

ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL VOLUMEN ESPECÍFICO DEL POLIETILENGLICOL EN LA FORMACIÓN DE SISTEMAS BIFÁSICOS ACUOSOS

M.G. Bertoluzzo¹, S.M. Bertoluzzo^{1,2}, G. Picó¹, R. Rigatuso¹, B. Farruggia¹

¹Fac. de Cs. Bioq. y Farm.UNR-²Fac. de Cs. Médicas. UNR- Universidad Nacional de Rosario
Suipacha 531- (2000) Rosario- Argentina
e-mail: mbertolu@fbioyf.urr.edu.ar

En este trabajo se determina el volumen específico (v_e) del sistema bifásico acuoso formado por polietilenglicol (PEG) y fosfato de potasio a partir de mediciones de densidad. Se analiza la dependencia de v_e con la concentración de urea.

In this work the specific volume (v_e) of the aqueous biphasic system polyethylene glycol (PEG) and potassium phosphate from density measures is determined. The dependence of v_e with the urea concentration is analyzed.

INTRODUCCION

En los últimos años se ha incrementado el empleo de los sistemas bifásicos acuosos (SBA) en la biotecnología de obtención y purificación de proteínas, células¹, virus, fragmentos de membrana y otros materiales biológicos. Además los sistemas bifásicos se han usado para caracterizar las propiedades superficiales de biomoléculas tales como carga e hidrofobicidad². Estos sistemas 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. Los SBA en general presentan las siguientes características:

- Son sistemas donde ambas fases son fundamentalmente acuosas ya que contienen entre 80-90% de agua y por ende presentan baja presión osmótica y tensión interfacial.
- Permiten la adición de sales y otros solutos con capacidad buffer, lo que implica poder controlar su pH y fuerza iónica. Estas dos condiciones hacen que los SBA brinden un entorno adecuado para materiales lábiles como ciertas enzimas.

Las proteínas se reparten en un SBA con una determinada constante de reparto, la tendencia de una macromolécula a estar en una u otra fase depende de las condiciones experimentales como pH, fuerza iónica, sales, etc.

El objetivo general de este trabajo es obtener una ecuación de estado que permita inferir el comportamiento de un SBA ante el cambio de variables de estado como la temperatura, presencia de electrolitos y agentes caotrópicos (urea, guanidina, tiocianato).

El objetivo particular es la determinación del volumen específico de exclusión del PEG y su dependencia con la concentración de cosolutos del medio.

MATERIALES Y METODOS

Los SBA empleados se obtuvieron mezclando soluciones acuosas de polietilenglicol (PEG) de peso molecular 1500, 4000, 6000, y 8000 y fosfato de potasio pH 7,4. Los mismos se obtuvieron de acuerdo a los diagramas binodiales^{3,4} correspondientes.

Todos los puntos por encima de la curva binodial ABC (ver diagrama binodial) forman sistemas bifásicos, mientras que los puntos ubicados debajo de la curva son homogéneos.

Todos los sistemas sobre la línea AC tienen idénticas composiciones químicas de la fase superior, rica en PEG y de la fase inferior, rica en

fosfato definida por los puntos A y C respectivamente.

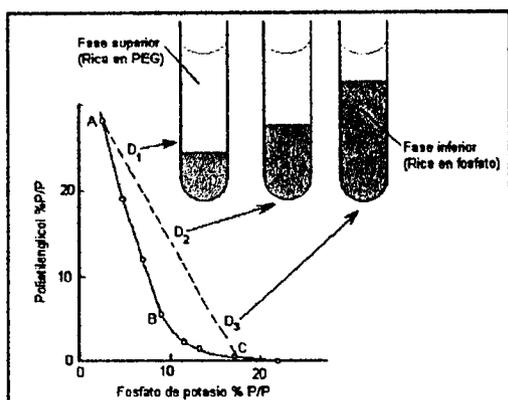


Diagrama binodial

El punto B representa un punto crítico sobre la curva donde el sistema cambia de mono a bifásico. Los sistemas D_1 , D_2 y D_3 difieren en la proporción de las fases superior e inferior ($R=V_s/V_i$). Esto resulta equivalente a $R=$ razón de longitud CD/AC .

Se tomaron concentraciones iniciales sobre la recta AC del diagrama binodial correspondiente a cada PEG de tal modo que las fases resultantes fueran de igual volumen. También se prepararon SBA en presencia de distintas concentraciones de urea como cosoluto.

Se determinó la densidad de cada fase mediante un densímetro electrónico Anton paar 35N.

Se determinó v_e del PEG/fosfato a partir de la variación de la densidad de la solución de PEG/fosfato (fase superior/fase inferior) al variar la concentración de PEG/fosfato.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

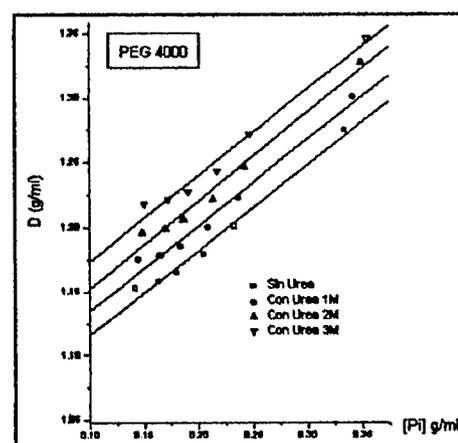
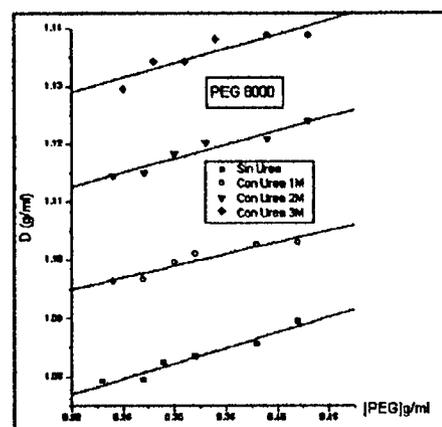
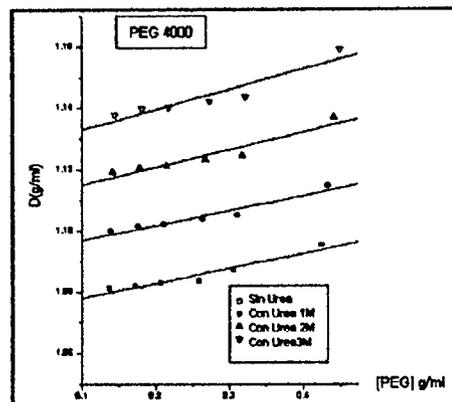
En las figuras se muestran las gráficas de densidad de las soluciones en función de la concentración de PEG 4000 y 8000 para sistemas sin urea, con urea 1M, 2M y 3M.

La densidad muestra una dependencia lineal con la concentración de PEG para la fase superior y con la concentración de fosfato para la fase inferior.

A partir de las densidades se calculó el volumen específico del PEG y fosfato para los distintos sistemas. De los resultados obtenidos se puede concluir que dicho volumen varía levemente para los PEG de distinto peso molecular. Hay una diferencia notable en el valor del volumen específico para los sistemas con urea,

siendo menor para los sistemas con mayor concentración de urea tal como se muestra en la tabla I.

La disminución del volumen específico del polietilenglicol se debe a la pérdida del agua ordenada en su entorno, la cual induce un aumento en la solubilidad mutua entre el PEG y fosfato.



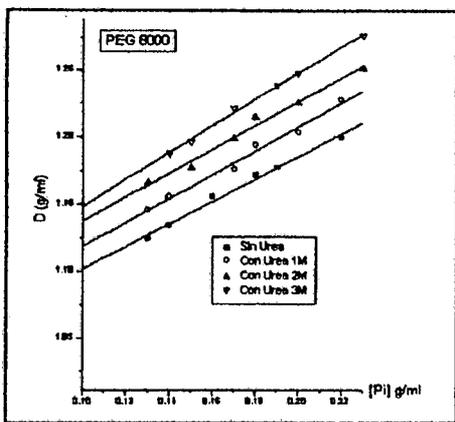


TABLA I
Volumen específico para PEG de distinto peso molecular, en presencia de distintas concentraciones de urea.

*	PEG1500	PEG4000	PEG6000	PEG8000
	v_e (ml/g)	v_e (ml/g)	v_e (ml/g)	v_e (ml/g)
0	0.89±0.01	0.88±0.02	0.90±0.01	0.89±0.01
1	0.87±0.01	0.87±0.01	0.88±0.01	0.88±0.01
2	0.85±0.01	0.85±0.01	0.87±0.01	0.86±0.01
3	0.84±0.01	0.83±0.01	0.86±0.01	0.85±0.01

*Concentración de Urea (M)

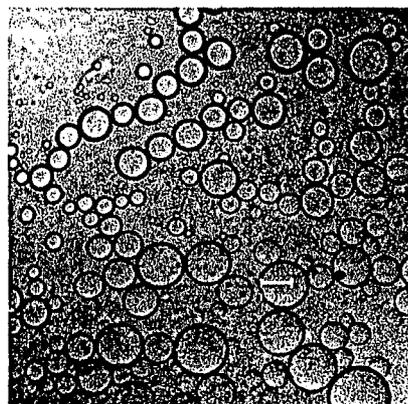
Se tomaron fotografías de emulsiones de SBA de PEG y fosfato empleando un microscopio confocal. Se calculó el valor medio del diámetro de las esférulas de PEG en solución, (ver Tabla II).

TABLA II
Diámetro de las esférulas de PEG de distinto peso molecular, en presencia de distintas concentraciones de urea

U (M)	PEG6000	PEG1500	PEG4000
	D (μm)	D (μm)	D (μm)
0	170±40	200±30	180±30
1	110±30	180±20	140±20
3	90±30	90±20	80±10

Referencias

- 1- Albertsson, P. *Partition of Cell Particles and Macromolecules*, Willey-Interscience, New York (1986).
- 2- A.D. Diamond and J.T.Hsu, Aqueous two phase systems for biomolecule separation, in: "Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology", vol 47, pp. 89-135, A. Fiechter, ed., Springer- Verlag, Berlin (1992)
- 3- Zaslavsky, B. *Aqueous two-phase partitioning. Physical Chemistry and Bioanalytical Applications*. Marcel Dekker, Inc. New York (1995).
- 4- Walter, H., Brooks, D. and Fisher, D. *Partitioning in aqueous two-phase systems*. Academic Press, Inc. London (1985).



Emulsión de SBA de PEG4000 con 3M de Urea