

CARACTERIZACION DEL EQUILIBRIO LIQUIDO- LIQUIDO EN SISTEMAS BIFASICOS ACUOSOS.

LIQUID-LIQUID EQUILIBRIUM OF AQUEOUS TWO PHASE SYSTEMS

MG Bertoluzzo- SM Bertoluzzo- Rubén Rigatuso- G. Picó

Fac. de Cs. Bioq. y Farm. UNR
Suipacha 531- (2000) Rosario-Argentina

mgbysmb@cablenet.com.ar

Con el objeto de obtener mayor información experimental acerca del equilibrio líquido-líquido para sistemas formados por polietilenglicol y fosfato de potasio, se obtuvieron los diagramas binodiales. En estos sistemas, la denominada "curva binodial" separa dos zonas: - todas las mezclas cuya concentración en polímeros corresponda a puntos situados por encima de esta curva darán lugar a sistemas bifásicos, y todas las mezclas cuya concentración en polímero corresponda a puntos situados por debajo de esta curva darán lugar a sistemas monofásicos. La curva binodial es característica de un dado sistema bifásico acuoso bajo ciertas condiciones de pH, temperatura, presencia de sales, etc. Los diagramas binodiales se obtuvieron por el método turbidimétrico. Se observó que a medida que aumenta el peso molecular del PEG, las curvas se vuelven más asintóticas a los ejes, requiriéndose menores concentraciones de PEG para la separación de fases. Este comportamiento podría deberse a un incremento en la incompatibilidad entre los componentes debido al aumento del carácter hidrofóbico del PEG al aumentar su peso molecular.

The aqueous two-phase partitioning method of liquid-liquid extraction is useful for separating materials of biological origin. In these systems, both phases consists mainly of water, an environment suitable for biomolecules which are denatured in organic solvents. The degree of partitioning of all species in the system can be varied by changing the temperature, polymer or salt type, molecular weight and concentration of solutes. In order to obtain more information about the equilibrium of aqueous two phase systems of polyethylene glycol and potassium phosphate the binodial diagrams are obtained. Turbidimetric method was employed for obtaining these diagrams.

PALABRAS CLAVES: Sistemas bifásicos- Aislación de proteínas- Diagrama binodial
KEY WORDS: Biphasic systems- Protein separation- Binodial diagram

Introducción

La extracción de biomaterial usando sistemas bifásicos acuosos (SBA) es una herramienta poderosa para la separación y análisis de partículas biológicas. Estos SBAs se forman cuando se mezclan soluciones acuosas de dos polímeros de cadena flexible o bien un polímero y una sal por encima de una concentración crítica (sistemas preformados). En este caso espontáneamente se originan dos fases, una rica en uno de los polímeros y la otra rica en el otro polímero o la sal. Los sistemas más empleados son los polietilenglicoles (PEG) con fosfato de potasio.

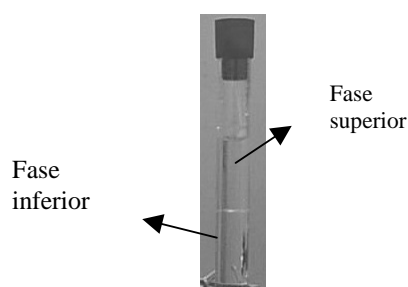


Foto 1: SBA Polietilenglicol y fosfato de potasio. Fase superior rica en PEG; fase inferior rica en fosfato

Polietilenglicol es un nombre genérico para mezclas por condensación de polímeros de óxido de etileno y agua. Se representa por la fórmula general:



Existe un buen ajuste estructural entre el agua y la macromolécula de polietilenglicol.

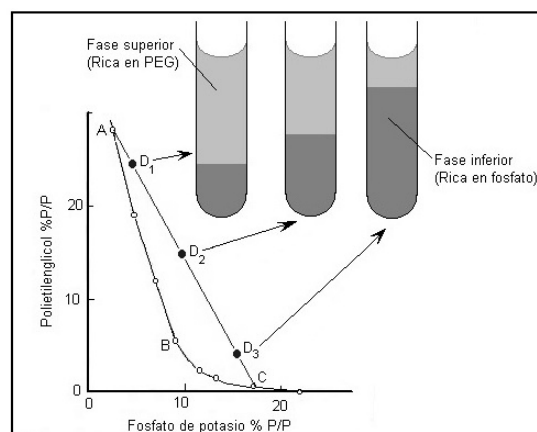
Una estructura local de agua estabilizada posiblemente debido en parte a la polarización orientacional de las moléculas de agua ligadas por puente H con la macromolécula y en parte debido a las interacciones entre moléculas de agua en la vecindad de los sitios hidrofóbicos del polímero. El oxígeno del éter de la unidad monomérica de la macromolécula de PEG está fuertemente hidratado, con dos o tres moléculas de agua ligadas por puente hidrógeno. La macromolécula de PEG afecta más moléculas de agua que con las que forma puente hidrógeno, ejerciendo una acción hacedora de estructura sobre 16 moléculas de agua por unidad monomérica. La diferencia entre la cantidad total de moléculas de agua afectadas por macromoléculas de PEG y las moléculas de agua ligadas por puente hidrógeno es 14 moléculas de agua por unidad monomérica de PEG. Estas 14 moléculas tienen distinta influencia sobre la unidad monomérica de PEG. Hay moléculas fuertemente afectadas por la unidad monomérica y otras débilmente afectadas. La distancia a la cual las capas de hidratación de las macromoléculas de PEG se superponen parece estar gobernado por la cantidad de moléculas de agua fuertemente afectadas. La cantidad de moléculas de agua débilmente afectadas determina la concentración de agua en la fase pobre en PEG cuando se produce la separación de fase.

Es claro entonces que los factores que perturben la estructura del agua tales como urea o sales inorgánicas van a afectar el proceso de separación de fases.

Por otra parte, el efecto del polímero sobre la movilidad orientacional dieléctrica del agua está gobernada por la relativa influencia estructural inmovilizante del PEG sobre las moléculas de agua. Datos experimentales muestran que el PEG disminuye la polaridad del medio.

Con el objeto de obtener mayor información experimental acerca del equilibrio líquido-líquido para sistemas formados por polietilenglicol y fosfato de potasio, se obtuvieron los diagramas binodiales.

En estos sistemas, la denominada "curva binodial" separa dos zonas: -todas las mezclas cuya concentración en polímeros corresponde a puntos situados por encima de esta curva dan lugar a sistemas bifásicos, y todas las mezclas cuya concentración en polímero corresponda a puntos situados por debajo de esta curva darán lugar a sistemas monofásicos.



La curva binodial es característica de un dado sistema bifásico acuoso bajo ciertas condiciones de pH, temperatura, presencia de sales, etc. (Zaslavsky, 1994).

Materiales y método

Los diagramas binodiales se obtuvieron por el método turbidimétrico (Hatti-Kaul, 2000). Se prepararon soluciones madres de PEG de diferentes pesos moleculares (40% p/p) y fosfato de potasio (29% p/p). Se colocó, en un tubo de vidrio graduado, 1 g de la solución madre del polímero y se le agregaron cantidades crecientes de fosfato de potasio (0,05 g). Luego de cada agregado el sistema fue agitado. La aparición de turbidez se tomó como el inicio de la separación de fases. Las concentraciones de ambos componentes inmediatamente antes de la aparición de turbidez constituyen un punto de la curva binodial y pueden calcularse a partir de las concentraciones iniciales de las soluciones, la masa inicial y final del sistema después de cada agregado.

Otros puntos de la curva se obtuvieron por el agregado de pequeñas cantidades de agua hasta la desaparición de turbidez seguida de nuevos agregados de fosfato de potasio y repitiendo el proceso antes descrito.

El ajuste de los datos experimentales se realizó con distintas expresiones, obteniéndose los mejores resultados con la siguiente expresión sigmoidea:

$$[PEG] = y_0 + \frac{a}{1 + \exp(-([Pi] - x_0) / b)}$$

donde [PEG] y [Pi] (concentraciones de PEG y fosfato respectivamente) son las coordenadas de los nodos, y_0 , x_0 , a y b son parámetros de ajuste de la ecuación.

Las líneas de unión se obtuvieron a partir de la expresión:

$$LU = \sqrt{([PEG]^T - [PEG]^B)^2 + ([Pi]^T - [Pi]^B)^2}$$

Resultados y discusión

1. Efecto del agregado de sales de sodio sobre el diagrama binodial.

2.

Fig.1 Diagrama binodial para PEG 1450 solo y en presencia de Na₂SO₄

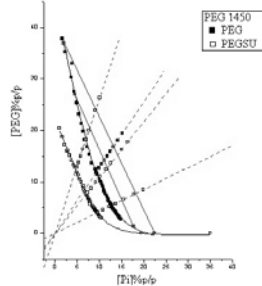


Fig.2 Diagrama binodial para PEG 1450 solo y en presencia de NaCl

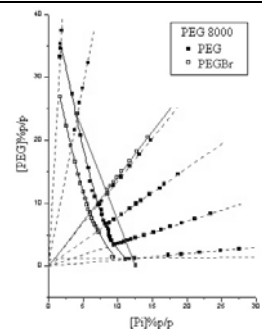
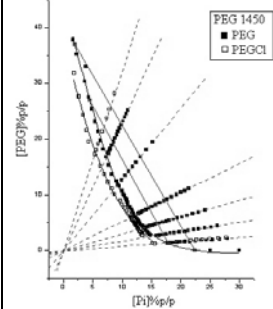


Fig.3 Diagrama binodial para PEG 8000 solo y en presencia de NaBr

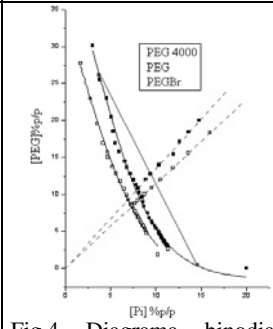


Fig.4 Diagrama binodial para PEG 4000 solo y en presencia de NaBr

En las figuras 1, 2, 3 y 4 se muestran las curvas binodiales para PEG de peso molecular 1450, 4000 y 8000, solo y en presencia de sales de sodio.

Se observa que al agregarle sal al SBA aumenta el área bifásica como resultado de un fenómeno de "salting out" del polímero originado por la sal y un efecto de "exclusión" del polímero a la sal. Este efecto se acentúa con el aumento del peso molecular del polímero.

3. Efecto de UREA sobre el diagrama binodial

Al utilizar UREA en las soluciones, modificamos la estructura del agua y observamos que disminuye la zona bifásica lo cual se podría atribuir a la pérdida de agua ordenada entorno al PEG, lo cual induciría un aumento en la solubilidad mutua entre el PEG y el fosfato, reduciéndose la zona bifásica. En la figura 5 se muestran las curvas binodiales para PEG 1450 en

presencia de Urea 2M. En la figura 6 se muestran los resultados para PEG 8000 y Urea 2M.

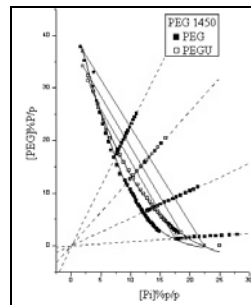


Fig.5 Diagrama binodial para PEG 1450 solo y en presencia de urea 2M.

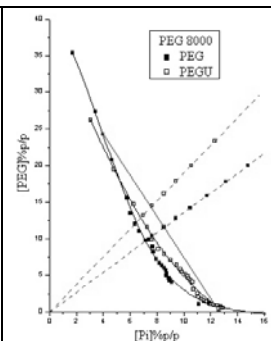


Fig.6 Diagrama binodial para PEG 8000 solo y en presencia de urea 2M.

4. Efecto del peso molecular del polímero sobre el diagrama binodial

En la figura 7 se muestra las curvas binodiales de SBAs de PEG y fosfato de potasio de distintos pesos moleculares a 22°C y pH 7.4. A medida que aumenta el peso molecular del PEG las curvas se vuelven más asimétricas y próximas al origen de coordenadas, requiriéndose menores concentraciones para la separación de fases. Este comportamiento podría deberse a un incremento en la compatibilidad entre los componentes debido al aumento del carácter hidrofóbico del PEG al aumentar el peso molecular.

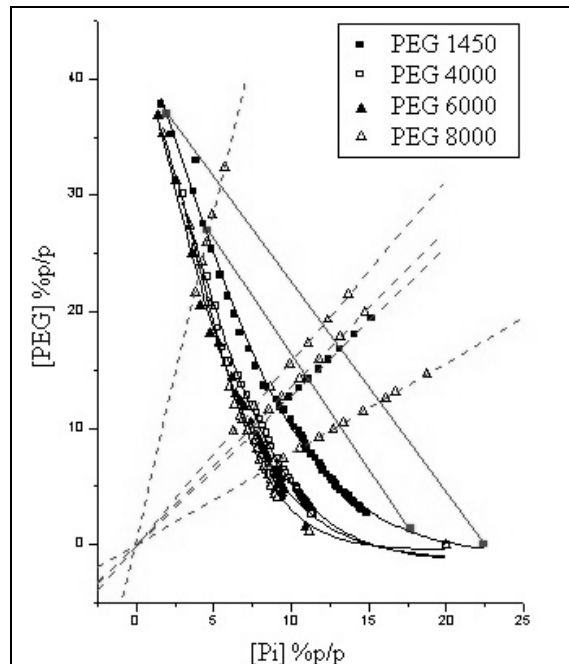


Fig.7 Diagrama binodial para PEG de peso molecular 1450, 4000, 6000 y 8000

Conclusion

La extracción líquido-líquido empleando sistemas bifásicos acuosos constituye una herramienta útil para el aislamiento de moléculas de importancia biológica. Dentro de los SBA empleados, aquél formado por PEG/fosfato resulta atractivo para la purificación de proteínas debido a ventajas comparativas con otros métodos tradicionales de purificación, como su bajo costo, rapidez, factibilidad de llevarlo a macro escala. Al presente, hay muy poca información acerca de la composición y propiedades de este sistema. Dado que este tipo de información es esencial para el diseño de un proceso extractivo, en este trabajo analizamos el efecto de diferentes condiciones del medio, tales como peso molecular del PEG y cosolutos como sales de sodio y urea sobre el equilibrio líquido-líquido de estos sistemas. Todas las curvas binodiales fueron descritas satisfactoriamente con una ecuación sigmoidea de cuatro parámetros obteniéndose coeficientes de regresión próximos a la unidad. Se observó que tanto el peso molecular como el agregado de sales de sodio, cloruro, bromuro, sulfato, fluoruro de sodio ocasiona una expansión del área bifásica y un aumento de la pendiente de la línea de unión. Basándose en los resultados obtenidos puede interpretarse la separación de fases en este tipo de sistemas bifásicos acuosos como el resultado de un fenómeno de "salting out" del polímero originado por la sal y un efecto de "exclusión" del polímero a la sal. Por otra parte, el agregado de urea a los SBA produce una disminución del área bifásica lo cual se podría atribuir a la pérdida de agua ordenada entorno al PEG, lo que induciría un aumento en la solubilidad mutua entre el PEG y el fosfato.

Referencias

- 1- Albertsson, P.A (1971), Partition of Cell Particles and Macromolecules, 2nd ed., Editora John Wiley and Sons, New York.
- 2- Harris, M. (1992). Poly(ethylene glycol). Chemistry. Biotechnical and Biomedical Applications. Editor Plenum Press, New York.
- 3- Walter, H.; Brooks, D. Y Fisher, D. (1985), Partitioning in aqueous two- phase systems. Theory, methods, uses, and application to biotechnology. Editor Academic Press, Inc., Orlando.
- 4- Zaslavsky, B. Y. (1994) Aqueous Two-phase partitioning Physical Chemistry and Bioanalytical Applications. Editor Marcel Dekker, Inc., New York