SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS: UMA ALTERNATIVA PARA PURIFICAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS E SIMULAÇÃO DE SISTEMAS LÍQUIDOS COMPLEXOS

Elias de Souza MONTEIRO FILHO [*]

Resumo

Sistemas aquosos bifásicos (SAB) são conhecidos há mais de 100 anos. Desde a década de 1950, têm sido sugeridos como alternativa para purificação de compostos biotecnológicos e, mais recentemente, para a simulação de soluções aquosas complexas, como alimentos, por exemplo. Apesar de razoavelmente bem estudados e compreendidos, ainda são raramente empregados em processos industriais, permanecendo como metodologia analítica laboratorial.

Palavras-chave: Sistemas Aquosos Bifásicos. Simulação. Biotecnologia

Introdução

No final do século XIX, observou-se casualmente que uma mistura de gelatina (uma proteína) e ágar (um carboidrato) em água apresentava a formação de duas fases líquidas (ALBERTSSON, 1971). O fenômeno foi tratado, na época, como uma curiosidade e permaneceu assim até a primeira metade dos anos 1950, quando ALBERTSSON iniciou novos estudos, descobrindo uma miríade de compostos que apresentavam as mesmas características quando em solução aquosa. Adicionalmente, com a observação que havia uma grande quantidade de água em ambas as fases (mais que 90 % em massa, geralmente), pesquisou a purificação de substâncias notoriamente sensíveis aos processos tradicionais, como cromatografia e extração líquido-líquido por meio de solventes orgânicos, e notou que tais moléculas preservaram sua atividade após o processo.

Estas observações deram início a uma fértil linha de pesquisa, com diferentes propósitos específicos, mas focados em duas ideias principais: a obtenção de compostos de origem biotecnológica mais puros e, com o desenvolvimento das ciências computacionais, a modelagem e simulação matemática de misturas aquosas complexas (p. ex., soluções contendo proteínas, carboidratos e sais). Atualmente, centenas de SAB são conhecidos e utilizados com diferentes propósitos, mas sempre em escala laboratorial, sendo raros os relatos de uso industrial.

O presente artigo visa descrever sucintamente os principais tipos de SAB utilizados e em quais aplicações, apontando possíveis linhas futuras de desenvolvimento e seus obstáculos mais comuns.

Revisão Bibliográfica

Termodinamicamente, fase é uma região de um sistema com propriedades intensivas únicas; densidade, temperatura e concentração de componentes, por exemplo, são constantes em uma fase em equilíbrio termodinâmico com sua vizinhança. Se um sistema termodinâmico possui mais de uma fase, os compostos presentes tenderão a distribuir-se de maneira diferenciada entre elas (SANDLER, 1989). Um exemplo é a

[*] Doutor em Engenharia de Alimentos. FATEC-Sertãozinho e FATEC-Jaboticabal. eliasjr70@gmail.com

destilação, em que uma mistura líquida é parcialmente vaporizada, separando seus componentes devido às suas diferentes volatilidades. Alguns compostos permanecem líquidos com a aplicação de calor, sendo recolhidos como produtos de base da coluna, e outros tendem a vaporizar-se e são removidos na parte superior.

Outra possibilidade é o uso de misturas líquidas que apresentam a chamada miscibilidade parcial, sendo a mistura água + óleo o exemplo mais conhecido. Neste caso, solutos dissolvidos em uma das fases tende a distribuir-se entre as duas e de maneira desigual, promovendo-se então uma separação entre eles. É o processo conhecido como extração líquido-líquido (McCABE et al., 1993).

A extração em fase líquida ou extração líquido-líquido é uma técnica empregada comumente em diversos processos industriais, sendo uma operação unitária corriqueira na indústria petroquímica. Na indústria farmacêutica, a extração com solvente orgânico é usada na produção de antibióticos. Entretanto, proteínas, organelas e fragmentos celulares, ácidos nucleicos ou mesmo células inteiras podem sofrer danos irreparáveis quando submetidas a tal processo, exigindo técnicas alternativas quando se deseja sua purificação (PESSOA Jr.; KILIKIAN, 2005; XU et al., 2001).

SAB são definidos genericamente como sistemas de duas fases líquidas imiscíveis em que o solvente principal é a água (ZASLAVSKY, 1992). Esta definição, aparentemente um tanto vaga, exclui os sistemas tradicionais formados por água e um solvente orgânico (hidrocarbonetos cíclicos ou aromáticos, alcoóis de cadeia longa, etc...) e os torna únicos. Em geral, apresentam grande quantidade de água em ambas as fases, fazendo com que sejam meios muito pouco agressivos a moléculas como enzimas, por exemplo.

Existem basicamente dois tipos de SAB: os formados por uma mistura de um polímero sintético e um sal (p. ex. poli(etileno glicol) e sulfato de potássio) e os obtidos por mistura de dois polímeros (p. ex.: poli(propileno glicol) e maltodextrina), geralmente um sintético e um carboidrato de origem natural, sempre dissolvidos em matriz aquosa. A distinção entre os dois tipos é feita quanto à aplicabilidade em termos das substâncias a serem purificadas e às necessidades operacionais: os primeiros tendem a ser menos viscosos, facilitando a separação das fases, enquanto os demais podem ser aplicáveis a determinadas substâncias que não toleram a presença de sais em concentrações maiores, que por sua vez apresentam também maiores dificuldades quanto à reciclagem ou descarte.

Um exemplo é a purificação de uma proteína recombinante obtida por fermentação. A apolipoproteína A1 obtida de Escherichia coli pode ser extraída do meio adicionando-se um polímero sintético que, acima de uma determinada temperatura, apresenta miscibilidade parcial com a água. Sob determinadas condições, a proteína tende a concentrar-se na fase rica em copolímero, enquanto os demais componentes do sistema permanecem dissolvidos na fase rica em água. Em seguida, separam-se as fases do sistema e, elevando-se a temperatura, nova separação de fases é obtida, com a proteína particionando-se desta vez para a fase rica em água e o polímero sendo coletado praticamente puro e reciclado para novo processo (PERSSON et al., 1999). Neste tipo de sistema, não houve o emprego de um terceiro componente.

Rabelo et al. (2004) utilizaram a mesma técnica para a purificação de bromelina, uma enzima presente nos frutos do abacaxi. Após triturados os frutos, o suco obtido foi filtrado e alíquotas foram adicionadas a sistemas bifásicos. Medidas laboratoriais indicaram que houve, sob condições adequadas, uma purificação adequada da enzima diretamente a partir do seu meio de obtenção, mantendo-se boa atividade e a possibilidade de aplicação tecnológica.

Alves et al. (2000) estudaram a purificação de insulina obtida de suínos, bastante semelhante à humana, simulando sua obtenção em um meio fermentado. A proteína foi satisfatoriamente purificada, mantendo sua atividade após o processo, o que indica o potencial de utilização desta metodologia na indústria farmacêutica.

Machado (1999) estudou a purificação de células inteiras (*Lactobacillus acidophilus* H2B20) por meio de sistemas aquosos bifásicos formados por poli(etileno glicol) e maltodextrina. Empregou-se como meio de fermentação o soro de queijo ultrafiltrado e o objetivo foi obter um concentrado de células possível de ser adicionado a um alimento não fermentado, tendo-se em vista eliminar o problema da baixa aceitação de produtos fermentados com o microrganismo, que por sua vez possui características benéficas. Obteve-se como resultado final um método de purificação de *L. acidophilus* H2B20 que não apenas foi capaz de preservar a atividade microbiana, mas também de suportar seu crescimento.

Uma possibilidade interessante de uso deste tipo de sistema é a chamada bioconversão extrativa. Nesta técnica, um processo de fermentação contínua é utilizado. Porém, em lugar do fornecimento de nutrientes e remoção de meio fermentado contínuos, ocorre a adição de uma fase parcialmente miscível com o meio. Idealmente, esta fase fornece os nutrientes e remove os produtos de fermentação por extração líquido-líquido, mantendo as condições ideais de operação e obtendo-se o produto desejado. Com esta técnica, é possível manter-se a concentração de substâncias inibidoras abaixo das usualmente possíveis com a fermentação contínua tradicional, otimizando-a (ZIJLSTRA, 1998).

Existem sistemas que apresentam mais de duas fases líquidas. Monteiro Filho (2009) demonstrou que sistemas contendo um determinado polímero sintético exibiu três fases em misturas aquosas contendo também maltodextrina (vide Figura 1). Embora não tenham sido feitos testes de purificação de substâncias, o autor aponta como vantagem deste tipo de sistema a maior flexibilidade para tal intento, visto que o aumento no número de fases líquidas aumenta o número de graus de liberdade para a separação de substâncias; a contrapartida é o controle mais complexo deste tipo de sistema num processo extrativo. Tan et al (2006) estudaram a partição de penicilinas G e V em um sistema trifásico formado por quatro componentes: um solvente orgânico (acetato de butila), um polímero sintético (poli(etileno glicol)), um sal (sulfato de amônio) e água. Estes autores argumentam como vantagens deste tipo de sistema na purificação do composto desejado a redução na formação de emulsões que dificultam o processo de extração e também a redução no número de etapas de purificação exigidas, visto que o produto foi coletado em uma fase e os contaminantes nas demais. Na extração líquida tradicional (fase aquosa + fase orgânica) há uma significativa presença de contaminantes na fase em que a penicilina é obtida, exigindo várias etapas adicionais de purificação.

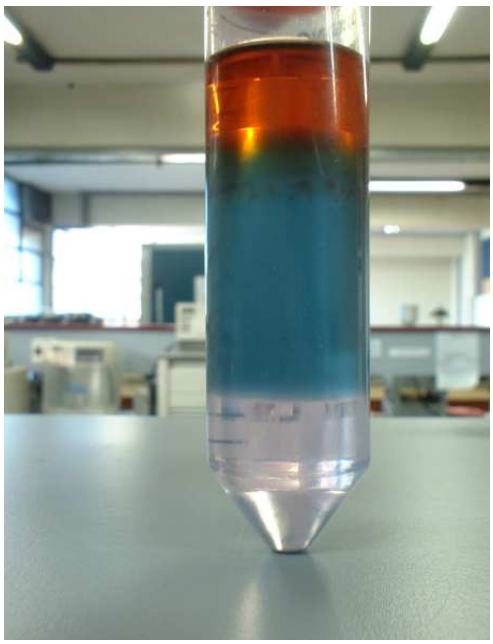

Figura 1: Sistema trifásico ilustrando a partição de dois corantes (MONTEIRO FILHO, 2009).

Aspectos Termodinâmicos

Quando se observa a separação de fases líquidas em uma mistura cujo "solvente" é a água, pode-se perguntar o porquê disto. Como água não se mistura com água? As razões para esta ocorrência envolvem dois tipos de fenômeno: um energético e outro organizacional.

Quando moléculas de um soluto são adicionadas a um solvente, ocorre uma reorganização das espécies químicas presentes na mistura. Considerando-se a não ocorrência de reações químicas (os componentes do sistema permanecem inalterados ao longo do tempo), ainda assim ligações fracas, do tipo ponte de van der Waals ou pontes de hidrogênio, são rompidas e refeitas um certo número de vezes por cada molécula de soluto adicionada. Toda ligação química, inclusive estas citadas, armazena uma certa quantidade de energia, que é liberada e logo em seguida reutilizada na formação de novas ligações. O balanço geral pode ser positivo (o sistema precisa absorver alguma energia das vizinhanças para refazer todas as ligações) ou negativo (o sistema libera energia para a vizinhança). Esta energia total absorvida ou liberada durante o processo é o que se chama Entalpia de mistura (ΔH) (SANDLER, 1989).

Além disso, as moléculas possuem um determinado volume e formato, e sempre tentam organizar-se de modo a "encaixar" umas às outras de modo a maximizar as ligações fracas e atingirem uma situação de máxima estabilidade. Ora, quanto mais possibilidades diferentes de organizar-se, maiores as chances que haja uma situação bastante confortável. As moléculas tentam, então, maximizar os modos possíveis de auto-organizar-se. O número de diferentes modos que uma coleção de indivíduos podem organizar-se é conhecido como Entropia (S), e todos os fenômenos espontâneos ocorrem sempre no sentido de maximizá-la. A dissolução de solutos em solventes, a mudança de estado de um líquido para vapor, papéis organizados em um fichário que se perdem com o vento, são todos fenômenos em que há uma variação positiva (ΔS) de

entropia, visto que o sistema ganhou graus de liberdade para organizar-se de muito mais maneiras (SANDLER, 1989).

Isto gera a seguinte questão: uma determinada molécula "prefere" manter contato com outras moléculas (o soluto) ou com semelhantes? Caso haja preferência por semelhantes, ocorre a chamada separação de fases: água e óleo (como citado anteriormente), proteínas precipitadas, água e etanol sob determinadas condições de temperatura, etc... A lista é bem grande.

No caso de misturas contendo três componentes, pode acontecer o que efetivamente ocorre com os SAB: as misturas de água com polímero sintético ou água com o carboidrato permanecem em fase única. A separação de fases ocorre com a mistura ternária, ou seja, água + polímero + carboidrato. Neste caso, o fenômeno é um pouco mais complexo: é como se o polímero e a água se entendessem bem quando misturados, assim como o carboidrato e a água. Mas carboidrato e polímero não podem coabitar a mesma região do espaço, então a situação mais confortável é cada um buscar seu próprio espaço, levando consigo uma quantidade razoável de água (JOHANSSON et al., 1998).

Quando uma proteína, por exemplo, é adicionada a tal sistema, haverá o mesmo tipo de reorganização das moléculas. Com isso, a proteína pode "preferir" a fase rica em polímero ou a fase rica em carboidrato. Se houver contaminantes na solução que contém a proteína e aqueles preferirem uma fase diferente desta, pode-se dizer que ocorreu uma purificação. Para muitos propósitos a purificação gerada pelo SAB pode resultar em uma solução contendo a proteína que é muito próxima daquela necessária à aplicação final; em outros casos apenas uma etapa adicional é necessária, no caso de proteínas ultrapurificadas (insulina injetável, por exemplo) (PESSOA Jr.; KILIKIAN, 2005).

Aspectos Ambientais

Os SAB também são bastante pesquisados devido à sua potencialidade como tecnologia ambientalmente benigna. Raghavarao et al. (2003) publicaram um artigo revisional sobre o tema, indicando que este aspecto pode ser a chave para justificar o emprego de SAB em lugar de técnicas mais baratas, pois as considerações ambientais podem inverter esta perspectiva. Em geral, as substâncias utilizadas são biologicamente inertes (polímeros sintéticos) ou biodegradáveis, no caso dos carboidratos. Em SAB polímero + sal + água, o sal deve ser convenientemente reciclado em processos que podem ser tão dispendiosos quanto a destilação de solventes orgânicos, porém sob risco menor por não serem voláteis.

Um tipo de sistema interessante sob este aspecto é aquele formado por polímeros ditos termossensíveis (TSP, do inglês *thermoseparating polymer*). Os TSP exibem uma característica interessante: existe uma temperatura, chamada temperatura de ponto de névoa (*cloud point temperature*) abaixo da qual o sistema água + polímero apresenta miscibilidade total, ou seja, são completamente miscíveis em qualquer proporção e o sistema será, consequentemente, monofásico. Entretanto, acima desta temperatura, ocorre a formação de uma fase rica em polímero e outra rica em água. À medida que se eleva a temperatura, a separação intensifica-se, chegando a um ponto em que coexistirão uma fase de polímero e outra de água praticamente puros. Este tipo de sistema também

é empregado em extração líquido-líquido de substâncias sensíveis ao meio e apresentam excelentes possibilidades de reciclagem do polímero. Johansson et al. (1998) indicam este tipo de sistema para situações em que a substância a ser purificada deve ser extraída de uma fase aquosa a uma dada temperatura e em seguida deve retornar a uma fase aquosa a uma outra temperatura para reciclagem do polímero.

Simulação Computacional

Outra possibilidade aberta pelos SAB é a simulação em computador de misturas dos polímeros. Esta simulação é importante quando se deseja conhecer em maiores detalhes como as substâncias interagem entre si, visto que a ideia básica da separação de fases envolve tais interações.

Bruin (1999) indica que em diversos produtos alimentícios ocorrem misturas de substâncias que promovem a separação de fases. Por exemplo, em sorvetes coexistem na matriz aquosa uma fase oleosa (gordura do leite), além de proteínas e carboidratos que também podem separar-se em duas fases ricas em água. Estas características são importantes do ponto de vista sensorial, influenciando significativamente como o consumidor percebe características como a textura do alimento. Além disso, aromas e corantes podem ser convenientemente preservados ou liberados durante a vida útil do produto.

Para que uma mistura seja corretamente representada em computador, medidas experimentais devem ser realizadas. Usualmente mistura-se quantidades conhecidas dos componentes do sistema desejado, mantém-se um dado tempo sob condições controladas e, após a separação completa das fases, mede-se a composição de cada uma delas, ou seja, as concentrações dos componentes. Com este procedimento, pode-se obter um diagrama representativo das diferentes misturas possíveis de ser obtidas, o chamado diagrama de fases. Um diagrama de fases típico está ilustrado na Figura 2 (MONTEIRO FILHO, 2009).

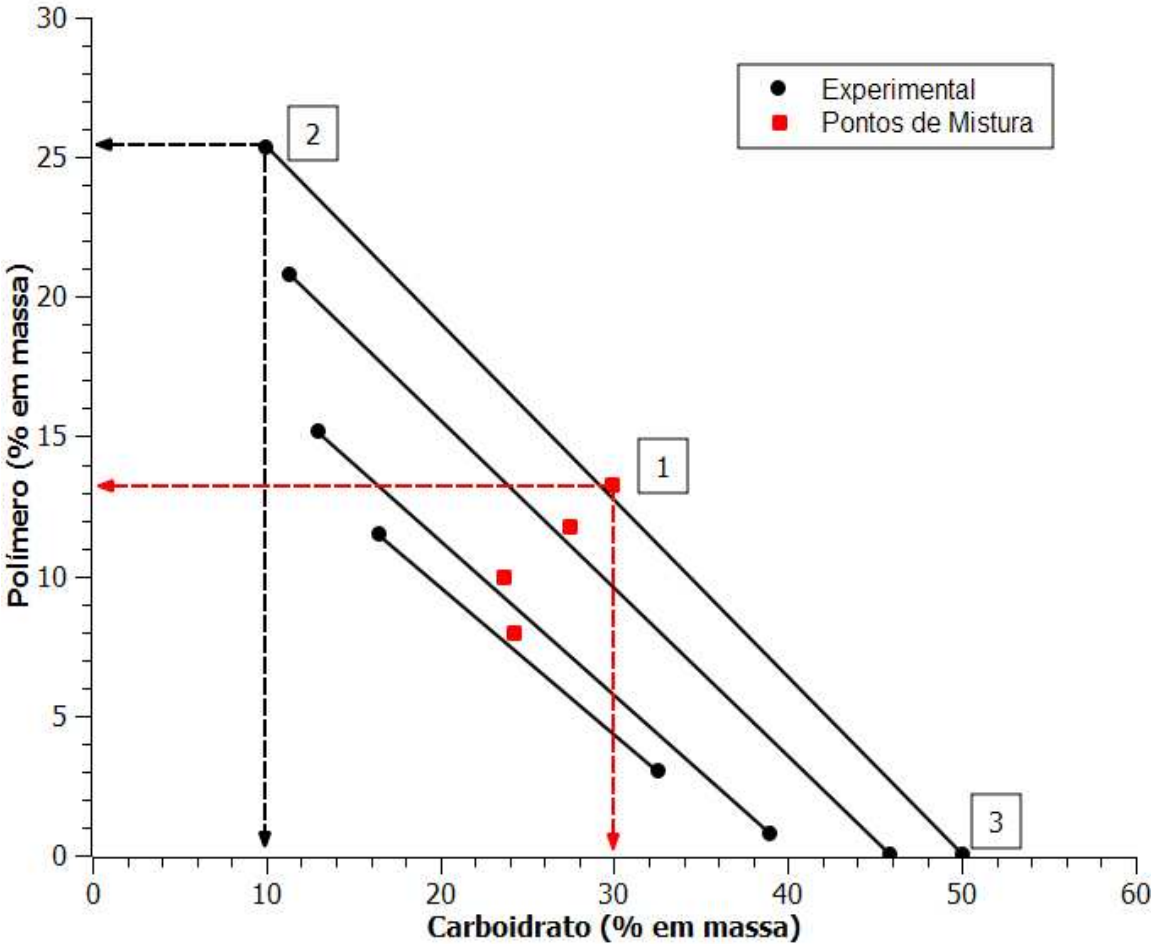

Figura 2: Diagrama de fases representativo do equilíbrio líquido-líquido de um SAB contendo um polímero sintético e um carboidrato (MONTEIRO FILHO, 2009).

Neste diagrama, o ponto 1 representa a mistura preparada. A composição é lida do seguinte modo: traça-se uma linha vertical (tracejado vermelho vertical) até que esta intercepte o eixo horizontal e lê-se a composição em carboidrato, neste caso 30% em massa; uma linha horizontal originando-se do mesmo ponto até a interseção com o eixo vertical fornecerá a composição em polímero, cerca de 13% em massa neste caso. A soma dá 43% aproximadamente, e os restantes 57% são água.

Esta mistura irá separar-se em duas fases líquidas distintas, em equilíbrio termodinâmico entre si, e suas composições são obtidas do mesmo modo. A fase rica em polímero apresentará a composição representada pelo ponto 2, cujas concentrações são, aproximadamente, 25% de polímero, 10% de carboidrato e o restante em água, e a fase rica em carboidrato terá as composições descritas pelo ponto 3, praticamente isenta de polímero, 50% de carboidrato e 50% de água. A composição 1 é preestabelecida, enquanto as 2 e 3 são obtidas por meio de análises em laboratório após o equilíbrio.

Estas medidas experimentais podem ser analisadas por meio de modelos matemáticos. Tais modelos levam em consideração os fenômenos descritos anteriormente: as

interações entre as moléculas e o modo como organizam-se na solução. Com isso, um modelo bem estabelecido é capaz de estimar composições diferentes das estudadas, ou até mesmo simular sistemas ainda inéditos.

Futuras Possibilidades

Ainda há uma miríade de sistemas inexplorados e de substâncias potencialmente aptas à purificação por meio de SAB. A Engenharia Genética e a Biotecnologia produzem muitas novas moléculas continuamente. Novas substâncias capazes de apresentar comportamento multifásico em mistura aquosa são descobertas com frequência e o leque amplia-se.

Recentemente, em congresso realizado no Reino Unido, a discussão principal foi o futuro da técnica (PESSOA Jr., 2009). Sabe-se que há emprego em operações industriais; porém, dado seu caráter sigiloso, tais aplicações não são descritas em publicações especializadas. Há portanto um caminho a ser explorado, pois a viabilidade econômica já é bem estabelecida e os SAB são considerados no meio científico como tecnologia suficientemente madura para uso na indústria (RITO-PALOMARES, 2004).

Conclusão

Sistemas aquosos bifásicos podem ser utilizados na purificação de diversas substâncias de origem biotecnológica. Sua aplicação industrial depende de maiores estudos, indicativos da possibilidade de reciclagem dos componentes, de sua produção em escala, de conscientização da indústria no tocante a tecnologias benignas ao meio ambiente e do custo inerente à substância purificada. Várias situações já demonstraram seu potencial de uso, restando provarem-se adequados o suficiente para um reinvestimento em tecnologias inovadoras.

Abstract

Aqueous two-phase systems (ATPS) are systems formed by either a synthetic polymer and a carbohydrate dissolved in water, or by a synthetic polymer and a salt. They are gaining increasing attention in biotechnology due to their mild medium conditions for liquid-liquid extraction and environmentally benign features. Also, computer simulation of complex mixtures may arise from knowledge proportioned by ATPS.

Keywords*: Aqueous two-phase system. Biotechnology. Computer simulation.*

Referências

ALBERTSSON, P. A. **Partition of Cell Particles and Macromolecules**. Ed. John Wiley & Sons, 2nd Ed., New York, 1971.

ALVES, J. G. L. F. ; CHUMPITAZ, L. D. A.; SILVA, L. H. M.; FRANCO, T. T. ; MEIRELLES, A. J. A. Partitioning of whey proteins, bovine serum albumin and porcine insulin in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B** 1+2 (743) (2000), 235-239.

BRUIN, S. Phase equilibria for food product and process design. **Fluid Phase Equilib.** 158, 160 (1999), 657-671.

JOHANSSON, H.-O.; KARLSTRÖM, G.; TJERNELD, F.; HAYNES, C. A. Driving forces for phase separation and partitioning in aqueous two-phase systems. **J. Chromatogr. B** 1+2, (711) (1998), 3-17.

MACHADO, F. L. C. **Dados de equilíbrio de fases para sistemas aquosos bifásicos compostos por poli(etileno glicol) + maltodextrina + água.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1999.

McCABE, W. L.; SMITH, J.; HARRIOT, P. **Unit Operations of Chemical Engineering**. 5ª ed., New York: McGraw-Hill, Inc., 1993.

MONTEIRO FILHO, E. S. **Equilíbio de Fases de Sistemas Contendo Polímeros Sintéticos e Carboidratos em Meio Aquoso**. Campinas: UNICAMP, 2009. 259 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos , Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

PERSSON, J.; NYSTROM, L.; AGELAND, H.; TJERNELD, F. Purification of recombinant and human apolipoprotein A-1 using surfactant micelles in aqueous two-phase systems: Recycling of thermoseparating polymer and surfactant with temperature-induced phase separation. **Biotechnol. Bioeng.**, 65 (1999), 371-381.

PESSOA Jr., A.; KILIKIAN, B. V. (coordenadores) **Purificação de Produtos Biotecnológicos**. 1ª ed. São Paulo: Manole, 2005.

RABELO, A. P. B.; TAMBOURGI, E. B.; PESSOA Jr., A. Bromelain partitioning in two-phase aqueous system containing PEO-PPO-PEO block copolymers. **J. Chromatogr. B**, 807 (2004), 61-68.

RAGHAVARAO, K. S. M. S.; RANGANATHAN, T. V.; SRINIVAS, N. D.; BARHATE, R. S. Aqueous two-phase extraction – an environmentally benign technique. **Clean Tech. Environ. Policy** 5 (2003), 136-141.

RITO-PALOMARES, M. Practical application of aqueous two-phase partition to process development for the recovery of biological products. **J. Chromatogr. B**, 807 (2004) 3–11.

SANDLER, S. I. **Chemical and Engineering Thermodynamics**. 2ª ed. New York: John Wiley & Sons, 1989.

TAN, X.-d.; JI, Q.-r.; CHANG, Z.d. Partition behavior of penicillin in three-liquid-phase extraction system. **Chin. J. Proc. Eng.** 3 (6) (2006), 363-368.

XU, Y.; SOUZA, M. A.; RIBEIRO-PONTES, M. Z.; VITOLO, M.; PESSOA Jr., A. Liquid-liquid extraction of pharmaceuticals by aqueous two-phase systems. **Braz. J. Pharm. Sci.** 37 (3) (2001), 305-320.

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

ZIJLSTRA, G. M.; de GOOIJER, C. D.; TRAMPER, J. Extractive bioconversions in aqueous two-phase systems. **Curr. Op. Biotech.** 2 (9) (1998), 171-176.