica tem um impacto importante na separação, uma vez que aumenta a variedade de biomoléculas que pode ser separada ou purificado por SAB (FREIRE et al 2012; PEREIRA et al 2013).

Ao se fazer um estudo da partição é necessário conhecer os dados de equilíbrio dos sistemas que serão utilizados. Para cada sistema seja polímero/polímero, polímero/sal polímero/líquido iônico existe um diagrama de fases que define as proporções entre os componentes formadores das fases. Alguns já estão disponíveis na literatura, porém, é importante ao testar um novo sistema que se construa um diagrama nas condições de trabalho a serem utilizadas na extração (temperatura, massa molar do PEG, pH, entre outros).

Diante do exposto, objetivou-se nesse trabalho estudar o comportamento do sistema de duas fases constituídos por líquido iônico (cloreto de 1-etil-3-metilimidazólio) e polietilenoglicol (1500 g.mol^{-1} e 4000 g.mol^{-1}) e água nas temperaturas de 20°C e 50°C .

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

O trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Engenharia de Processos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, campus de Itapetinga. Os reagentes utilizados na condução deste trabalho foram: cloreto de 1-etil-3-metilimidazólio ($[\text{C2min}]\text{Cl}$) da Sigma-Aldrich (USA) com grau de pureza $\geq 95\%$ e polietilenoglicol 1500 g.mol^{-1} e 4000 g.mol^{-1} da Synth, Brasil.

Nos experimentos foram empregados água destilada e todos os reagentes usados foram de grau analítico.

2.2 Métodos

2.2.1 Preparo Dos Sistemas Aquosos Bifásicos

Para montagem do sistema aquoso bifásico, composto por PEG-LI-água, serão preparadas soluções estoque de PEG em água e LI em água.

Os diagramas de fase dos sistemas aquosos foram formados utilizando soluções aquosas de PEG 1500 + LI + água, PEG 4000 + LI + água, nas temperaturas de 20°C e 50°C. Esses sistemas serão construídos pela aplicação do método turbimétrico (ALBERTSSON, 1986), que indica o início da região bifásica. O procedimento consiste em pesar 1 g da solução de PEG em tubos de vidro, para melhor visualização da turvação. O tubo contendo a solução de PEG será levado ao banho termostático e deixado até atingir o equilíbrio térmico. Em seguida, serão adicionadas gota a gota da solução de LI (50µL) com auxílio de uma pipeta automática, até ocorrer à turvação do sistema (solução bifásica). Nesse momento deverá ser registrada a quantidade de LI que provocou a turvação. Em seguida, o sistema deverá ser titulado com água destilada até o desaparecimento da turvação, registrando o seu valor. Esse procedimento deverá ser repetido continuamente até a obtenção dos pontos necessários para fazer a curva.

A equação empírica (Equação 1) foi utilizada para correlacionar os dados das binodais (WANG et al., 2010).

$$w_1 = \exp(a + b w_2^{0.5} + c w_2 + d w_2^2) \quad (1)$$

Onde w_1 é a fração mássica de polietilenoglicol, w_2 é a fração mássica de líquido iônico e a, b, c e d são parâmetros de ajuste da equação.

3 RESULTADOS

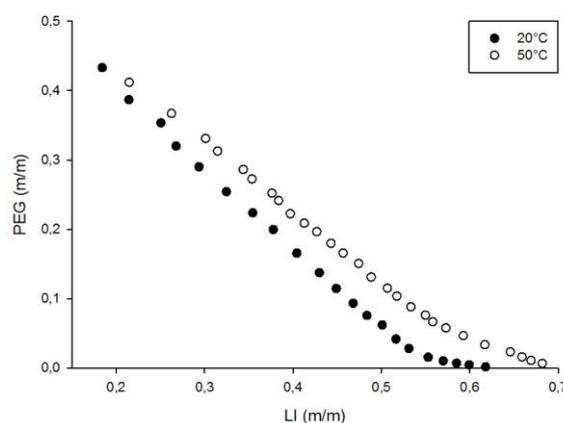
Foram realizados os estudos do efeito da temperatura e massa molar dos polímeros com a construção das curvas binodais.

3.1 Efeito da Temperatura nos Diagramas Estudados

Com o aumento da temperatura as curvas de equilíbrio tendem a se deslocarem

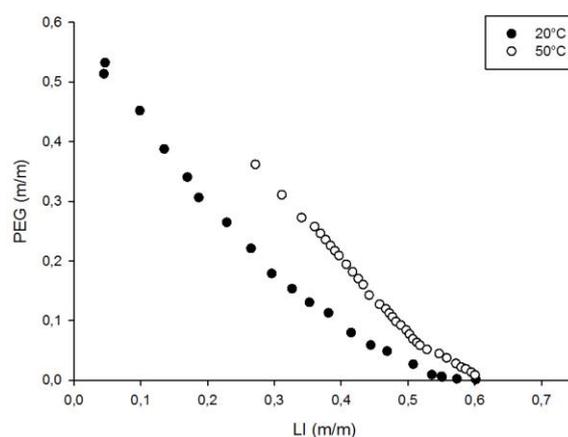
para as regiões próximas aos eixos, em sistemas mais tradicionais. Mas foi observado no sistema composto por PEG e LI que ao se aumentar a temperatura tanto para o PEG 1500 g.mol⁻¹ quanto para o PEG 4000 g.mol⁻¹ ocorreu justamente o contrário, como pode ser observado nas figuras 1 e 2.

Figura 1 - Diagramas de equilíbrio de fases para sistemas PEG 1500, LI e água nas temperaturas de 20°C e 50°C.



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 2 - Diagramas de equilíbrio de fases para sistemas PEG 4000, LI e água nas temperaturas de 20°C e 50°C.



Fonte: Dados da pesquisa.

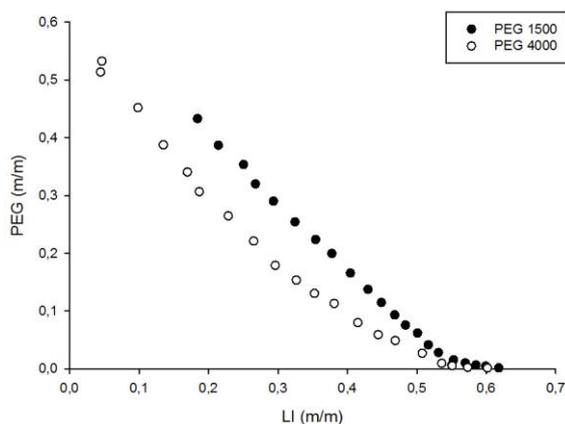
Com o aumento da temperatura foi verificado uma diminuição da região bifásica. Esse comportamento está de acordo aos

encontrado por Freire et al., (2012) que estudaram as interações que controlam o comportamento de fases compostas de PEG e LI. Esse comportamento também foi observado nos SAB compostos por líquido iônico e sais inorgânicos (DU et al., 2007; CHEN et al., 2010) e aos sistemas compostos por polímeros/polímero. Tal comportamento pode ser resultado da baixa densidade de carga dos líquidos iônicos em relação aos sais inorgânicos.

3.2 Efeito da Massa Molar do PEG nos Diagramas Estudados

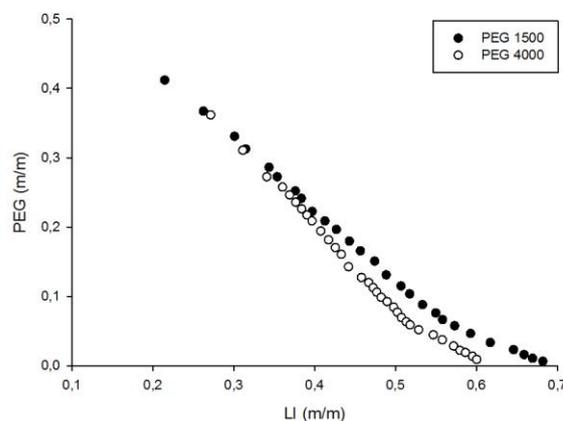
Ao se comparar os sistemas na mesma temperatura (20°C ou 50°C) e variando a massa molar do polímero (PEG 1500 g.mol⁻¹ e PEG 4000 g.mol⁻¹) como observado na figura 3 (20°C) e na figura 4 (50°C) pode-se observar que o PEG de maior massa molar apresentou uma maior região bifásica. Uma tendência semelhante foi observado no SAB convencional formados por PEG e sal inorgânico, a hidrofobicidade aumenta com o aumento do peso molecular do PEG, facilitando assim a formação do SAB. PEG de maior peso molecular, apresentam uma menor afinidade com a água.

Figura 3 - Diagramas de equilíbrio de fases para sistemas PEG 1500 e PEG 4000, LI e água na temperatura de 20°C.



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 4 - Diagramas de equilíbrio de fases para sistemas PEG 1500 e PEG 4000, LI e água na temperatura de 50°C.



Fonte: Dados da pesquisa.

Rodriguez et al. (2009) demonstraram que um aumento no peso molecular do polímero leva a intervalos maiores de imiscibilidade com líquido iônicos a base de cloreto. Por isso, polímeros com maior peso molecular são menos solúveis em líquido iônico e são mais facilmente separadas do meio aquoso.

3.3 Parâmetros Ajustados

Os valores obtidos para os parâmetros a, b, c e d da equação com seus respectivos desvios padrões e os coeficientes de determinação R² das equações ajustadas para os sistemas investigados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Parâmetros ajustados e coeficiente de determinação (R²) obtidos para o sistema LI-PEG pela equação de Hu et al., (2003)

	20°C		50°C	
	1500	4000	1500	4000
a	10,8807	-0,1163	6,1181	20,0748
b	-58,9651	-3,3229	-33,4127	-97,4960
c	84,2775	4,7119	46,1071	129,3333
d	-56,7159	-13,3305	-30,7208	-73,3310
R²	0,9979	0,9978	0,9992	0,9992

Fonte: Dados da pesquisa.

4 CONCLUSÃO

Foi possível a construção das binodais para sistemas aquosos bifásicos compostos por polietilenoglicol (PEG), líquido iônico (cloreto de 1-etil-3-metilimidazólio) e água. Constatou-se que o aumento da temperatura favoreceu uma diminuição da região bifásica, e que o aumento da massa molar polietileno glicol favoreceu um aumento da região bifásica.

NOMENCLATURA

PEG - polietilenoglicol;
LI - líquido iônico;
SAB – sistema aquoso bifásico;
 w_1 - fração mássica de polietilenoglicol;
 w_2 - fração mássica de líquido iônico;
a, b, c e d - parâmetros de ajuste da equação.

REFERÊNCIAS

ALBERTSSON, P.A. **Partition of cell and macromolecules**. New York: John Wiley, 1986, 346p.

DU, Z.; YU, Y. L.; WANG, J. H. Extraction of proteins from biological fluids by use of an ionic liquid/aqueous two-phase system. **Chem.—Eur. J.**, v. 13, p. 2130–2137, 2007.

CHEN, Y.; MENG, Y.; ZHANG, S.; ZHANG, Y.; LIU, X.; YANG, J. Liquid liquid equilibria of aqueous biphasic systems composed of 1-butyl-3-methyl imidazolium tetrafluoroborate + sucrose/maltose + water. **J. Chem. Eng. Data**. v.55, p.3612–3616, 2010.

FREIRE, M. G.; CLÁUDIO, A. F. M.; ARAÚJO, J. M. M.; COUTINHO, J. A. P.; MARRUCHO, I. M.; CANONGIA LOPES, J. N.; REBELO, L. P. N. Aqueous Biphasic Systems: A boost brought about by using

ionic liquids, **Chem. Soc. Rev.** v.41, p.4966–4995, 2012.

JIANG, Y.; XIA, H.; YU, J.; GUO, C.; LIU, H. Hydrophobic ionic liquids-assisted polymer recovery during penicilina extraction in aqueous two-phase system. **Chemical Engineering Journal**. v. 147, p.22-26, 2009.

KRONER, K. R.; HUSTEDT, H.; GRANDA, S.; KULA, M. R. Technical aspects of separation using aqueous two-phase systems in enzyme isolation process. **Biotechnol. Bioeng.** v.104, p. 217-239, 1978.

LI, J. and KAO, W. J., Synthesis of polyethylene glycol (PEG) derivatives and PEGylated-peptide biopolymer conjugates. **Biomacromolecules**, v.4, p.1055–1067, 2003.

MAZZOLA, P. G.; LOPES, A. M.; HASMANN, F. A.; JOZALA, A. F.; PENNA, T. C. V.; MAGALHAES, P. O.; RANGEL-YAGUI, C. O.; PESSOA, A. Liquid-liquid extraction of biomolecules: an overview and update of the main techniques **J. Chem. Technol. Biot.**, v. 83, p.143–157, 2008.

PEREIRA, J. F. B.; LIMA, A. S.; FREIRE, M. G.; COUTINHO, J. A. P. Ionic liquids as adjuvants for the tailored extraction of biomolecules in aqueous biphasic systems. **Green Chemistry**, v.12, p. 1661-1669, 2010.

PEREIRA, J. F. B.; SANTOS, V. C.; JOHANSSON, H. O.; TEIXEIRA, J. A.C.; PESSOA, A. A stable liquid-liquid extraction system for clavulanic acid using polymer-based aqueous two-phase systems. **Separation and Purification Technology**. v. 98, p.441-450, 2012.

PEREIRA, J. F. B.; VENTURA, S. O. M.; SILVA, F. A.; SHAHRIARI, S.; FREIRE, M. G.; COUTINHO, J. A. P. Aqueous biphasic systems composed of ionic liquid and

polymers: **A platform for the purification of biomolecules.** v. 113, p.83-89, 2013.

PLECHKOVA, N. V.; SEDDON, K. R. Applications of ionic liquids in the chemical industry **Chem. Soc. Rev.** v.37, p.123–150,2008.

ROSA, P. A. J., AZEVEDO, A. M., AIRES-BARROS, M. R., Application of central composite design to the optimisation of aqueous two-phase extraction of human antibodies, **J. Chromatogr. A**, v.1141, p. 50-60, 2007.

RODRIGUEZ, H.; FRANCISCO, M.; RAHMAN, M.; SUN N.; ROGERS, R. D. Biphasic liquid mixtures of ionic liquids and polyethylene glycols. **Physical Chemistry Chemical Physics** v. 11, p. 10916-1092, 2009.

SELBER, K.; COLLEN, A.; HYYTIA, T.; PENTTILA, M.; TJERNELD, F.; KULA, MR. Parameters influencing protein extraction for whole broths in detergent based aqueous twophase systems. **Bioseparation**, v.10, p.229-236, 2001.

ZASLAVSKY, B. Y. **Aqueous Two-Phase Partitioning**, Marcel Dekker Incorporated, New York, 1995.