

Aplicação de sistemas aquosos bifásicos na purificação de tetraciclina

Application of aqueous biphasic systems in the purification of tetracycline

 <https://doi.org/10.56238/cienciasaudeestuepesv1-016>

Igor Adriano de Oliveira Reis

Samuel Bruno dos Santos

RESUMO

A produção de moléculas de interesse para a indústria biotecnológica, como as de alimentos, farmacêutica e bicomustível, depende estritamente das técnicas de extração e do grau de pureza das biomoléculas. Devido à complexidade desses biocompostos, as técnicas de extração e purificação são invariavelmente mais refinadas, o que se reflete nos custos do processo e consequentemente no valor do produto final. Portanto, é muito importante o desenvolvimento de uma metodologia simples, rápida, de fácil capacidade de recuperação, baixo custo e eficiente para a extração das biomoléculas. Dentre as técnicas utilizadas, pode-se destacar o sistema aquoso bifásico que se baseia na partição da biomolécula para uma fase e os componentes contaminantes para a fase oposta. O objetivo deste trabalho foi avaliar o processo de partição do antibiótico (tetraciclina) em sistemas aquosos bifásicos formados por componentes de baixo custo como alcoóis (metanol, etanol, 1-propanol e 2-propanol) e sais de fosfato de potássio (K_3PO_4 , K_2HPO_4 e K_2HPO_4/KH_2PO_4 - solução tampão). A depender dos constituintes dos sistemas as biomoléculas poderiam migrar para a fase de topo ($K > 1,0$) ou fase de fundo ($K < 1,0$), no processo de otimização das biomoléculas privilegiou-se a partição para a fase rica em álcool (fase de topo), neste sentido os melhores valores para o coeficiente de partição foram para tetraciclina ($K = 2,98$ usando 2-propanol – 60%, K_3PO_4 – 20%, NaCl 5% a 308,15 K). Também foi otimizada a partição da tetraciclina para a fase rica em sal ($K = 0,39$ usando etanol – 60%, tampão fosfato – 17,5%, a 308,15 K).

Palavras-chave: SAB, Tetraciclina, Purificação.

ABSTRACT

The production of molecules of interest to the biotechnology industry, such as food, pharmaceuticals and biofuels, is strictly dependent on extraction techniques and the degree of purity of the biomolecules. Due to the complexity of these biocompounds, extraction and purification techniques are invariably more refined, which is reflected in the costs of the process and consequently in the value of the final product. Therefore, the development of a simple, fast, easily recoverable, low cost and efficient methodology for the extraction of biomolecules is very important. Among the techniques used, we can highlight the aqueous two-phase system that is based on the partition of the biomolecule to one phase and the contaminant components to the opposite phase. The objective of this work was to evaluate the partition process of the antibiotic (tetracycline) in aqueous biphasic systems formed by low cost components such as alcohols (methanol, ethanol, 1-propanol and 2-propanol) and potassium phosphate salts (K_3PO_4 , K_2HPO_4 and K_2HPO_4/KH_2PO_4 - buffer solution). Depending on the constituents of the systems the biomolecules could migrate to the top phase ($K > 1.0$) or bottom phase ($K < 1.0$), in the process of optimizing the biomolecules the partition to the alcohol-rich phase (top phase) was favored, in this sense the best values for the partition coefficient were for tetracycline ($K = 2.98$ using 2-propanol - 60%, K_3PO_4 - 20%, NaCl 5% at 308.15 K). The partitioning of tetracycline to the salt-rich phase was also optimized ($K = 0.39$ using ethanol - 60%, phosphate buffer - 17.5%, at 308.15 K).

Keywords: SAB, Tetracycline, Purification.

1 INTRODUÇÃO

A utilização de moléculas obtidas de origem vegetal, animal e microbiana em diversos setores industrial têm evoluído com o passar dos anos, principalmente devido ao surgimento de diversas técnicas de extração. Este interesse crescente é fortalecido pela alta demanda das indústrias farmacêutica (interessada em novos antimicrobianos puros), alimentícia (interessada na obtenção de produtos probióticos e nutracêuticos) por produtos com alto grau de pureza, além da indústria de biocombustível (interessada na obtenção de óleos vegetais, enzimas e bio-óleo) que podem apresentar diferentes graus de pureza. Desta forma, torna-se necessário escolher métodos de extração que não danifiquem as biomoléculas, as quais são extremamente sensíveis à temperaturas elevadas de extração, presença de elementos químicos dentre outras.

A extração e purificação de biocompostos utilizada na indústria consistem em processos formados por sistemas tradicionais com a utilização de solventes orgânicos, a quente ou a frio (CHUNG *et al.*, 2010), agentes quelantes e precipitantes (ANDREO e JORGE, 2006), técnicas cromatográficas (WANG, 2011) e de forma menos tradicional a aplicação de fluídos supercríticos (PARK *et al.*, 2012), ultrassom (JUN, 2009) e radiação micro-ondas (CHAN *et al.*, 2011). Essas técnicas consomem quantidades elevadas de solventes ou são procedimentos dispendiosos e pode apresentar condições que sejam danosas às biomoléculas.

Uma técnica que desponta para a extração de biomoléculas são os sistemas aquosos bifásicos, que podem ser formados utilizando uma série muito grande de compostos como polímeros (polietileno glicol, dextrana e maltodextrina), sais orgânicos (fosfato de potássio, citrato de sódio), líquidos iônicos (principalmente da família do imidazólium) e alcoóis. Estes sistemas apresentam como maiores vantagens a ampliação de escala e de fácil montagem, além da alta concentração de água (70 a 95%) que oferecem um ótimo meio para biomoléculas sensíveis, baixa tensão interfacial que facilita a migração das biomoléculas e também de partículas celulares entre as fases e ainda minimiza o risco de comprometimento da estrutura de células e proteínas (HASMANN *et al.*, 2008), entretanto algumas desvantagem econômica estão associadas. Em comparação com outros métodos de purificação o alto custo dos polímeros como a dextrana levou a aplicação de sistemas baseado em sais, neste trabalho foca-se na utilização de alcoóis e sais, ambos de baixo custo e de certa forma abundante na região do país que o trabalho é desenvolvido.

Para a aplicação do sistema aquoso bifásico, é necessário o conhecimento prévio dos diagramas de fase dos sistemas em estudo, por este motivo as curvas binodais para todos os sistemas utilizados e as linhas de amarração que prevêem a composição das fases de topo e fundo para alguns pontos de mistura foram realizadas. Cabe ressaltar a importância deste procedimento para o entendimento dos efeitos associados durante a partição de biomoléculas, além do ajuste matemático inserido.

A literatura científica tem apresentado alguns trabalhos de partição em sistemas alcoóis e sais (OOI *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2010), porém a otimização das condições do processo de partição das biomoléculas não são inteiramente estudadas, portanto este trabalho aplica a variação dos tipos e concentrações dos álcoois e sais de fosfato de potássio, da temperatura e da adição dos eletrólitos, tornando

o trabalho inovador. As moléculas estudadas foram escolhidas como modelo a tetraciclina para a tentativa de obtenção de processos de extração em antibióticos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS

Para a aplicação de biomoléculas faz-se necessário o desenvolvimento de técnicas de extração e, dependendo da aplicação, um procedimento de purificação adequado deve ser desenvolvido.

Na extração de biocompostos podem ser empregadas diferentes técnicas, dentre elas a mais frequentemente empregada é a extração com solventes orgânicos a frio ou a quente, o tipo de solvente utilizado depende da polaridade das biomoléculas, entretanto o processo é limitado devido à capacidade dos solventes em isolar a molecular alvo (MARINOVA e YANISHLIEVA, 1997). Outro método de extração é a inclusão de quelantes que surgiu pela dificuldade de determinação de micronutrientes disponíveis, são utilizados com objetivo de extrair maiores quantidades de biocompostos (ANDREO e JORGE, 2006). Entretanto devemos considerar os efeitos tóxicos de resíduos em ambos os processos, justificando assim a importância da busca de novas técnicas de extração que minimizem a produção de resíduos ao meio ambiente, como a aplicação de fluido supercrítico nas extrações.

As indústrias alimentícias, cosméticas e farmacêuticas utilizam a extração supercrítica na substituição de processos de extração convencionais na obtenção de óleos essenciais, produzindo extratos livres de resíduos e a temperatura ambiente (ZANCAN *et al.*, 2002).

O processo de separação e purificação é fundamental na obtenção e aplicação industrial de um biocomposto. A escolha do processo de separação e purificação de algumas substâncias bioativas deve ser feita levando em consideração um alto grau de purificação. Além disso, o processo deve ser simples e barato, evitando sucessivas etapas. Em geral, a fase de purificação é a etapa que mais contribui para o custo total de obtenção de uma biomolécula. Em comparação as técnicas citadas anteriormente, a partição em sistema aquoso bifásico é uma alternativa bastante eficiente para a separação e purificação de bioprodutos como proteínas. As vantagens do sistema líquido-líquido oferecidas por este tipo de sistema são: ambiente biocompatível, baixa tensão interfacial, baixa energia, fácil aplicação em grande escala, operação contínua e alta sensibilidade no reconhecimento das interações das proteínas ligantes (SELVAKUMAR *et al.*, 2010).

2.2 SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS

Os sistemas aquosos bifásicos são conhecidos desde o final do século XIX, quando Beijerinck percebeu a separação espontânea em duas fases líquidas límpidas ao misturar soluções aquosas de gelatina com ágar ou amido solúvel. Posteriormente, pesquisadores como Ostwald e Hertel, e Dobry e Boyer-Kawenoki estudaram sobre esses sistemas, porém, foi apenas com os trabalhos de Albertsson, em meados da década de 50, que ficou evidente para a comunidade científica a grande potencialidade de aplicação desta técnica para a partição/purificação de biocompostos (ZAFARANI-MOATTAR e NASIRI, 2010).

De forma geral, os sistemas aquosos bifásicos são formados pela mistura de dois polímeros ou de um polímero e um sal acima de certas concentrações críticas resultado em duas fases imiscíveis, onde as duas fases líquidas são formadas contendo como maior constituinte a água e diversos solutos, como macromoléculas biológicas, podem ser distribuídas desigualmente em cada fase (GARZA-MADRID *et al.*, 2010). A Tabela 1 classifica as composições dos SABs em dois grupos (polímero/polímero e polímero/sal), os quais são aplicados a diferentes biomoléculas a serem extraídas e/ou purificadas.

Tabela 1: Sistemas Aquosos bifásicos típicos

| Polímero | Polímero |
|----------------------|---|
| Polietileno Glicol | Dextrana(Dx) |
| | Ficoll |
| | Hidroxipropil-amino (HPS) |
| | Polivinil álcool (PVA) |
| | Polivinil pirrolidona (PVP) |
| | Maltodextrina (MD) |
| | Maltodextrina |
| Polipropileno glicol | Polietileno Glicol (PEG) |
| Polímero | Sal |
| PEG-copolímeros | (NH ₄) ₂ SO ₄ |
| | NH ₂ CO ₂ NH ₄ |
| | Na ₂ HPO ₄ |
| | K ₂ PO ₄ |
| | K ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄ |
| | Na ₂ SO ₃ |
| | FeSO ₄ |

Fonte: Autoria própria.

Os SABs formados por PEG + dextrana ou PEG + sais são amplamente utilizados devido à disponibilidade em grandes quantidades no mercado por não serem tóxicos e apresentarem alta seletividade. E os SABs ainda possuem potencial de reuso dos reagentes utilizados e de forma geral mantém a integridade das enzimas em condições otimizadas (FERREIRA *et al.*, 2011). Por outro lado, apresentam algumas limitações como a desnaturação de biomoléculas em altas concentrações de sais (SILVA e MEIRELLES, 2000). A literatura relata que os SABs formados por PEG + dextrana possuem elevado custo, tornando inviável a sua aplicação em escala industrial(COIMBRA, 2003).

O PEG e seus derivados têm sido amplamente utilizados em alimentos, cosméticos, sabões e medicamentos, isso devido a suas propriedades de atoxicidade e por não ser considerado antigênico nem imunogênico (COIMBRA , 2003).

Os SABs têm sido usados por mais de 30 anos na concentração e purificação de proteínas e na bioconversão extrativa de proteínas (MADURO *et al.*, 2005). Esta técnica de separação vem sendo aplicada em outros segmentos como no tratamento de efluentes industriais e na indústria de papel e celulose (WAZIRI *et al.*, 2003). São também utilizados na remoção de íons metálicos (HANSON *et al.*, 1992),

compostos aromáticos de óleo (MAZZERA *et al.*,1999) e poluentes orgânicos do meio ambiente (ROGERS *et al.*, 1998).

Diversos pesquisadores tem utilizado este tipo de sistema para a purificação de diversas biomoléculas, como albumina (YAN-MIN *et al.*,2010), trytofano (PEREIRA *et al.*, 2010), aminoácidos (DOMINGUEZ-PEREZ *et al.*, 2010), antibióticos (WANG *et al.*, 2010) e cafeína (TELLO *et al.*, 2011). Segundo Rawdkuen *et al* (2010), a efetividade do sal é determinada principalmente pela natureza do componente e segue a seguinte ordem de eficácia: para ânions $SO_4^{2-} > HPO_4^{2-} > CH_3COO^- > Cl^-$ e para cátions $NH_4^+ > K^+ > Na^+ > Li^+ > Mg^{2+} > Ca^{2+}$.

Wang *et al.*, 2010 estudaram a influência de diferentes sais na purificação de antibióticos. Utilizando os sais sulfato de amônia e observaram que aumentou o rendimento do coeficiente de partição de 30,03% para 87,7%. Salabat (2001) também verificaram a influência de diferentes sais na partição, recuperação e fator de purificação de biomoléculas usando polietilenoglicol, e observaram que dentre os sais testados (sulfato de magnésio, sulfato de amônio, sulfato de sódio) o sulfato de amônio apresentou os melhores resultados, partição da biomolécula.

Na aplicação industrial o principal sal utilizado é o fosfato devido ao seu baixo custo e ao alto coeficiente de partição de biomoléculas, porém altas concentrações deste sal podem acarretar problemas no equilíbrio do SAB (desnaturação de biomoléculas) e ambiental (YAN-MIN *et al.*,2010). Algumas biomoléculas extraídas pelos SABs são descritas na tabela 2.

Tabela 2: Exemplos de biomoléculas extraídas utilizando diferentes composições de SABs.

| Componente 1 | Componente 2 | Biomolécula | Referência |
|---------------------|-----------------------|--------------------|--------------------------------------|
| Líquido Iônico | Aminoácidos | Cafeína | Dominguez-Perez <i>et al.</i> , 2009 |
| Copo-polímeros | Fosfato de Potássio | Insulina | Haraguchi <i>et al.</i> , 2003 |
| Triton X-100 | Sulfato de sódio | Proteína | XIE <i>et al.</i> , 2005 |
| Líquido Iônico | Hidróxido de Potássio | Triptofano | Wang <i>et al.</i> , 2010 |
| Líquido Iônico | Fosfato de Potássio | Lipase | Ventura <i>et al.</i> , 2011 |
| Álcool | Citrato de Sódio | Lipase | Ooi, <i>et al.</i> , 2009 |

Fonte: Autoria própria.

2.3 ANTIMICROBIANO

Um composto denominado como agente antimicrobiano é aquele capaz de matar ou inibir o crescimento de microrganismos. Estes podem ser antibacterianos quando especificamente atuar em bactérias, ou antifúngicas com atuação em fungos. Nos Estados Unidos foram produzidos 25 mil toneladas de antimicrobianos no ano de 2004 (WANNMACHER e KUCHENBECKER, 2004).

Os compostos antibacterianos são classificados quanto à estrutura química e quanto à origem, os quais podem ser naturais, semi-sintéticos e sintéticos. Com os avanços da química medicinal, a maioria dos antibacterianos são modificações semi-sintéticas de diversos compostos naturais. Estes incluem, por exemplo, os antibacterianos beta-lactâmicos, que incluem as penicilinas, as cefalosporinas, e os carbapenêmicos. As sulfonamidas, as quinolonas, e a oxazolidinonas são produzidas apenas por síntese

química. Outro sistema de classificação é baseado na atividade biológica; nesta classificação antibacteriana são divididos em dois grandes grupos de acordo com seus efeitos biológicos sobre os microrganismos: agentes bactericidas matam as bactérias e agentes bacteriostáticos desacelerar ou interromper o crescimento bacteriano (VON NUSSBAUM,2006).

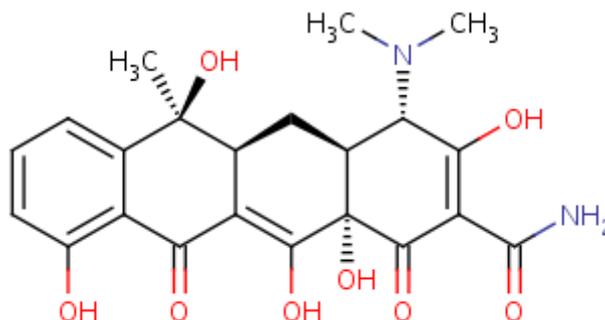
A produção destes compostos é realizada por processos biológicos ou por meio de síntese química. A produção dos antimicrobianos por via fermentativa utiliza como agentes biológicos bactérias ou fungos. Uma vez produzidos, estes compostos devem ser purificados, e neste sentido são utilizadas diversas técnicas como a precipitação, filtração, sistema aquoso bifásico (WANG *et al.*, 2010) e cromatografia (FOUNTORA e BRANDELLI, 2008).

A maioria dos antibióticos tem como o alvo as funções bacterianas ou seus processos de crescimento, agindo na parede celular das bactérias (tais como penicilinas e cefalosporinas), ou a membrana celular, ou interferir com as enzimas bacterianas essenciais (como as quinolonas e as sulfonamidas) têm atividade bactericida, ainda existem alguns que atuam na síntese de proteínas-alvo (como os aminoglicosídeos, macrolídeos) e já as tetraciclina possuem efeito bacteriostáticos. O grau de ação desses fármacos pode ser classificado com grau de espectro de ação, como estreito espectro é antibiótico com alvo específico de bactérias Gram-negativas ou Gram-positivas, enquanto os antibióticos de amplo espectro afetar uma larga gama de bactérias tanto Gram-negativas e Gram-positivas. Dentre essa gama de fármacos disponíveis para diversos tratamentos, foi alvo desse estudo a tetraciclina (BORA *et al.*, 2005).

2.3.1 Tetraciclina

A tetraciclina (Figura 1) é um poliketídeo antibiótico de amplo espectro produzido pelo gênero *Streptomyces* e *Actinobacteria*, indicado no combate as infecções bacterianas. Este agente antibacteriano possui amplo espectro de atuação, age como inibidor da síntese de proteínas, ligando-se à subunidade 30S dos ribossomos dos microrganismos, e assim, preveni a introdução de novos aminoácidos à cadeia peptídica nascente das bactérias. Essa ação é geralmente inibitória e reversível após a retirada da droga (PALMER *et al.*, 2010).

Figura 1. Estrutura molecular da tetraciclina.



Fonte: Autoria própria.

Estudos recentes demonstraram que a tetraciclina sofre mudanças estruturais no ambiente, e que os produtos dessa transformação são mais estáveis. Tais transformações são extremamente importantes, pois vários microrganismos desenvolvem resistências a antimicrobianos, mas são sensíveis aos produtos da modificação da tetraciclina, como a epitetraciclina (ETC), a anidrotetraciclina (ATC) e a epianidrotetraciclina (EATC) (AZEVEDO *et al.*, 2009).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. EXTRAÇÃO DAS BIOMOLÉCULAS EM SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO

O estudo da partição das biomoléculas (L-tirosina, L-triptofano, cafeína e tetraciclina) foram preparadas em tubos de centrifuga de 15 mL providos de tampas de vedação para prevenir a vaporização dos alcoóis. Quantidades adequadas dos componentes do sistemas álcoois e sal de fosfato de potássio para perfazer uma solução de concentração de 40-60 % (p/p) e 10 - 20% (p/p), respectivamente, foram pesadas e sobre elas foram adicionadas uma soução aquosa das biomoléculas - L-tirosina, L-triptofano, cafeína e tetraciclina, de forma a se ter uma concentração de 10 mg/L e em cada tubo, o sistema apresentava ao final uma massa de 14,0 g. Depois de uma homogenização completa por agitação vigorosa, cada sistema foi centrifugado a 3000 x g por 10 min, para induzir a separação das fases, e em seguida deixado em por no mínimo 18 h para atingir o equilíbrio.

Após este tratamento, ambas as fases tornaram-se claras e transparentes e a interface bem definida. As fases foram cuidadosamente separadas com auxílio de uma pipeta para a fase de topo e uma seringa com uma agulha longa para a fase de fundo, e em seguida foram determinadas as massas e os volumes de cada fase. As temperaturas avaliadas foram entre 278.15 K a 308.15 K.

O coeficiente de partição (K) foi definido como a relação entre as concentrações das biomoléculas na fase de topo e fundo. A fim de avaliar o processo de extração, a razão volumar (R_v) e a eficiência da extração das biomoléculas (E -%) foram calculados de acordo com Souza *et al.* (2010), e apresentados nas equações (4.7) a (4.9).

$$K = \frac{C_T}{C_B} \quad (4,7)$$

$$R_v = \frac{V_T}{V_F} \quad (4.8)$$

$$E = 100 \times \left(\frac{K \times R_v}{1 + K \times R_v} \right) \quad (4.9)$$

onde: C é a concentração das biomoléculas, V é o volume, E a eficiencia de extração e T e B correspondem as fases de topo e fundo, respectivamente.

A otimização da partição das biomoléculas foi iniciada com o estudo do efeito dos tipos de álcoois e sais de fosfato de potássio empregado, nesta fase elegeu-se a combinação de parâmetros que propiciava a migração da molécula ou para a fase rica em álcool ($K > 1,0$) ou para a fase rica sem sal de fosfato de potássio ($K < 1,0$). Em seguida variou-se as concentrações do sal de fosfato de potássio escolhido (10 a 20 %, p/p), do álcool elegido (40 a 60 %, p/p), temperatura entre 278,15 a 303,15 K, adição de eletrólitos com variação do cátion (BaCl_2 , CaCl_2 , MgCl_2 , LiCl , NaCl e KCl) e dos ânions (NaSCN , NaI , NaBr , NaNO_3 , NaCl , Na_2HPO_4 , Na_2SO_4 e NaF) na concentração de 0,1 % (p/p) e em seguida estudou-se a concentração de eletrólitos, usando NaCl (0,5 a 5,0 %, p/p).

4 RESULTADOS

4.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DAS BIOMOLÉCULAS

A determinação das concentrações das biomoléculas nas fases do sistema estudados foi realizada por meio de espectroscopia UV-Vis, utilizando o aparelho Varian Cary-50 Espectrofotômetro UV-visível Bio, em comprimentos de onda definidos por meio da máxima absorção (L-tirosina - 270 nm, L-triptofano - 280 nm, tetraciclina - 275 nm e cafeína - 275 nm). Curvas de calibração, para cada biocomposto, foram previamente determinadas. A interferência dos sais inorgânicos e dos alcoóis no método analítico da verificação de sobreposição de picos de absorção máxima no espectro de varredura na região do UV-Vis.

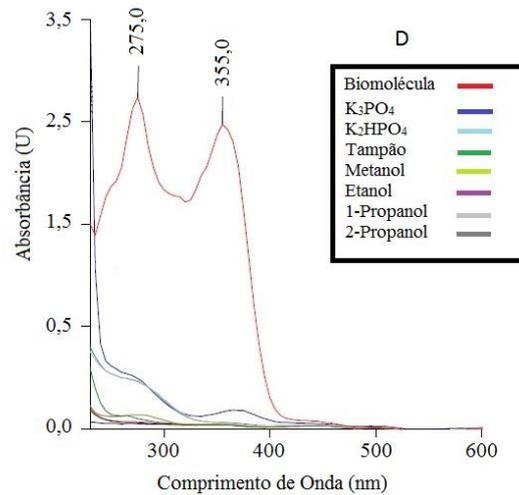
4.2 INFLUENCIA DOS CONSTITUINTES DO SAB NAS DETERMINAÇÕES DO ANTIBIÓTICO

Para avaliar a influência dos constituintes do sistema aquoso bifásico, foi realizada uma varredura no espectro UV-visível para as soluções aquosas dos alcoóis e sais de fosfato de potássio a 40% (p/p), bem como de solução aquosa das biomoléculas (40 mg/L), como mostra a Figura 2. Observou-se primeiramente que os comprimentos de onda que garantem a máxima absorção foi 275 e 355 nm tetraciclina (MEDINA *et al.*, 2000).

Para a tetraciclina a ocorrência de dois picos de absorção é decorrente da estrutura molecular da biomolécula, comumente o comprimento de onda utilizado é 355 nm, como descrito por Medina *et al.* (2000). Os valores encontrados para as demais biomoléculas estão de acordo com a literatura.

Para todos os casos não foi observada nenhuma interferência dos componentes do sistema na quantificação da concentração das biomoléculas, haja vista que o valor da absorbância encontrado para a biomolécula é maior que 90% do valor encontrado para os constituintes do sistema.

Figura 2: Espectro de absorção dos constituintes do sistema e da solução de biomoléculas (40 mg/L) (D-Tetraciclina).

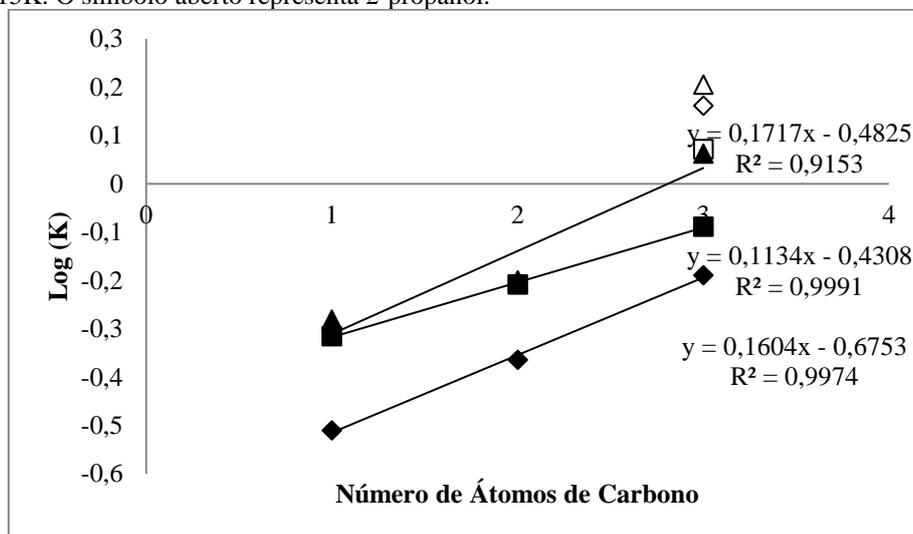


Fonte: Autoria própria.

4.3 TETRACICLINA

No particionamento da tetraciclina em SAB álcool/sal foi estudado e os resultados aparecem na figura 3. Estes sistemas foram selecionados com base em tipos de álcool (metanol, etanol, 1-propanol e 2-propanol) e tipos de sais de fosfato de potássio (K_3PO_4 , K_2HPO_4 , solução tampão K_2HPO_4/KH_2PO_4).

Figura 3: Influência do tipo de álcool (1=metanol, 2=etanol e 3= 1-propanol) e fosfato de potássio (\blacktriangle - K_3PO_4 , \blacksquare - K_2HPO_4 e \blacklozenge K_2HPO_4/KH_2PO_4 tampão) sobre o coeficiente de partição da tetraciclina usando 50% de álcool em peso e 15% em peso de fosfato de potássio em 298,15K. O símbolo aberto representa 2-propanol.



Fonte: Autoria própria.

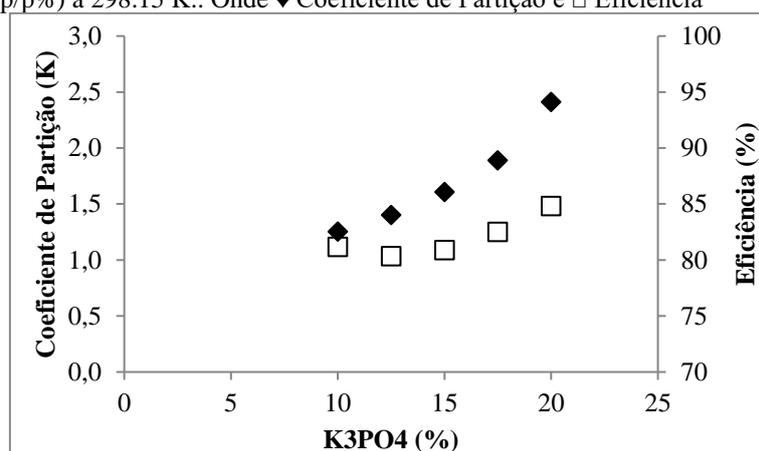
A tetraciclina foi particionada preponderantemente para a fase de fundo (rica em sais de potássio) demonstrando a hidrofobicidade da estrutura, o que é confirmado pelo valor do coeficiente octanol-água para espécies de tetraciclina (-1,05) segundo Herbert e Dorsey (1995). Somente os sistemas formados pelo 2-propanol para todos os sais de fosfato de potássio e pelo 1-propanol com K_3PO_4 apresentam uma tímida tendência de partição da tetraciclina para a fase de topo. Como no caso dos aminoácidos o aumenta da

cadeia alquílica do álcool e a força do sal baseado na série de Hofmeister aumenta o coeficiente de partição da tetraciclina.

Para as extrações da tetraciclina nos sistemas propostos foi ponderado dois tipos de otimização: o primeiro ocorreu com o particionamento do antimicrobiano para a fase de topo, na qual sua recuperação é facilitada pela volatilização do álcool. O caminho para a fase de topo foi formado pelo 2-propanol e K_3PO_4 , devido ao maior coeficiente de partição ($K=1,64$) para o ponto de mistura formado com 50% de álcool e 15% de sal em peso.

Após a determinação do coeficiente de partição da tetraciclina no sistema álcool/sal (50/15%, p/p), foi mantido a concentração do álcool (50%) constante tanto para o sistema 2-propanol/ K_3PO_4 e variou-se a concentração do K_3PO_4 de 10 a 20% em peso (Figura 4). Com o aumento da quantidade do fosfato de potássio ocorreu o aumento da exclusão das moléculas para a fase de topo, devido ao efeito *salting-out*. O aumento da concentração do sal (20%, p/po) ocasionou a elevação do coeficiente de partição da tetraciclina, com valor de $K = 2,41$ e eficiência da de 84,81%.

Figura 4: O coeficiente de partição e eficiência de extração da tetraciclina em função variação da concentração do sal (10-20 p/p%) com 2-propanol (50 p/p%) a 298,15 K.. Onde \blacklozenge Coeficiente de Partição e \square Eficiência



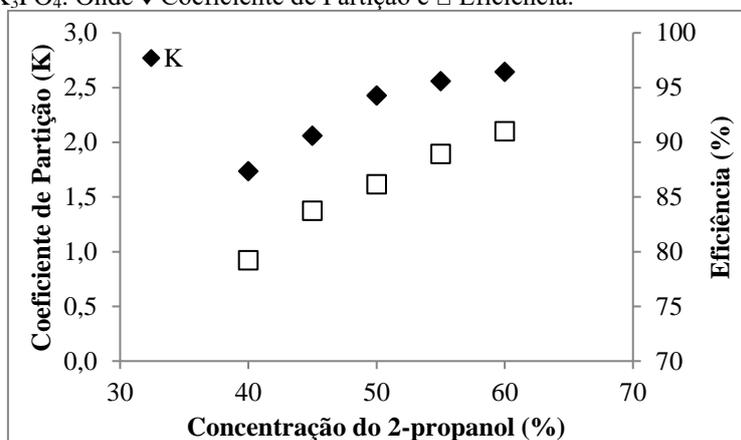
Fonte: Autoria própria.

De acordo com Han *et al.* (2010) a concentração de fosfato dibásico de potássio favorece o aumento do coeficiente de partição do cloranfenicol em sistemas formados com $[C_4mim]Cl$, confirmando o efeito *salting-out*, já a eficiência de extração atinge 98,5%, ao passo que neste trabalho o valor máximo de extração foi de 85%. Entretanto Mokhtarani *et al.* (2007) observaram que o aumento da concentração de sal no sistema aquoso bifásico formado por PEG + Na_2SO_4 + água, aumenta a força iônica do sistema e consequentemente o antibiótico ciprofloxacina tem tendência a particionar-se para fase de fundo rica em sal.

No processo de otimização foi analisado a influência da variação de concentração do álcool (40, 45, 50, 55 e 60% em peso) sobre o coeficiente de partição e eficiência. O maior coeficiente de partição obtido foi 2,64 com a concentração de 20% de K_3PO_4 , como mostra a Figura 5.

Esta migração é facilitada pela solubilidade da tetraciclina nos constituintes das fases. Segundo Wang *et al.* (2010) solubilidade da tetraciclina em álcool é maior do que em água, favorecendo o particionamento do antimicrobiano para a fase de topo, logo com o aumento da concentração do álcool maior a migração para esta fase.

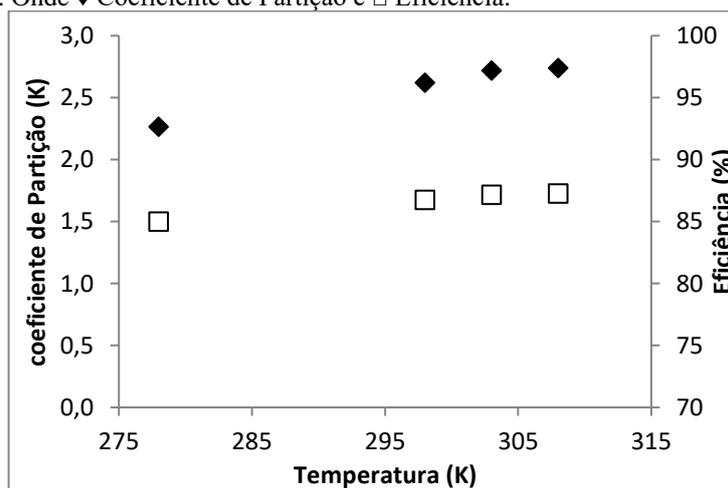
Figura 5: O coeficiente de partição e eficiência de extração de tetraciclina em função variação da concentração do álcool (40-60 p/p%) com (20 p/p%) para K_3PO_4 . Onde \blacklozenge Coeficiente de Partição e \square Eficiência.



Fonte: Autoria própria.

Na análise do efeito da variação de temperatura (278,15-308,15 K) sobre a extração da tetraciclina com o sistema (60% em peso de 2-propanol e 20% em peso de K_3PO_4) foram realizados os experimentos onde os resultados são demonstrados na Figura 6. O coeficiente de partição aumentou com a temperatura, $K= 2,74$ em 308,15K para o sistema.

Figura 6: Efeito da temperatura sobre o coeficiente de partição e eficiência de extração da tetraciclina para sistema 2-propanol (60p/p%) e K_3PO_4 (20p/p%). Onde \blacklozenge Coeficiente de Partição e \square Eficiência.



Fonte: Autoria própria.

Enquanto He *et al.* (2011) indicaram que a temperatura não teve influência significativa sobre o comportamento de distribuição de esteróides, por outro lado, Klomklao et al. (2005) relataram que a temperatura influencia grandemente a eficiência da extração de proteínas. Isto mostra que o efeito da temperatura na extração depende muitíssimo da biomolécula a ser particionada. Wang et al (2010) apresenta

um aumento de até 5% na eficiência de extração de tetraciclina quando a temperatura aumentava de 283,15 para 298,15 K, em sistemas 2-propanol – (NH₄)₂SO₄.

A equação de van't Hoff foi utilizada para determinar os parâmetros termodinâmicos (Tabela 1) no processo de partição de tetraciclina para a fase de topo. O valor calculado ΔG°_m foi negativo e o valor de ΔH°_m positivo para o sistema avaliado refletindo no particionamento espontâneo, endotérmico e preferencial do antimicrobiano para a fase rica em álcool, indicado pela $K > 1$.

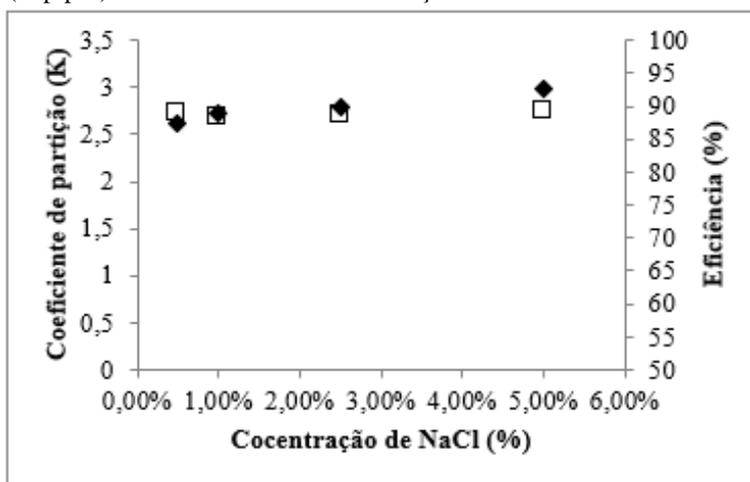
Tabela 1: Parâmetros termodinâmicos de particionamento da tetraciclina.

| | ΔH (KJ.mol ⁻¹) | ΔS (J.mol ⁻¹ K ⁻¹) | ΔG (KJ.mol ⁻¹) |
|--|------------------------------------|---|------------------------------------|
| 2propanol/K ₃ PO ₄ (60/20p/v%) | 5,66 | 25,93 | -2,33 |

Fonte: Autoria própria.

Foi observado na Figura 7, a influência da adição de cloreto de sódio e sua variação de concentração no coeficiente de partição e eficiência do antimicrobiano. A adição de NaCl não foi efetiva no aumento do coeficiente de partição de tetraciclina, nem a eficiência de extração deste antibiótico.

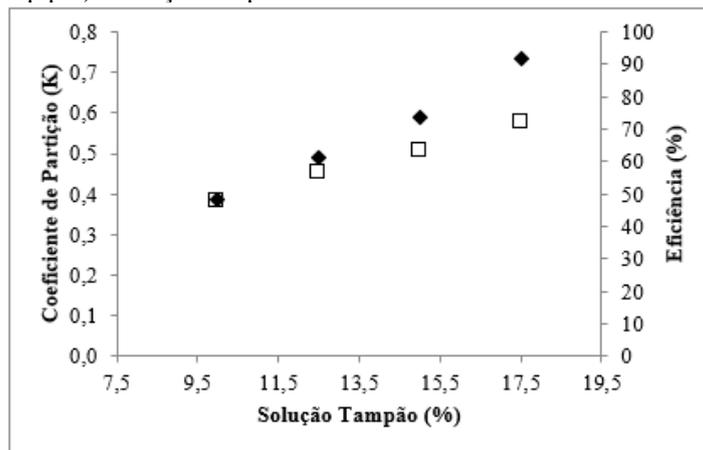
Figura 7: Efeito da concentração de NaCl sobre o coeficiente de partição e eficiência de extração da tetraciclina para sistema 2-propanol (60p/p%) e K₃PO₄ (20p/p%). Onde ♦ Coeficiente de Partição e □ Eficiência.



Fonte: Autoria própria.

O outro caminho no processo de otimização foi o particionamento da tetraciclina para fase de fundo formado pelo o sistema etanol e solução tampão com menor valor de coeficiente de partição ($K=0,432$), após a determinação do K no sistema álcool/sal (50/15%), foi mantido a concentração do etanol (50%) e variou a concentração do tampão de 10 a 20% em peso (Figura 8).

Figura 8: O coeficiente de partição e eficiência de extração da tetraciclina em função variação da concentração do sal (10-20 p/p%) para o sistema etanol (50 p/p%) e solução tampão a 298.15 K. Onde \blacklozenge Coeficiente de Partição e \square Eficiência.

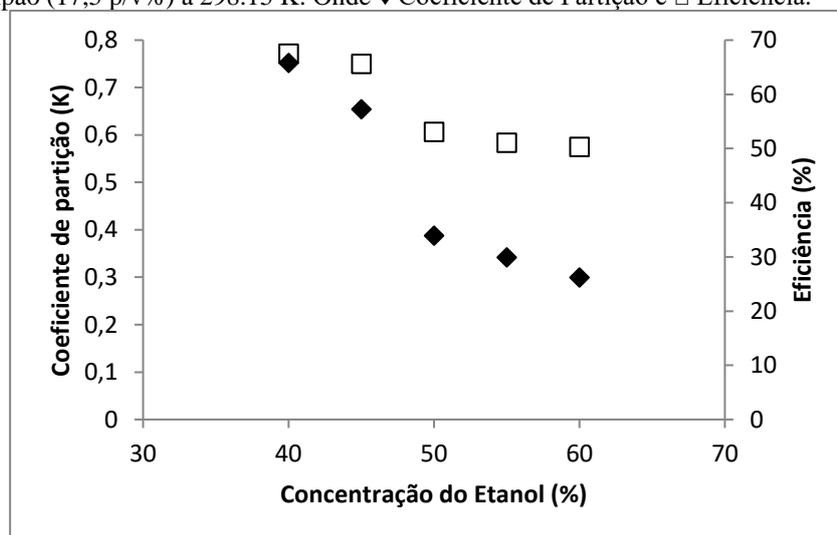


Fonte: Autoria própria.

Para a partição da tetraciclina no sistema etanol 50% (p/p) e solução tampão 17,5% (p/p), foi obtido um valor de K igual a 0,39 com uma eficiência da extração de 47,89%. Isso ocorre devido a elevação da concentração de sal que favorece o aumento da exclusão de moléculas para a fase de topo, efeito também apontado por Trindade *et al.*, 2006).

O estudo da influência da variação de etanol (40, 45, 50, 55 e 60% em peso), fixando a concentração da solução tampão em 17,5% (p/p), foi observado tendo como resposta o coeficiente de partição. O menor valor encontrado $K=0,29$ com concentração do álcool a 60% (Figura 9).

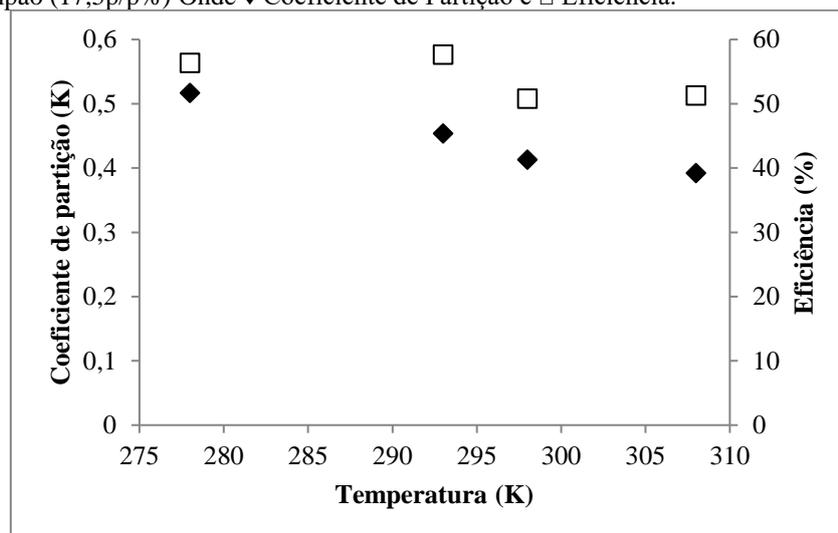
Figura 9: O coeficiente de partição e eficiência de extração de tetraciclina em função variação da concentração do etanol (40-60 p/v%) com solução tampão (17,5 p/v%) a 298.15 K. Onde \blacklozenge Coeficiente de Partição e \square Eficiência.



Fonte: Autoria própria.

No estudo do efeito da variação de temperatura (278,15-308,15 K) sobre a extração da tetraciclina com o sistema e o sistema contendo 60% (p/p) de etanol e 17,5% (p/p) de tampão fosfato, o valor do coeficiente de partição foi de 0,39 a 308,15K (Figura 10).

Figura 10: Efeito da temperatura sobre o coeficiente de partição e eficiência de extração da tetraciclina para sistema etanol (60p/p%) e solução tampão (17,5p/p%) Onde \blacklozenge Coeficiente de Partição e \square Eficiência.



Fonte: Autoria própria.

Os resultados aqui obtidos mostram que o efeito da temperatura sobre a extração da tetraciclina, demonstra que com o aumento da temperatura diminui o coeficiente de partição. Segundo Claudio *et al.* (2010) a temperatura é um fator necessário para ser controlado para obtermos uma melhor eficiência. Na Linearização do coeficiente de partição e da variação de temperatura (278,15 - 308,15K) do antimicrobiano foi utilizada a equação de van't Hoff na determinação dos parâmetros termodinâmicos (ΔH°_m , ΔG°_m e ΔS°_m) demonstrados na tabela 2. Segundo esses dados a partição da tetraciclina para a fase de fundo é espontânea, exotérmica e controlada por efeitos entrópicos.

Tabela 2: Parâmetros termodinâmicos de particionamento da tetraciclina.

| | ΔH (KJ.mol ⁻¹) | ΔS (J.mol ⁻¹ K ⁻¹) | ΔG (KJ.mol ⁻¹) |
|--------------------------|------------------------------------|---|------------------------------------|
| Etanol/tampão(40/10p/v%) | -6,34 | 28,18 | -8,69 |

Fonte: Autoria própria.

5 CONCLUSÃO

Os sistemas aquosos bifásicos formados por álcool-sal (SAB) foram aplicados com sucesso para a particonamento do antibiótico tetraciclina. Os principais resultados mostram que os álcoois com cadeias alifáticas mais longas (maior hidrofobicidade) aumentam a separação de fases.

O processo de extração foi otimizado pela variação do tipo e concentração dos componentes dos sistemas, da temperatura e da adição de diferentes eletrólitos. A depender dos constituintes dos sistemas as biomoléculas poderiam migrar para a fase de topo ($K > 1,0$) ou fase de fundo ($K < 1,0$), no processo de otimização das biomoléculas privilegiou-se a partição para a fase rica em álcool (fase de topo), neste sentido os melhores valores para o coeficiente de partição foram para tetraciclina ($K = 2,74$ usando 2-propanol – 60%, K_3PO_4 – 20%, NaCl 5% a 308,15 K). Também foi otimizada a partição da tetraciclina para a fase rica em sal ($K = 0,39$ usando etanol – 60%, tampão fosfato – 17,5% a 308,15 K)

REFERÊNCIAS

- CHUNG, E.S. *et al.* **Revisiting the determination of climate sensitivity from relationships between surface temperature and radiative fluxes.** *Geophysical Research Letters*, 37, L10703, 6. 2010. Disponível em: < <https://ui.adsabs.harvard.edu/abs/2010GeoRL..3710703C> >. Acessado em: 18 out. 2019.
- ANDREO, D., JORGE, N. **Antioxidantes naturais: técnicas de extração B.CEPPA**, Curitiba v. 24, n. 2, p. 319-336, jul./dez. 2006. Disponível em: <<http://sci-hub.tw/10.5380/cep.v24i2.7489>>. Acessado em: 18 out. 2019.
- ASENJO, J.A. e ANDREWS B.A. **Aqueous two-phase systems for protein separation: a perspective.** *Journal of Chromatography A*. Inglaterra 49:8826-35. 2011 Disponível em: < <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/01496395.2011.5765436>>. Acessado em: 18 out. 2019.
- BRETTI, C. *et al.* **Some thermodynamic properties of dl-Tyrosine and dl-Tryptophan. Effect of the ionic medium, ionic strength and temperature on the solubility and acid–base properties.** *Fluid Phase Equilibria*. Inglaterra 314, 185– 197. 2012 Disponível em: < <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/01496395.2012.9876546>>. Acessado em: 18 out. 2019.
- CHAN, C.H. *et al.* **Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants.** *Journal of Chromatography A*. Inglaterra, 1218: 6213 – 6225, 2011. Disponível em: < <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/01496395.2011.5873306>>. Acessado em: 18 out. 2019.
- CHATCHAWALSAISIN, J. *et al.* **The preparation by extrusion/spheronization and the properties of pellets containing drugs, microcrystalline cellulose and glyceryl monostearate.** *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, Inglaterra, 24, 35-48. 2005. Disponível em: < <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/01496395.2005.5839246>>. Acessado em: 18 out. 2019.
- FREIRE, M.G. *et al.* **High-performance extraction of alkaloids using aqueous two-phase systems with ionic liquids.** *Green Chemistry*. Inglaterra, 12, 1715–1718. 2010. Disponível em: < <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/01496395.2010.987656>>. Acessado em: 18 out. 2019.
- FREIRE, M.G. *et al.* **Aqueous biphasic systems composed of water-stable ionic liquid +carbohydrates and their applications.** *Green Chemistry*. Inglaterra, 13, 1536. 2011. Disponível em: < <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/01496395.2011.1234586>>. Acessado em: 18 out. 2019.
- GOIHL, J. **Tryptophan can lower aggressive behavior.** *Feedstuffs*, Alemanha. 78, 12-22. 2006. Disponível em: < https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Tryptophan+can+lower+aggressive+behavior&author=J.+Goihl&publication_year=2006&journal=Feedstuffs&pages=12-22> Acessado em: 18 out. 2019.
- Hasmann, F.A. *et al.* **Purificação de biomoléculas intracelulares, produzidas por microrganismos.** *Microrbiologia in Foco*. Inglaterra 04-11. 2008. Disponível em: < <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/01496395.2008.8764326>>. Acessado em: 18 out. 2019.
- JI, P. E FENG, W. **Solubility of amino acids in water and aqueous solutions by the statistical associating fluid theory.** *Industrial & Engineering Chemistry Research*. Inglaterra. 47,6275-6279. 2008. Disponível em: < <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/01496395.2008.5955436>>. Acessado em: 18 out. 2019.

LEE, S. W.; LIM, J. M.; BOO, S. H. (Org) **Colorimetric determination of amino acids using genipin from *Gardenia jasminoides***. *Anal.Chemical Acta*, Inglaterra 480, 267. 2003. Disponível em: < <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/01496395.2003.7893356>>. Acessado em: 18 out. 2019.

JUN, X. **Caffeine extraction from green tea leaves assisted by high pressure processing**. *Journal of Food Engineering*. Inglaterra 94, 105–109. 2009. Disponível em: < <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/01496395.2009.5843516>>. Acessado em: 18 out. 2019.

MARKLOVÁ, E.; MAKOVIC'KOVÁ, H.; KRÁKOROVA, I. (Org) **Screening for defects in tryptophan metabolism**. *Journal of chromatography A*, Inglaterra 870, 289-293. 2000. Disponível em: < <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/0149634.2000.583456>>. Acessado em: 18 out. 2019.

MEDINA, A. R.; MARIN, M.G.G.; CORDOVA, M.L.F. e DIAZ, A.M. Uvspectrophotometric flow-injection assay of tetracycline antibiotics retained on Sephadex QAE A-25 in drug formulations. *Microchemical Journal* 65, 325-331. 2000. Disponível em: < <https://www.elsevier.com/books/flow-injection-analysis/karlberg/978-0-444-88014-7>>. Acessado em: 18 out. 2019.

OOI, C. W. *et al.* **Purification of lipase derived from *Burkholderia pseudomallei* with alcohol/salt-based aqueous two-phase systems**. *Process biochemistry*. Inglaterra, 44, 1083-1087. 2009. Disponível em: < <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/01496395.2009.5843316>>. Acessado em: 18 out. 2019.

PARK, H.S. *et al.* **Extraction behaviors of caffeine and chlorophylls in supercritical decaffeination of green tea leaves**. *Food Science and Technology*. Inglaterra, 45, 73-78. 2012. Disponível em: < <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/01496395.2012.5973306>>. Acessado em: 18 out. 2019.

PENTEADO, M. D. V. C. **Vitaminas –Aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos**. São Paulo: Ed. Metha. 611p. 2003. Disponível em: <https://repositorio.usp.br/item/001306512>. Acesso em: 18 out. 2019.

ROSSI, L.; TIRAPEGUI, J. **Implicações do sistema serotoninérgico no exercício físico**. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*, São Paulo, v. 48, n. 2, p. 227-233. 2004. Disponível em : < <https://www.scielo.br/j/abem/a/TwYqWxv5dTMxrDz3k5CPS6g/abstract/?lang=pt>> Acessado em 18 out 2019.

PEREIRA, J.F.B. *et al.* **Ionic liquids as adjuvants for the tailored extraction of biomolecules in aqueous biphasic systems**. *Green Chemistry*. Inglaterra, 12, 1661–1669. 2010. Disponível em: < <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/01496395.2010.5443306>>. Acessado em: 18 out. 2019.

TOMÉ, L.I.N. *et al.* **Tryptophan extraction using hydrophobic ionic liquids**. *Separation and purification technology*. 72, 167-173. 2010. Inglaterra 8, 886-891. 2010. Disponível em: < <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/01496395.2010.3873306>>. Acessado em: 18 out. 2019.

WANG, Y. *et al.* **Liquid-liquid equilibrium of novel aqueous two-phase systems and evaluation of salting-out abilities of salts**. *Central European Journal of Chemistry*. Inglaterra, 8, 886-891. 2010. Disponível em: < <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/01496395.2010.5873306>>. Acessado em: 18 out. 2019.

WANG, Y. *et al.* **Application of Water-Miscible Alcohol-Based Aqueous Two-Phase Systems for Extraction of Dyes**. *Separation Science and Technology*. Inglaterra, 46, 1283–1288. 2011. Disponível em: < <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/01496395.2011.583306>>. Acessado em: 18 out. 2019.

ZAIA, D.A.M.; ZAIA, C.T.B. (Org) ELICHTIG, J. **Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos metodos existentes.** Química nova. São Paulo,21, jun. 1998. Disponível em:<<https://www.scielo.br/j/sa/a/N9DLLrhzrnzkwbxbM6LWx7g/?lang=pt>> Acessado em: 18 out. 2019.