UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Fermentações

Utilização de sistemas poliméricos de duas fases aquosas
(SPDFA) compostos por polietileno glicol/ácido poliacrílico
(PEG/APA) para extração de ácido clavulânico

Bruno Ubertino Rosso

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadores:
Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Prof. Dr. Attilio Converti

São Paulo
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Fermentações

Utilização de sistemas poliméricos de duas fases aquosas
(SPDFA) compostos por polietileno glicol/ácido poliacrílico
(PEG/APA) para extração de ácido clavulânico

Versão original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP.

Bruno Ubertino Rosso

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadores:
Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Prof. Dr. Attilio Converti

São Paulo
2013

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

R838u	Rosso, Bruno Ubertino Utilização de sistemas poliméricos de duas fases aquosas (SPDFA) compostos por polietileno glicol/ácido poliacrílico (PEG/APA) para extração de ácido clavulânico / Bruno Ubertino Rosso. -- São Paulo, 2013. 133p. Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica. Orientador: Pessoa Júnior, Adalberto 1. Tecnologia farmacêutica 2. Microbiologia industrial 3. Bioquímica industrial I. T. II. Pessoa Júnior, Adalberto, orientador. 615.4 CDD
-------	---

BRUNO UBERTINO ROSSO

**Utilização de sistemas poliméricos de duas fases aquosas
(SPDFA) compostos por polietileno glicol/ácido poliacrílico
(PEG/APA) para extração de ácido clavulânico**

*Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor*

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Orientador / Presidente

1º Examinador

2º Examinador

3º Examinador

4º Examinador

5º Examinador

São Paulo, _____ de _____.

*Aos meus pais (Riccardo e Ivanilda),
meu irmão (Ricco) e meus
professores (Attilio e Adalberto) a
quem coube suportar a loucura com
carinho e compreensão.*

“Não há mal que sempre dure, nem bem que nunca se acabe.”

Provérbio popular brasileiro – autor desconhecido.

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares, Riccardo, Ivanilda, Ricco, Joyce, Gabriela e Maria pelo contínuo apoio.

À Profa Ana Porto, pela amizade e indicação da minha vinda a São Paulo sendo a ponte entre Recife e São Paulo

Ao Prof. Adalberto, pela orientação (inclusive pessoal), e contínua confiança durante todo o trabalho.

Ao Prof. Attilio, pela orientação durante o período que permaneci na Itália, bem como, sua amizade em momentos de dificuldade tanto de trabalho quanto pessoal

A Profa Patrizia, pela ajuda na minha instalação no laboratório quando cheguei à Itália, compreensão e auxílio durante a permanência na Itália.

Aos amigos que fiz em Genova brasileiros e estrangeiros que foram minha família fora de casa, os “Brazukas”.

Aos Solaroli e aos primos italianos Silvio e Paola, que me acolheram em todas as grandes celebrações familiares me fazendo sentir incluído.

À minha amiga-irmã Gisele por ter sobrevivido a dilúvio, despejo, falta de dinheiro, viagens, saídas, praias e muitas alegrias comigo em Genova. Você agora é família.

Aos meus amigos de laboratório em Genova: Bahar, Alberto, Davide e Marco por terem me ajudado e me feito rir inúmeras vezes.

Aos meus amigos de laboratório em São Paulo, em especial Daniela, César, Valter Joao e Alex por terem sempre sido de ajuda quando foi necessário, mesmo que fosse um simples e essencial conselho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelas bolsas de pesquisa concedidas.

A todos os funcionários da Universidade de Gênova e de São Paulo

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos.

Sumário

Lista de Figuras	v
Lista de Tabelas	viii
Lista de Abreviaturas	x
1. Resumos	12
1.1. Resumo	12
1.2. Abstract.....	13
1.3. Riassunto	14
2. Introdução.....	15
2.1. Antibióticos	15
2.2. Ácido clavulânico.....	17
2.3. Purificação de Produtos Biotecnológicos	18
2.4. Sistema de Duas Fases Aquosas	19
2.5. Sistema polimérico polietileno glicol – ácido poliacrílico (PEG-APA) ..	20
2.6. Diagramas de Fase	21
2.7. Variáveis que influenciam o sistema de duas fases aquosas.....	23
2.7.1. Efeito da composição do polímero.....	23
2.7.2. Efeito da temperatura	24
2.7.3. Efeito de aditivos de baixa massa molecular	24
2.7.4. Efeito da adição de sais	25
2.7.5. Efeito do pH	25
2.7.6. Efeitos das características do soluto.....	26
2.8. Aplicação de Planejamentos Experimentais em SDFA.....	27
2.9. Fermentação Extrativa em Sistema de duas fases aquosas (SDFA).....	28
3. Materiais e métodos.....	29
3.1. Materiais	29
3.1.1. Microorganismo.....	29
3.1.2. Meios de Reativação, Manutenção, Inóculo e Cultivo.....	29
3.2. Métodos	30
3.2.1. Ensaio de partição em sistemas poliméricos de duas fases aquosas estacionários	30
3.2.2. Ensaio de fermentação extrativa por SDFA em frascos agitados.....	31
3.2.3. Determinação da concentração do ácido clavulânico	31
3.2.4. Determinação da concentração de glicerol.....	31
4 Metodologia de análise dos resultados	31
4.1. Coeficiente de Partição.....	31

4.2.	Balanço de Massa	32
4.3.	Eficiência ou Rendimento	32
4.4.	Razão Volumétrica.....	32
5.	Objetivos.....	33
6.	Resultados e Discussões	33
6.1.	Diagramas de Fases.....	33
6.2.	Estudos de Partição do Ácido Clavulânico	33
6.3.	Ensaio de Partição Utilizando Na ₂ SO ₄ a 6%.....	34
6.3.1	Estudo de Partição do Ácido Clavulânico sob MPEG 2000, 4000 e 8000 e NaPA 8000 utilizando Na ₂ SO ₄	34
6.3.1.1.	Análise Estatística do Planejamento 2 ³	35
6.3.1.2.	Resposta K	35
6.3.1.3.	Resposta η_T e R	36
6.3.1.4.	Resposta BM	38
6.3.2.	Repetição do Estudo de Partição do Ácido Clavulânico sob MPEG 2000, 4000 e 8000 e NaPA 8000 utilizando Na ₂ SO ₄	39
6.3.3.	Estudo de Partição do Ácido Clavulânico sob MPEG 400, 4000 e 8000 e NaPA 8000 utilizando Na ₂ SO ₄	43
6.3.3.1.	Análise Estatística do Planejamento 2 ³	43
6.3.3.2.	Resposta K	43
6.3.3.3.	Resposta η_T	47
6.3.3.4.	Próximo Planejamento	48
6.3.4.	Estudo de Partição do Ácido Clavulânico sob MPEG 400 e NaPA 8000 utilizando Na ₂ SO ₄	44
6.3.4.1.	Análise Estatística do Planejamento 2 ²	48
6.3.4.2.	Resposta K	49
6.3.4.3.	Resposta η_T	49
6.3.4.4.	Próximo Planejamento	50
6.4.	Ensaio de Partição Utilizando NaCl a 1,05%	51
6.4.1.	Estudo de Partição do Ácido Clavulânico sob MPEG 2000, 4000 e 8000 e NaPA 8000 utilizando NaCl	52
6.4.1.1	Análise Estatística do Planejamento 2 ³	52
6.4.1.2	Resposta K	52
6.4.1.3	Resposta η_T	53
6.4.1.4	Próximo Planejamento	53
6.4.2.	Estudos de Partição do Ácido Clavulânico sob MPEG 400, 2000 e 4000 e NaPA 8000 utilizando NaCl	54
6.4.2.1.	Análise Estatística do Planejamento 2 ²	54
6.4.2.2.	Resposta K	54
6.4.2.3	Resposta η_T	55
6.4.2.4.	Próximo Planejamento	56
6.5.	Sobre a Construção dos Planejamentos Experimentais	56
6.5.1	Planejamentos Botched	56
6.5.2	Estudo de Precipitação de Componentes na Presença de Na ₂ SO ₄	58
7.	Fermentação Extrativa	59
8	Conclusões.....	61
9.	Referências bibliográficas.....	63
10.	ANEXOS	68

10.1.	ANEXO I - Curvas Binodais do sistema PEG/NaPA	69
10.2.	ANEXO II - Artigos Científicos.....	71
	10.2.1.Potassium Clavulanate partition in two phase systems consisting of polyethylene glycol and polyacrylic acid in the presence of sodium sulfate or sodium chloride	71
	10.2.2.Biomolecules and bioparticles purification processes: an overview.....	85

Lista de Figuras

1. Estrutura química do ácido clavulânico (Reading e Cole, 1977)	14
2. Mecanismo de Ação do Ácido Clavulânico ao ligar-se ao grupamento OH da Serina de uma β -lactamase produzindo composto estável e inativando a enzima (Oliveira et al. 2009)	15
3. Diagrama de fases para um sistema de duas fases aquosas. Binodal (—■—), linha de ligação (—●—), região de monofásica (A), região bifásica e composição total do sistema (B), sendo B' e B'' as composições das fases superior e inferior do sistema e ponto crítico (C). Fonte: Pereira, 2005	19
4. Composições totais (A1, A2, A3 e B1, B2, B3) e respectivas composições das fases superior e inferior em equilíbrio (A', A'' e B', B''). Fonte: Pereira, 2005	20
5. Representação simplificada do processo integrado do SDFA e fermentação para produtos intra e extracelulares. O diagrama selecionado representa o processo de fermentação em SDFA, no qual, a produção e recuperação do produto alvo podem ser integradas numa única operação. Também está a fase do rompimento celular para a recuperação dos produtos intracelulares (Rito-Palomares, 2004).	26
6. Gráfico de Pareto dos Efeitos estudados sobre a variável K. Única resposta significativa (3) CNaPA (16,71). Valor de efeito, não corresponde a valor real	33
7. Gráfico de Pareto dos Efeitos estudados sobre a variável η T. Variáveis significantes CNaPA e CPEG. Valores apenas de efeito, não correspondem a valores reais	34
8. Gráfico de Interação das Médias dos Efeitos CNaPA e CPEG (interação 2 por 3) na variável R. Melhor resposta (,557) na interação de CPEG 15% com CNaPA 10%. Valores apenas de efeito, não correspondem a valores reais	34
9. Gráfico de Interação das Médias dos Efeitos MPEG e CNaPA (interação 1 por 3) na variável R. Melhor resposta (,381) na interação de MPEG 2000 com CNaPA 10%. Valores apenas de efeito, não correspondem a valores reais	35
10. Gráfico de Interação das Médias dos Efeitos CNaPA e CPEG (2 por 3) na variável BM. Melhor resposta (109,129) na interação de CPEG 5% com CNaPA 20%. Valores apenas de efeito, não correspondem a valores reais	36
11. Gráfico de Pareto dos Efeitos estudados sobre a variável K. Respostas significantes: CPEG (2), CNaPA (3) e CPEG por CNaPA (2 por 3). Valores apenas de efeito, não correspondem a valores reais	37
12. Gráfico de Interação das Médias dos Efeitos CNAPA e CPEG (2 por 3) na variável K. Melhor resposta (22,495) na interação de CPEG 15% com CNAPA 20%. Valores apenas de efeito, não correspondem a valores reais.	38
13. Gráfico de Pareto dos Efeitos estudados sobre a variável η T. Respostas significantes: CPEG (2), MPEG (1), CNAPA (3), MPEG por CNAPA (1 por 3) e CPEG por CNAPA (2 por 3). Valores apenas de efeito, não correspondem a valores reais	38
14. Gráfico de Interação das Médias dos Efeitos CNAPA e CPEG (2 por 3) na variável η T. Melhor resposta (76,19) na interação de CPEG 15% com CNAPA 20%. Valores apenas de efeito, não correspondem a valores reais	39

15. Gráfico de Interação das Médias dos Efeitos MPEG e CNaPA (1 por 3) na variável ηT . Melhor resposta (65,691) na interação de MPEG 2000 com CNaPA 20%. Valores apenas de efeito, não correspondem a valores reais.	39
16. Gráfico de Pareto dos Efeitos estudados sobre a variável K. Respostas significantes: Todas exceto a CPEG (2), CNaPA (3) e interação MPEG (1) * CPEG (2). Valores apenas de efeito, não correspondem a valores reais.	42
17. Gráfico de Interação das Médias dos Efeitos MPEG, CPEG e CNaPA (1 por 2 por 3) na variável K. Melhor resposta: (19,53). Valores apenas de efeito, não correspondem a valores reais	42
18. Gráfico de Interação das Médias dos Efeitos MPEG, e CNaPA (1 por 3) na variável K. Melhores respostas: (18,044). Valores apenas de efeito, não correspondem a valores reais.	43
19. Gráfico de Interação das Médias dos Efeitos CPEG, e CNaPA (2 por 3) na variável K. Melhor resposta: (16,171). Valores apenas de efeito, não correspondem a valores reais.	43
20. Gráfico de Pareto dos Efeitos estudados sobre a variável ηT . Respostas significantes: Todas exceto CPEG (2) e a interação MPEG (1) por CPEG (2). Valores apenas de efeito, não correspondem a valores reais.	44
21. Gráfico de Interação das Médias dos Efeitos MPEG, CPEG e CNaPA (1 por 2 por 3) na variável ηT . Melhores respostas: (95,57) e (92,29). Valores apenas de efeito, não correspondem a valores reais	45
22. Gráfico de Pareto dos Efeitos estudados sobre a variável K. Resposta significativa: Apenas CPEG (1). Valores apenas de efeito, não correspondem a valores reais	46
23. Gráfico de Pareto dos Efeitos estudados sobre a variável ηT . Respostas significantes: CNaPA (2) e a interação CPEG (1) com CNaPA (2).Valores apenas de efeito, não correspondem a valores reais	47
24. Gráfico de Interação das Médias dos Efeitos CPEG e CNaPA (1 por 2) na variável ηT . Melhor resposta: (96,63). Valores apenas de efeito, não correspondem a valores reais	47
25. Gráfico de Pareto dos Efeitos estudados sobre a variável K. Respostas significantes: CPEG (2), CNaPA (3) e a interação CPEG (2) com CNaPA (3). Valores apenas de efeito, não correspondem a valores reais	49
26. Gráfico de Interação das Médias dos Efeitos CPEG e CNaPA (2 por 3) na variável K. Melhor resposta: (4,367). Valores apenas de efeito, não correspondem a valores reais.	50
27. Gráfico de Pareto dos Efeitos estudados sobre a variável ηT . Respostas significantes: CPEG (2), CNaPA (3) e MPEG (1). Valores apenas de efeito, não correspondem a valores reais	50
28. Gráfico de Pareto dos Efeitos estudados sobre a variável K. Respostas significantes: CNaPA (2), CPEG (1) e interação CPEG (1) com CNaPA (2).Valores apenas de efeito, não correspondem a valores reais	52
29. Gráfico de Interação das Médias dos Efeitos CPEG (1) e CNaPA (2), (1 por 2) na variável K. Melhor resposta: (10,897). Valores apenas de efeito, não correspondem a	

valores reais.....	52
30. Gráfico de Pareto dos Efeitos estudados sobre a variável ηT . Resposta mais significante: CPEG (1). Valores apenas de efeito, não correspondem a valores reais.	53
31. Gráfico de Limite de concentrações CPEG e CNaPA na presença de Na_2SO_4 de forma a evitar precipitação de componentes dos sistemas. Para CNaPA 15 e 17,5%o limite de CPEG é aproximadamente 22,5%; CNaPA 20 e 22,5% o limite de CPEG é aproximadamente 17,5%; CNaPA 25% o limite de CPEG é aproximadamente 15%.	55
32. Gráfico de Pareto dos Efeitos estudados sobre a variável K referente ao estudo da Tabela 19. Valores apenas de efeito, não correspondem a valores reais.....	57

Lista de Tabelas

1. Condições extraídas de (Pereira, 2008). Onde, MPEG = Massa Molar do PEG; CPEG= Concentração do PEG; MNaPA = Massa Molar do NaPA	31
2. Resultados da repetição dos experimentos de Pereira (2008) adicionando 300µg/mL de Ácido Clavulânico Sigma Puro aos sistemas “a” e “b”. Onde, R=Razão volumétrica; K=Coeficiente de partição; BM=Balanço de Massa; η_T =Rendimento da Fase Superior (mais concentrada)	31
3. Planejamento Fatorial Completo 2^3	32
4. Resultados obtidos a partir das análises das fases dos sistemas dispostos na Tabela 3. Onde, R=Razão Volumétrica; [AC] T=Concentração de Ácido Clavulânico na Fase Superior; [AC] B=Concentração de Ácido Clavulânico na Fase Inferior; K= Coeficiente de Partição; BM=Balanço de Massa; η_T =Rendimento da Fase Superior; η_B =Rendimento da Fase Inferior	32
5. Resultados obtidos a partir da repetição dos sistemas dispostos na Tabela 3. Onde, R=Razão Volumétrica; [AC] T=Concentração de Ácido Clavulânico na Fase Superior; [AC] B=Concentração de Ácido Clavulânico na Fase Inferior; K= Coeficiente de Partição; BM=Balanço de Massa; η_T =Rendimento da Fase Superior; η_B =Rendimento da Fase Inferior	36
6. Planejamento Fatorial Completo 2^3	40
7. Resultados obtidos a partir das análises das fases dos sistemas dispostos na Tabela 6. Onde, R=Razão Volumétrica; [AC] T=Concentração de Ácido Clavulânico na Fase Superior; [AC] B=Concentração de Ácido Clavulânico na Fase Inferior; K= Coeficiente de Partição; BM=Balanço de Massa; η_T =Rendimento da Fase Superior; η_B =Rendimento da Fase Inferior	40
8. Planejamento Fatorial Completo 2^2	46
9. Resultados obtidos a partir das análises das fases dos sistemas dispostos na Tabela 8. Onde, R=Razão Volumétrica; [AC] T=Concentração de Ácido Clavulânico na Fase Superior; [AC] B=Concentração de Ácido Clavulânico na Fase Inferior; K= Coeficiente de Partição; BM=Balanço de Massa; η_T =Rendimento da Fase Superior; η_B =Rendimento da Fase Inferior	46
10. Planejamento Fatorial Completo 2^3	48
11. Resultados obtidos a partir das análises das fases dos sistemas dispostos na Tabela 10. Onde, R=Razão Volumétrica; [AC] T=Concentração de Ácido Clavulânico na Fase Superior; [AC] B=Concentração de Ácido Clavulânico na Fase Inferior; K= Coeficiente de Partição; BM=Balanço de Massa; η_T =Rendimento da Fase Superior; η_B =Rendimento da Fase Inferior	49
12. Planejamento Fatorial Completo 2^2	51
13. Resultados obtidos a partir das análises das fases dos sistemas dispostos na Tabela 12. Onde, R=Razão Volumétrica; [AC] T=Concentração de Ácido Clavulânico na Fase Superior; [AC] B=Concentração de Ácido Clavulânico na Fase Inferior; K= Coeficiente de Partição; BM=Balanço de Massa; η_T =Rendimento da Fase Superior; η_B =Rendimento da Fase Inferior	51
14. Concentração de glicerol (g/L) de acordo com o tratamento do meio de soja e	

com o tempo de fermentação (horas). Condições de Fermentação MPEG 400 g/mol, CPEG 35%, MNaPA 8000 g/mol, CNaPA 10% e glicerol 5g/L.....56

15. Concentração de ácido clavulânico no meio de soja filtrado em cada fase de acordo com o tempo de fermentação (horas) e seu respectivo coeficiente de partição (K)57

Lista de Abreviaturas:

[AC]B – Concentração de Ácido Clavulânico na fase inferior (bottom).

[AC]_{fase} – Concentração de Ácido Clavulânico na fase

[AC]_{in} – Concentração de Ácido Clavulânico inicial

[AC]T – Concentração de Ácido Clavulânico na fase superior (top).

[CA]B – Clavulanic Acid concentration in the bottom phase (Concentração de Ácido Clavulânico na fase inferior)

[CA]T – Clavulanic Acid concentration in the top phase (Concentração de Ácido Clavulânico na fase superior)

µg/mL – Microgramas por mililitro

APA – Ácido Poliacrílico

ATPS – Aqueous two-phase systems (Sistema de duas fases aquosas)

BM – Balanço de Massa

CNaPA – Concentração de Ácido Poliacrílico de Sódio

CNaPAA – Sodium Polyacrylate concentration (Concentração de Ácido Poliacrílico de Sódio)

CPAA – Polyacrylate concentration (Concentração de Ácido Poliacrílico)

CPEG – Concentração de Polietilenoglicol

g/mol – Gramas por mol

K – Coeficiente de Partição

m/m – Massa por massa

mM – Mili molar

MPEG – Massa Molar do Polietilenoglicol

NaPA – Ácido Poliacrílico de Sódio

p/p – Peso por peso

PAA – Polyacrylate (Ácido Poliacrílico)

PEG - Polietilenoglicol

pH – Potencial Hidrogênionico

PI – Potencial Isoelétrico

R – Razão Volumétrica

rpm – Rotações por minuto

SDFA – Sistema de Duas Fases Aquosas

TM – Trademark (Marca Registrada)

V_B – Volume da fase inferior (bottom)

V_{fase} – Volume da fase

V_{in} – Volume inicial

V_T – Volume da fase superior (top)

η_B – Recuperação na fase inferior (bottom)

η_T – Recuperação na fase superior (top)

1. Resumos

1.1. RESUMO

ROSSO, B.U. **Utilização de sistemas poliméricos de duas fases aquosas (SDFA) compostos por polietileno glicol/ácido poliacrílico (PEG/APA) para extração de ácido clavulânico**. 2013. 128 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A viabilidade da produção em escala industrial de produtos biotecnológicos de interesse comercial e terapêutico, como os fármacos, depende significativamente das técnicas de separação e purificação utilizadas. A aplicação do sistema de duas fases aquosas (SDFA) é proposta como alternativa para a purificação, pois permite a separação e análise de biomoléculas, de modo que estas não percam sua atividade ou propriedades desejadas. Esta técnica é interessante para a purificação em larga escala, pois permite partição seletiva, com potencial de obtenção de altos rendimentos, além de apresentar boa relação custo-benefício. O presente trabalho estudou a purificação por extração líquido-líquido do ácido clavulânico em SDFA utilizando um novo sistema polimérico aquoso, formado pelos polímeros polietileno glicol (PEG) e ácido poliacrílico (APA). Foram estudadas diferentes composições do sistema polimérico aquoso PEG/APA, empregando diferentes massas molares e concentrações para o PEG e utilizando a massa molar 8000g/mol para o APA. Com base nas informações obtidas o melhor ponto de extração para o ácido clavulânico na presença de Na_2SO_4 foi definido como MPEG=400 g/mol, CPEG=17,5% (m/m) e CNaPA=22,5% (m/m) com $K=19,14$, $\eta_T=91,21\%$, $\text{BM}=101,69$ e $R=0,45$. Enquanto que na presença de NaCl, o melhor ponto encontrado foi: MPEG=400 g/mol, CPEG=35% (m/m) e CNaPA=10% (m/m) com $K=11,96$, $\eta_T=80,04\%$, $\text{BM}=90,18$ e $R=0,66$. No trabalho será avaliada, também, a influência da temperatura, pH e força iônica nesse sistema. Estabeleceram-se os melhores parâmetros de separação do ácido clavulânico presente em meio fermentado produzido por *Streptomyces clavuligerus* utilizando a metodologia de fermentação extrativa com SDFA PEG/APA. O efeito do ácido clavulânico no diagrama de fases do sistema PEG-APA, bem como sua partição na forma pura e na presença de homogeneizado celular, foi estudado principalmente através da determinação do coeficiente de partição e recuperação do respectivo fármaco.

Palavras chave: Ácido Clavulânico, PEG, APA, SDFA, fermentação extrativa.

1.2. ABSTRACT

ROSSO, B.U. **Utilization of aqueous two phase systems (ATPS) composed of polyethylene glycol/polyacrylic acid (PEG/APA) in the extraction of clavulanic acid.** 2013. 128 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The viability of industrial scale production of commercial and therapeutical biotechnological products, such as drugs, is significantly dependent on the separation and purification techniques applied. The use of two-aqueous phase systems (ATPS) is proposed as an alternative to purification because it allows the separation and analysis of biomolecules, so that they do not lose their activities or desired properties. This technique is interesting for large scale purification because it allows selective partition with high potential yield and good cost/benefit ratio. The present work studied the purification of clavulanic acid (CA) by liquid-liquid extraction in ATPS applying a new aqueous polymeric system composed of two polymers, namely polyethylene-glicol (PEG) and sodium polyacrylate (NaPA). Different compositions of the aqueous polymeric system (PEG/PAA) were utilized, employing different PEG molar masses (MPEG) and concentrations (CPEG) and a molar mass of PAA of 8000 g/mol. In the light of the results obtained, the best conditions for clavulanic acid extraction, in the presence of Na_2SO_4 , were MPEG = 400 g/mol, CPEG = 17.5% (m/m) and CNaPA = 22.5% (m/m), which allowed obtaining a partition coefficient (K) of 19.14, a yield in the top phase (η_T) of 91.21%, a mass balance (MB) of 101.69 and a volume ratio (R) of 0.45. On the other hand, in the presence of NaCl, the best results (K = 11.96, η_T = 80.04%, MB = 90.18 and R = 0.66) were found at: MPEG = 400 g/mol, CPEG = 35% m/m and CNaPA = 10% m/m. The effect of clavulanic acid in the PEG-PAA system phase diagram and its partition either in its pure form or in the cell homogenate were studied mainly through both the determination of the partition coefficient and the recovery of the drug selected for this study.

Key words: Clavulanic Acid, PEG, PA, ATPS, extractive fermentation.

1.3. RIASSUNTO

ROSSO, B.U. **Impiego di sistemi polimerici con due fasi acquose (SPDFA) composti da polietilen glicole/acido poliacrilico (PEG/APA) per l'estrazione di acido clavulanico.** 2013. 128 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

La produzione su scala industriale di prodotti biotecnologici commerciali e terapeutici, come i farmaci, dipende significativamente dalle tecniche separazione e purificazione applicate. L'uso di sistemi a due fasi acquose (ATPS) è proposto come alternativa alla purificazione, poiché permette la separazione e l'analisi di biomolecole, in modo che queste non perdano le loro attività o proprietà desiderate. Questa tecnica è interessante per la purificazione su larga scala in quanto consente la partizione selettiva con elevata resa potenziale e buon rapporto costo/benefici. Nel presente lavoro è stata studiata la purificazione dell'acido clavulanico (CA) mediante estrazione liquido-liquido in ATPS applicando un nuovo sistema polimerico acquoso composto da due polimeri, ovvero polietilene-glicole (PEG) e poliacrilato di sodio (NaPA). Sono stati utilizzati sistemi polimerici acquosi (PEG/PAA) di diversa composizione, impiegando differenti masse molari (MPEG) e concentrazioni (CPEG) di PEG e una massa molare di PAA pari a 8000 g/mol. Alla luce dei risultati ottenuti, la miglior combinazione di fattori per l'estrazione dell'acido clavulanico, in presenza di Na_2SO_4 , è risultata MPEG = 400 g/mol, CPEG = 17,5% (m/m) e CPAA = 22,5% (m/m), che ha consentito di ottenere un coefficiente di partizione (K) di 19,14, una resa nella fase superiore (η_T) di 91,21%, un bilancio di massa (BM) di 101,69 ed un rapporto volumetrico (R) di 0,45. Invece, in presenza di NaCl, i migliori risultati (K = 11,96, η_T = 80,04%, BM = 90,18 e R = 0,66) sono stati ottenuti impiegando MPEG = 400 g/mol, CPEG = 35% m/m e CNaPA = 10% m/m. L'effetto dell'acido clavulanico nel diagramma di fase del sistema PEG-PAA e la sua partizione sia in forma pura sia nell'omogenato cellulare sono stati studiati principalmente attraverso la determinazione del coefficiente di partizione ed il recupero del farmaco oggetto di questo studio.

Parole chiave: acido clavulanico, PEG, APA, ATPS, fermentazione estrattive.

2. Introdução

A biotecnologia passou por importante avanço nas últimas décadas, sobretudo nas áreas de biologia molecular, bioprocessos, bioquímica e biofísica, o que tem possibilitado o surgimento de novos bioprodutos. Porém, para tornar viável a produção e comercialização desses bioprodutos, são necessárias otimizações não somente dos processos de produção, como também os de purificação. Dentre os diferentes processos de purificação, um que tem chamado atenção pela sua simplicidade e potencialidade de aplicação é a extração líquido-líquido (Albertsson, 1971; Malpiedi *et al.*, 2008).

A extração líquido-líquido, mais especificamente, sistemas de duas fases aquosas (SDFA), tem sido amplamente usada para a separação de biomoléculas (Albertsson, 1986). SDFA tem sido alvo de várias investigações, em diversos campos da biotecnologia industrial, como por exemplo, para a purificação de proteínas, enzimas, anticorpos e na bioconversão extrativa. O interesse considerável dos SDFA advém de diversas vantagens, como: baixo custo econômico; a facilidade de ampliação de escala; minimização da desnaturação das proteínas, entre outras. Tudo isso confere a essa técnica de purificação um lugar preferencial nos processos de extração. (Asenjo, 1990; Porto, 2006; Pereira, 2005).

O ácido clavulânico é uma substância de ocorrência natural detectada pela primeira vez em culturas de *Streptomyces clavuligerus*, por pesquisadores do *Beechan Laboratories* na Inglaterra. O ácido clavulânico é um produto do metabolismo secundário de alguns actinomicetos e é um antibiótico de atividade fraca, porém constitui um poderoso inibidor de β -lactamases, enzimas que clivam o anel β -lactâmico de penicilinas e cefalosporinas, fazendo com que estes compostos percam as suas atividades antibacterianas (Reading e Cole, 1977).

Os antibióticos β -lactâmicos pertencem ao grupo dos cinco fármacos mais importantes, tanto nos níveis comerciais quanto terapêuticos (Elander., 2003), sendo a penicilina semi-sintética e amoxicilina os exemplos mais relevantes da utilização comercial de antibióticos sensíveis a β -lactamases associados a substâncias inibidoras destas enzimas.

2.1. Antibióticos

Antibióticos constituem um dos principais produtos do metabolismo secundário de fungos e bactérias. São moléculas que inibem o crescimento e/ou sobrevivência de microrganismos sem causar sérios efeitos tóxicos para o hospedeiro (Williams e Lemke, 2002). O primeiro antibiótico descoberto foi a penicilina, em 1928, por Alexander Fleming, ao observar uma lise bacteriana em placa devido a uma contaminação fúngica por *Penicillium*

notatum (posteriormente, renomeado *Penicillium chrysogenum*) enquanto estudava a bactéria patogênica *Staphylococcus aureus*

Na década de 40, Selman Waksman descobriu uma série de novos antibióticos, entre eles a estreptomicina, o primeiro antibiótico eficaz contra a tuberculose, o que proporcionou a Waksman o Prêmio Nobel de Medicina em 1952 (Pelczar *et al.*, 1996, Rokem *et al.*, 2007).

Durante os anos de 1950 e 1960, muitos medicamentos antibacterianos (tetraciclina, eritromicina, kanamicina), antifúngicos (candidina e nistatina), e antineoplásicos (adriamicina) foram descobertos por pesquisas acadêmicas e industriais (Challis e Hopwood, 2003). Todavia, a velocidade de novas descobertas caiu drasticamente após os anos 1970, sendo que atualmente, diversos esforços científicos possibilitaram melhoria dos rendimentos dos bioprocessos (Demain, 2007).

Existem muitas classes de antibióticos em uso clínico, estes podem ser produtos naturais, derivados semi-sintéticos ou sintéticos. Os sintéticos são divididos em três classes de antibióticos: sulfa, quinolonas e os oxazolidinonas (Walsh, 2003).

Os antibióticos podem também ser agrupados em classes de acordo com o seu alvo na superfície da célula bacteriana ou no interior da célula, sendo elas: (i) a biossíntese da parede celular bacteriana é inibida pelos antibióticos β -lactâmicos e pela classe dos glicopeptídeos como a vancomicina; (ii) ribossomos bacterianos são seletivamente bloqueados na subunidade 30S por aminoglicosídeos e tetraciclina e as subunidades 50S pela família dos antibióticos macrolida; (iii) a família dos antibacterianos quinolonas, exemplificado pela ciprofloxacina, age bloqueando a replicação do DNA bacteriano por desorientar intermediários catalíticos nas reações catalisadas por DNA topoisomerasas; (iv) a via biosintética da coenzima folato, essencial para proporcionar unidades monoméricas para a síntese de DNA, é bloqueada pelos fármacos sulfa e trimetoprim, enquanto que peptídeos perturbam a integridade da membrana (Walsh, 2003).

Dentre os antibióticos comercializados, uma das maiores e mais importantes classes de antibióticos clínicos são os pertencentes à família dos β -lactâmicos, particularmente chamados de penicilinas e cefalosporinas. Em 2003, suas vendas representaram, aproximadamente, \$15 bilhões - 65% do mercado global de antibióticos (Elander, 2003). No Brasil, o orçamento do Ministério da Saúde para assistência farmacêutica teve aumento expressivo nos últimos anos. Em 2002, os investimentos foram da ordem de R\$ 2,1 bilhões; em 2005, R\$ 3,2 bilhões; em 2006, saltaram para R\$ 4,2 bilhões; em 2007, para R\$ 5,1 bilhões e, em 2008, atingiram o valor de R\$ 5,8 bilhões (incluindo os medicamentos básicos, excepcionais, estratégicos, imunobiológicos e para DST/AIDS e coagulopatias) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

2.2. Ácido clavulânico

O ácido clavulânico (**Figura 1**) é um β -lactâmico bicíclico (anel β -lactâmico e oxazolidino condensados) e difere das penicilinas e cefalosporinas por possuir um átomo de oxigênio no lugar do átomo de enxofre (Butterworth, 1984).

FIGURA 1. Estrutura química do ácido clavulânico (Reading e Cole, 1977).

Este antibiótico foi isolado em 1971 através de um programa de estudo de produtos naturais designado para descobrir potenciais inibidores de β -lactamases (Nagarajan *et al.*, 1971, Finlay *et al.*, 2003); É um metabólito produzido por várias espécies de *Streptomyces*, porém seu principal produtor é o *S. Clavuligerus*, outras espécies que produzem compostos estruturalmente relacionados ao ácido clavulânico não são inibidores de β -lactamases, embora alguns apresentem propriedades antibacterianas e antifúngicas (Saudagar *et al.*, 2008).

O ácido clavulânico é capaz de inativar as β -lactamases por ligar-se à serina do grupo hidroxila do seu centro ativo, produzindo um intermediário acilado estável e assim inativando a enzima (Foulstone e Reading, 1982; Baggaley *et al.*, 1997, Oliveira *et al.*, 2009), mecanismo este disposto na **Figura 2**. O ácido clavulânico não possui nenhum grupo fortemente hidrofóbico e apresenta velocidades de degradação elevadas em regiões básicas (pH > 7,5) e ácidas (pH < 4,5) (Bersanetti *et al.*, 2005).

Estudos mais recentes (Santos *et al.*, 2009) confirmaram que em condições de pH 4,0 e 8,0, bem como para a temperatura de 30 e 45°C, ocorrem as maiores quedas da estabilidade do ácido clavulânico, sendo que a melhor condição, na qual a queda foi de 5 a 10%, foi encontrada na faixa de pH de 6,0 a 7,2. Esses autores verificaram também que a degradação do ácido clavulânico está relacionada com a força iônica, onde o efeito decresce segundo o tipo de sal: $\text{Na}_2\text{SO}_4 > \text{MgSO}_4 > \text{CaCl}_2 > \text{NaCl}$. Essas características levam a rendimentos de recuperação considerados baixos, durante os processos de purificação (principalmente o de extração), quando comparados com outros compostos β -lactâmicos (Mayer *et al.*, 1997).

O clavulanato de potássio pode ser encontrado em associação com a penicilina semi-sintética amoxicilina (AugmentinTM) ou com ticarcilina (TimentinTM) (Watve *et al.*, 2000). No Brasil, o medicamento CLAVULIN, comercializado pela SMITHKLINE BEECHAM Farmacêutica, é um exemplo deste tipo de associação.

FIGURA 2. Mecanismo de Ação do Ácido Clavulânico ao ligar-se ao grupamento OH da Serina de uma β -lactamase produzindo composto estável e inativando a enzima (Oliveira *et al.* 2009).

2.3. Purificação de Produtos Biotecnológicos

Os processos de separação e purificação são constituídos, na sua maioria, de várias etapas com baixos rendimentos tornando os custos altos do ponto de vista industrial, não apresentando o mesmo grau de desenvolvimento nos últimos anos, quando comparados à otimização de outros bioprocessos, como os fermentativos. Assim, é de grande interesse o estudo de métodos de purificação e extração alternativos, visando obter processos economicamente mais viáveis (Pessoa-Jr e Kilikian, 2005).

Existem muitas limitações no desenvolvimento de pesquisas na área de biosseparação, essencialmente pela dificuldade e complexidade dos processos aplicados a produtos farmacêuticos e biológicos (Porto, 2006). Alguns dos fatores que dificultam a purificação industrial de produtos biotecnológicos são a baixa concentração e sensibilidade térmica, que obrigam geralmente ao uso de técnicas de custo elevado, como processos

cromatográficos (Champluvier e Kula, 1992). Dessa forma, o desenvolvimento e a otimização dos processos de recuperação e purificação de fármacos passaram a ser de vital importância na produção industrial dessas biomoléculas (Seader e Henley, 1998).

O processo da purificação do ácido clavulânico inclui uma série de etapas: no fim da fermentação, o meio é clarificado primeiramente por filtração ou centrifugação e o micélio do *S. clavuligerus* é descartado (Barboza, et al, 2003). A extração preliminar inclui processos tais como adsorção, cromatografia de troca iônica ou a extração líquido-líquido (utilizando solventes orgânicos). Este método de separação em duas fases aquosas tem, até hoje, sido a principal escolha para compostos de baixo peso molecular apresentados em soluções diluídas, como é o caso dos antibióticos produzidos por fermentação, devido aos baixos custos e rendimentos relativamente elevados (Barboza, et al, 2003).

2.4 Sistemas de duas fases aquosas

Nos anos 1950, Albertsson e a sua equipe voltaram ao estudo dos SDFA, investigando sistemas de polietileno glicol (PEG), fosfato de potássio e água, bem como sistemas com o PEG, dextrana e água, descobrindo que formavam sistemas de duas fases aquosas (Albertsson, 1956). Desde então, vários pesquisadores basearam o seu trabalho no estudo e aplicabilidade dos SDFA.

Até este momento existem duas classes de SDFA: os sistemas constituídos por dois polímeros hidrófilos (polímero-polímero) e os constituídos por um polímero e um sal (polímero-sal).

Os sistemas mais estudados nas últimas décadas são os sistemas PEG/dextrana e PEG/sal, sendo igualmente os mais utilizados para a purificação de um grande número de biomoléculas (Oliveira *et al.*, 2001). Como foi evidenciado por Albertsson (1986), para concentrações além das definidas para uma zona de transição, formar-se-ão espontaneamente duas fases aquosas, com a predominância de um ou outro componente em cada uma das fases resultantes (Tubio; Nerli; Picó, 2004). Albertsson reconheceu a possível utilização destes sistemas como método de separação de biomoléculas sob certas condições de forma a preservar a sua atividade biológica, estabelecendo um grande número de diagramas de fase de vários SDFA, descrevendo também as suas propriedades físico-químicas (Diamond e Hsu, 1992).

As fases são designadas “aquosas” devido à sua elevada composição em água (cerca de 85-99%), permitindo dessa forma partição de biomoléculas em condições não desnaturantes. As composições das fases de equilíbrio podem ser alteradas por manipulação de diversos fatores como a temperatura, massa molecular dos polímeros e adição de sais ao sistema (Porto, 2006; Pereira, 2005). Deste modo, a partição de biomoléculas pode ser explorada para a obtenção de separações, que de outro modo seriam

difíceis ou mesmo impossíveis de se realizarem (Gavasane e Gaikar, 2003).

Entre as diversas vantagens que têm contribuído para o crescente interesse nos SDFA, destaca-se a facilidade de aumento de escala (passagem de escala piloto para escala industrial); a capacidade de oferecer bons fatores de resolução e elevados rendimentos em atividades (rápida transferência de massa, pouco gasto de energia na forma de mistura mecânica para atingir o equilíbrio); o fato de proporcionarem ambientes suaves para o tratamento de materiais biológicos (possibilidade de operação à temperatura ambiente) e possibilidade de operação rápida e seletiva (Albertsson, 1986; Diamond e Hsu, 1990).

O desenvolvimento das extrações utilizando SDFA em grandes escalas está muito limitado aos sistemas de PEG-dextrana e PEG-sal. Estes sistemas apresentam propriedades físicas muito favoráveis, referentes especialmente à viscosidade e a diferença de densidade entre as fases. A escolha desses processos de produção é fortemente influenciada por questões legais, isto porque têm que obedecer a parâmetros tóxico-ambientais, e neste caso, tanto o PEG como a dextrana são atóxicos e não causam distúrbios ambientais (Sarmiento *et al.*, 1994).

Contudo, a extração líquido-líquido utilizando sistemas aquosos bifásicos apresentam um elevado custo dos polímeros tradicionalmente utilizados na separação de fases, que se colocam com um grande entrave ao recurso desta técnica. Dessa forma vários grupos de pesquisa procuram desenvolver sistemas que reciclam os polímeros, ou os substituem por polímeros menos caros (Tjerneld *et al.*, 1992; Johansson *et al.*, 2008). Como um comparativo, 1kg de PEG, Dextrana e NaPA custam respectivamente R\$ 50.51, R\$ 15.254,22 e R\$ 839.8, o que torna o emprego do NaPA em detrimento da Dextrana em torno de 18 vezes mais barato (Sigma 17/04/2012).

2.5. Sistema polimérico polietileno glicol – ácido poliacrílico (PEG-APA)

O sistema aquoso polietileno glicol-ácido poliacrílico tem sido estudado por Johansson e seus colaboradores, os quais aplicaram esse sistema para extração de biomoléculas como hemoglobina, proteína verde fluorescente e lisozima (Johansson *et al.*, 2008). Antes desse estudo pouca atenção tinha sido dada ao sistema PEG-APA, pelo fato de ele formar duas fases somente na presença de certas condições, como a necessidade das moléculas de APA estarem totalmente dissociadas ($\text{pH} > 7$). Além disso, é necessária quantidade suficiente de sal no sistema de forma a facilitar a compartimentalização do polieletrólito altamente carregado em uma das fases. Essas razões em contraste com a sua simplicidade química levaram Johansson e seus colaboradores a considerarem esse novo sistema na área de partição de biomoléculas.

De um modo geral, o sistema apresenta certas vantagens como: baixa viscosidade, fases claras bem definidas e possibilidade de reciclagem. Além disso, PEG e APA são polímeros inofensivos e relativamente baratos (Tjerneld *et al.*, 1992; Johansson *et al.*, 2008).

Os dois polímeros podem ser separados de uma solução após pequenas alterações das condições experimentais. No caso do PEG deve-se efetuar alterações na temperatura, no caso do APA altera-se o pH (Johansson *et al.*, 2008).

O aquecimento de uma solução aquosa de PEG acima da sua temperatura crítica inferior de solução (LCST- “low critical solution temperature”) (aprox. 100°C para PEG de alta massa molecular) (Saeki *et al.*, 1976) torna-a turva. No diagrama de fases, a fronteira entre regiões de uma fase e duas fases é dada por esse ponto de turbidez. O LCST é simplesmente o ponto de turbidez mais baixo (Johansson *et al.*, 1993).

No caso do polímero APA, este se dissocia a pH acima de 5,0, e encontra-se totalmente carregado negativamente a um pH de 7,0. Para pH abaixo de 5,0, o APA descarrega e precipita em solução aquosa. Portanto o ajuste do pH possibilita a modulação da solubilidade do polímero (Johansson *et al.*, 2008 e Zhou *et al.*, 2001).

A cadeia principal de APA é hidrofóbica (Johansson *et al.*, 2008 e Zhou *et al.*, 2001) e a sua solubilidade é caracterizada pela presença de grupos carboxílicos (ânions) nos grupos poliméricos laterais. Estes grupos quando carregados são fortemente hidrofílicos e, por isso, PEG e APA separam-se em duas fases diferentes. No entanto, quando descarregado, o APA é hidrofóbico (Johansson *et al.*, 2008).

O sistema PEG-APA é interessante pelo fato de formar um sistema de duas fases aquosas para um pH superior a 5,0 e um sistema polímero-água para pH inferior a 5,0 (Johansson *et al.*, 2008).

2.6. Diagramas de fase

Para a utilização de SDFA é necessário o conhecimento do comportamento das fases nos sistemas. Dessa forma são efetuados os diagramas de fases para os componentes, nos quais se determina as composições dos componentes para a separação das fases. Os componentes de um SDFA podem ser, como já foi referido anteriormente, dois polímeros diferentes ou um polímero e um soluto de baixa massa molecular.

A **Figura 3** apresenta um diagrama de fases genérico, constituído por dois polímeros ou um polímero e um sal. Normalmente no eixo das abscissas representa-se o constituinte que possui maior concentração na fase inferior.

FIGURA 3. Diagrama de fases para um sistema de duas fases aquosas. Binodal (---■---), linha de ligação (—●—), região de monofásica (A), região bifásica e composição total do sistema (B), sendo B' e B'' as composições das fases superior e inferior do sistema e ponto crítico (C). Fonte: Pereira, 2005.

Num diagrama de fases existe uma linha convexa que separa a região monofásica, onde os componentes se misturam (ponto A), da região bifásica, na qual os componentes se tornam imiscíveis (ponto B), a essa linha dá-se a designação de binodal. As outras linhas que aparecem no diagrama de fases designam-se por linhas de amarração, e representam as várias composições totais do sistema (B), na qual as extremidades (nodos) representam, respectivamente, as composições das fases superior e inferior (B' e B''). Na **Figura 4** verifica-se que qualquer composição total representada por pontos da mesma linha de amarração origina SDFA com as mesmas composições de equilíbrio, no entanto, com quantidade de fases diferentes (Pereira, 2005). No diagrama de fases (**Figura 3**) encontra-se o ponto crítico (ponto C), onde as composições e os volumes das duas fases são na teoria iguais.

Foi verificado, ainda, que nas proximidades do ponto crítico, pequenas alterações na composição dos sistemas provocam mudanças drásticas, levando o sistema de uma para duas fases e vice-versa (Albertsson, 1986).

FIGURA 4. Composições totais (A1, A2, A3 e B1, B2, B3) e respectivas composições das fases superior e inferior em equilíbrio (A', A'' e B', B''). Fonte: Pereira, 2005.

2.7. Variáveis que influenciam o sistema de duas fases aquosas

São diversas as variáveis que influenciam na formação e partição de um soluto nos SDFA (em termos numéricos quantificado pelo coeficiente de partição, K). As variáveis incluem características dos polímeros que formam as fases (tipo, massa molecular e concentração), características dos aditivos (tipo e concentração), pH, temperatura, entre outros (Zaslavsky, 1995).

Para cada sistema, seja ele polímero-polímero ou polímero-sal, existe um diagrama de fases (item 2.6.). Alguns desses diagramas encontram-se disponíveis na literatura (Albertsson, 1986). No entanto é importante, ao se iniciar um trabalho com um novo sistema, construir um diagrama adequado às condições de trabalho a serem utilizadas (temperatura, pH, massa molecular dos polímeros e adição de suspensões biológicas) (Porto, 2006).

Embora as variáveis sejam todas mutuamente dependentes é necessária uma análise separada dos efeitos de cada uma delas. O fato de a partição depender de um grande número de variáveis distintas confere uma considerável versatilidade aos SDFA na separação de misturas de componentes. No entanto, a existência de tantas variáveis, a sua grande maioria interdependentes, torna extremamente difícil a previsão teórica do coeficiente de partição de um dado soluto, obrigando, por vezes, a exaustivos trabalhos de investigação (Kula *et al.*, 1982).

2.7.1 Efeito da composição do polímero

Num SDFA de dois polímeros, o termo de composição de polímeros diz respeito a três variáveis diferentes (Zaslavsky, 1995). Logo consideramos para cada polímero

predominante em cada uma das fases as três variáveis:

- ♦ tipo ou estrutura química do polímero;
- ♦ massa molecular do polímero;
- ♦ concentração do polímero.

Em geral, quanto maior for a massa molecular de um polímero, menor será a concentração necessária desse mesmo polímero para que ocorra separação de fases e, quanto maior for a diferenças de massas moleculares dos polímeros, maior será a assimetria da binodal (Abbott *et al.*, 1993). Zaslavsky (1995) indica que o declive da linha de amarração pode estar relacionado com a massa molecular dos polímeros, contudo, os dados divulgados foram inconclusivos. Um exemplo disso é que num sistema PEG-dextrana, cujo valor do declive da linha de amarração diminui com o aumento da massa molecular da dextrana. Entretanto, em sistemas PEG-sal, o valor desse parâmetro aumenta com o aumento da massa molecular de PEG (Pereira, 2005).

Sabe-se também que um aumento na massa molecular do polímero, em sistemas PEG/SAL, e ou sua concentração tendem a expulsar as biomoléculas de interesse para fase salina ou fase de polímero com menor massa/concentração em um fenômeno chamado volume de exclusão (BABU *et. al*, 2008).

2.7.2. Efeito da temperatura

O efeito da temperatura nos SDFA depende muito dos tipos de componentes utilizados. Nos SDFA polímero-polímero, a concentração necessária dos mesmos para que a separação de fases ocorra é normalmente maior quanto mais elevada for a temperatura (Albertsson, 1986). Nos SDFA polímero-sal, o efeito é contrário, o aumento da temperatura conduz a uma diminuição das concentrações de polímeros e sal necessárias para o aparecimento das duas fases. No entanto, enquanto alguns trabalhos relatam um aumento do coeficiente de partição com a temperatura (Johansson *et al.*, 1984), outros demonstram que relação entre o coeficiente de partição e a temperatura não foi verificada em seus estudos (Tjerneld *et al.*, 1985), portanto, cria-se a necessidade de aprofundar investigações de forma a esclarecer o efeito deste parâmetro sobre a partição.

2.7.3. Efeito de aditivos de baixa massa molar

Segundo Zaslavsky (1995), a adição de solutos de baixa massa molecular, quer iônicos (sais inorgânicos), quer não iônicos (uréia), afetam a partição de solutos nos SDFA. A partição de solutos por adição de compostos de baixa massa molecular é afetada por dois mecanismos: efeito promovido pelo aditivo na composição e propriedades das fases; alterações promovidas pelo aditivo no soluto.

Em relação ao primeiro tipo, não foram encontrados dados que permitam diferenciar os efeitos dos aditivos nas propriedades das fases, dos efeitos nas propriedades de um soluto e, segundo Zaslavski (1995), seria necessária mais informação experimental, incluindo estudos dos efeitos de aditivos em diagramas de fases, além de várias propriedades físico-químicas das fases, para a compreensão do efeito.

O segundo mecanismo pode acontecer quando, por exemplo, uma proteína mude de tamanho, sofra alterações conformacionais ou se ligue especificamente ao aditivo. Estas alterações muito específicas podem alterar drasticamente o valor do coeficiente de partição.

2.7.4. Efeito da adição de sais

A composição do sal é outra variável de grande importância na partição de todas as espécies de biomoléculas e partículas celulares. Embora, os sais se separem igualmente entre as fases, a adição de sais e o seu efeito nos sistemas variam consoante o tipo de sal e o próprio sistema (Costa *et al.*, 2000).

Os sais de fosfato têm maior afinidade pela fase inferior do SDFA, por outro lado, o lítio tem maior afinidade pela fase superior, enquanto o NaCl tem afinidade por ambas as fases. Portanto, os sais que possuem distribuição diferenciada entre as duas fases são importantes para o sistema, visto eles possuírem uma grande influência na diferença de potencial entre as duas fases (Porto, 2006).

No caso da partição de materiais eletricamente carregados, a adição de sais mesmo em concentrações milimolares, influencia fortemente a partição. Embora os sais tenham uma distribuição igual entre as fases, existem pequenas diferenças nos coeficientes de partição de diferentes sais, o que significa que diferentes íons possuem diferentes afinidades pelas fases, criando uma diferença potencial elétrico entre as fases, que por sua vez direciona a partição das biomoléculas carregadas (Sarubbo, 2000).

No caso específico deste trabalho, um sistema PEG/NaPA sem a presença de sais faria com que a força de separação eletrostática, que de é determinada pela maioria iônica, dependesse tão somente dos íons dos grupos carboxílicos presentes no NaPA. Estes por terem uma distribuição desigual no sistema fariam com que a maioria iônica não fosse determinável e assim força eletrostática não seria uma força válida de separação (Johansson *et al.*, 2008).

Em concentrações de NaCl acima de 1% a maior parte de íons presentes no sistema passam a ser de origem do NaCl ao invés de NaPA e quanto maior a concentração do sal maior a diferença eletrostática entre as fases. Quanto ao Na₂SO₄, em concentração de 6% a concentração dos íons estão igualmente distribuídas entre sulfato, sódio e grupos carboxílicos. Concentrações mais altas de Na₂SO₄ deixariam o PEG mais concentrado,

provavelmente devido ao aumento do efeito hidrofóbico causado pelo sal com respectiva diminuição dos volumes das frações (Johansson *et al.*, 2008).

A adição de sais neutros, tais como NaCl, em um sistema PEG/dextrana tende a diminuir o coeficiente de partição das proteínas carregadas negativamente e tende a aumentar o coeficiente de partição das proteínas carregadas positivamente. A magnitude do efeito aumenta na seguinte ordem: $\text{SO}_4^{-2} < \text{F}^- < \text{Cl}^- < \text{I}^-$ e $\text{NH}_4^+ < \text{Na}^+ < \text{K}^+$ (Cascone *et al.*, 1991; Schmidt *et al.*, 1996). Por Cl^- ser mais hidrofóbico que o SO_4^{-2} e o PEG ser mais hidrofóbico que o NaPA espera-se que ao se utilizar NaCl a fase superior seja negativa e a inferior positiva e ao se utilizar o Na_2SO_4 o inverso ocorra (Johansson *et al.*, 2008).

O fato de a partição depender de um grande número de variáveis distintas confere considerável versatilidade aos sistemas de duas fases aquosas na separação de misturas e componentes.

2.7.5. Efeito do pH

A influência da carga da biomolécula pode ser estudada medindo o coeficiente de partição a vários valores de pH. No entanto, o efeito da variação do pH de um meio tamponado não pode ser facilmente diferenciado da adição de sais, pois ao variar o pH da solução, a razão entre a concentração de sais com poder tamponante varia também (Zaslavsky, 1995). Deste modo, as propriedades do meio aquoso podem ser alteradas por determinadas variações de pH e/ou composição do sal tampão correspondente.

Geralmente, a partição de proteínas desnaturadas é diferente da partição das mesmas proteínas na forma nativa, o que pode ser atribuído não somente à maior área superficial da forma desnaturada, mas também ao fato da superfície exposta desta ser muito mais hidrofóbica (Albertsson, 1986). Como regra geral, proteínas carregadas mais negativamente (nos casos em que o pH é superior ao PI) têm maior afinidade pela fase superior que é rica em PEG.

2.7.6. Efeitos das características do soluto

Os efeitos do tamanho do soluto (massa molecular) e da sua estrutura química são de difícil distinção (Zaslavsky, 1995). Por exemplo, Zaslavsky e seus colaboradores estudaram a partição do PEG e do PVA (polivinil álcool) e constataram que a partição era independente da massa molecular do polímero, no entanto, no caso das poliácridamidas verificaram que o coeficiente de partição aumentava com a massa molecular. Por outro lado, para a polivinilpirrolidina o coeficiente de partição diminuía com o aumento da massa molecular. Com isso Zaslavsky e a sua equipe concluíram que não é o tamanho do soluto que influencia a partição do soluto, mas sim a sua estrutura química.

A influência da estrutura química da biomolécula pode ser explicada pelo fato de a molécula poder sofrer modificação bioquímica/química, uma vez que a partição é muito específica e depende do tipo de molécula (Zaslavsky, 1995).

2.8. Aplicação de Planejamentos Experimentais em SDFA

A utilização de planejamentos experimentais é uma boa ferramenta para se conhecer as relações entre os principais fatores que influenciam um SDFA com cada tipo de extração e de proteína que se deseja separar. Alguns dos fatores, conhecidos como de primeira ordem, que se analisa são: massa molar do polímero, concentração do polímero e do sal, pH e temperatura. As relações dos fatores de primeira ordem entre si são conhecidas como interações de segunda ordem.

Um planejamento experimental ou fatorial consiste em uma série de ensaios em que a cada estudo envolve todas as possíveis combinações dos níveis e fatores a serem investigados. Para qualquer experimento que possui um número k de fatores, cada um com apenas dois níveis (ex.: superior (+1) e inferior (-1)), são conhecidos como planejamento experimental de dois níveis (2^k). O número de ensaios experimentais necessários para completar uma replicata de estudo é dada por $2 \times 2 \times \dots \times 2 = 2^k$ onde k é o número do fator, dando assim seu nome (AHMAD et. al, 2008).

Se for possível assumir que certas interações de primeira ordem no sistema de duas fases aquosas possuem efeitos negligenciáveis então as informações dos principais efeitos juntamente com as interações de segunda ordem podem ser obtidas executando apenas uma fração do planejamento completo (AHMAD et. al, 2008).

Mayerhoff e colaboradores (2004) utilizaram um planejamento experimental 2^4 para avaliar a influência das variáveis massa molar do PEG, concentração do PEG, concentração de fosfato e concentração de NaCl na extração de xilose redutase utilizando sistemas de duas fases aquosas.

Porto e colaboradores (2008) otimizaram a extração de proteases de *Clostridium perfringens* utilizando três planejamentos experimentais sucessivos (um 2^4 e dois 2^3) em SDFA PEG/citrato. A massa molar do PEG (fixa no 2^3), concentração do PEG, concentração do citrato e pH foram as variáveis independentes enquanto que, coeficiente de partição, rendimento de atividade, fator de purificação e seletividade foram as variáveis de resposta.

Moktharani e colaboradores (2008) estudaram o coeficiente de partição do antibiótico *Ciprofloxacin* em sistema de duas fases aquosas PEG/ Na_2SO_4 utilizando um planejamento experimental completo 2^3 , avaliando as influências da temperatura, concentração de sal, concentração do polímero e sua massa molar.

A elaboração de planejamentos experimentais tem sido de fundamental importância

nestes estudos, pois reduz o número de experimentos necessários, indicando as principais variáveis que interferem significativamente no SDFA e ainda indica os efeitos de interação entre as mesmas.

2.9. Fermentação Extrativa em Sistema de duas fases aquosas (SDFA)

A fermentação extrativa, um processo que integra produção e recuperação *in situ*, é o método de escolha para aumentar o rendimento e produtividade volumétrica de processos biotecnológicos e reduzir os efeitos dos inibidores (Sinha, et al., 2000). O processo proporciona redução do número de etapas de purificação, que é de fundamental importância na viabilidade do processo (Kwon., et al., 1996). Por exemplo, se a biomolécula se concentrar na fase PEG, por adição de uma solução concentrada de sal, um sistema PEG/sal será formado. A biomolécula pode ser particionada para fase rica em sal e a fase PEG reciclada. A fase sal pode então ser diafiltrada e uma solução de enzima purificada e concentrada pode ser obtida (Persson, et al., 1991).

A fermentação extrativa, em princípio, proporciona vantagens maiores que a fermentação convencional, principalmente em relação ao menor custo na recuperação do produto (Viana, 2007). Em uma fermentação extrativa ideal, as células e o substrato devem se concentrar de preferência em uma das fases do sistema, enquanto que a biomolécula-alvo (produto) deve concentrar-se na fase oposta. Tal situação facilitaria a remoção do produto do seu local de produção logo que este fosse formado, assim eliminando a influência de inibidores e realizando a purificação primária (Sinha, et al., 2000).

Um grande número de processos de fermentação extrativa em SDFAs tem sido reportado na literatura. Exemplos incluem a produção de: proteases alcalinas por *Bacillus licheniformis* (Lee & Chang, 1990); enzimas celulolíticas por *Trichoderma reesei* C30 (Persson, et al., 1989); etanol-butanol- acetona por *Clostridium acetobutylicum* (Kim & Weigand, 1992); surfactina de *Bacillus subtilis* (Drouin & Cooper, 1992); α -amilase por *Bacillus amyloliquefaciens* (Kim & Yoo, 1991; Stredansky, et al., 1993); subtilina por *Bacillus subtilis* (Kuboi, et al., 1994); β -galactosidase por *Escherichia coli* (Kuboi, et al., 1995); quitinase de *Serratia marcescens* (Chen & Lee, 1995); e ácido láctico por *Lactobacillus lactis* (Dissing & Mattiasson, 1994; Kwon, et al., 1996).

A recuperação de produtos por métodos integrados (fermentação e extração) provenientes de polímeros biodegradáveis (PEG) podem ser aceitos facilmente na indústria alimentícia e farmacêutica. Para os antibióticos, os métodos integrados ainda são muito caros (Schügerl, 2000) e, neste contexto, fermentação extrativa explora o uso de SDFA como tecnologia atrativa na remoção de produtos de interesse oriundos do caldo fermentado, seja o produto intracelular ou extracelular (Fig. 4) (Rito-Palomares, 2004).

FIGURA 5. Representação simplificada do processo integrado do SDFA e fermentação para produtos intra e extracelulares. O diagrama selecionado representa o processo de fermentação em SDFA, no qual, a produção e recuperação do produto alvo podem ser integradas numa única operação. Também está a fase do rompimento celular para a recuperação dos produtos intracelulares (Rito-Palomares, 2004).

3. Materiais e métodos

3.1. Materiais

O ácido clavulânico utilizado foi o comercial puro da Sigma-Aldrich.

Os polímeros a serem utilizados inicialmente nesse estudo foram: Polietileno glicol 400, 2000, 4000 e 8000 g/mol (Merck) e ácido poliacrílico (sal de sódio) de massa molar 8000 g/mol (Sigma-Aldrich). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico. As soluções foram preparadas em tampão McIlvaine pH 6,47, consistindo de 5,3 mM de fosfato de sódio dibásico e 1,36 mM de ácido cítrico. Será utilizada água deionizada por sistema de purificação de água Millipore tipo Milli-Q (Bedford, MA).

3.1.1. Microorganismo

O ácido clavulânico produzido nas fermentações extrativas foi obtido a partir do cultivo de *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064, que já vem sendo realizado pelo grupo de pesquisa do laboratório do Professor Adalberto Pessoa Jr. A cultura de *Streptomyces* pertence à Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos da UFPE (DAUFPE) e foi cedida gentilmente pela Prof^a. Dra. Janete Magali Araújo.

3.1.2. Meios de Reativação, Manutenção, Inóculo e Cultivo

Para a reativação das linhagens foi utilizado o meio de cultivo proposto por Ortiz *et al.* (2007) constituído de glicerol (1,5% p/v), peptona bacteriológica (1,0% p/v), extrato de malte (1,0% p/v), extrato de levedura (0,1% p/v), K₂HPO₄ (0,25% p/v), MgSO₄. 7H₂O (0,075 % p/v), 1 mL de solução mineral (100 mg de FeSO₄. 7H₂O; 100 mg de MnCl₂ 4H₂O;

100 mg de ZnSO₄. H₂O; água destilada q.s.p. 100 mL), sem a adição de tampão MOPS. O meio de manutenção possui como diferença em relação ao de reativação apenas a adição de 1,5% de Agar. As linhagens armazenadas em glicerol a 10% (v/v) foram reativadas em Erlenmeyers de 150 mL contendo 15 mL de meio de cultivo em agitador orbital a 200 rpm, 28°C por 24h.

Para o inóculo, a linhagem de *Streptomyces* reativada foi transferida para um Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo constituído de glicerol (1,0% p/v), farinha de soja (2,0% p/v), extrato de malte (1,0% p/v), extrato de levedura (0,1% p/v), K₂HPO₄ (0,12% p/v), 1 mL de solução mineral (100 mg de FeSO₄. 7H₂O; 100 mg de MnCl₂ 4H₂O; 100 mg de ZnSO₄. H₂O; água destilada q.s.p. 100 mL), sem a adição de óleo de soja (MARANESI *et al.*, 2005). As culturas foram incubadas em agitador orbital por mais 24h, sob as mesmas condições descritas anteriormente.

Foram realizadas fermentações utilizando Erlenmeyers de 250mL contendo 50 mL de meio de cultivo, no qual foi adicionado o inóculo correspondendo a 10% do volume total. O meio de cultura para a fermentação foi o mesmo utilizado para o preparo do inóculo. O pH do meio foi ajustado para 6,8 com NaOH 5,0 M antes de autoclavagem a 121 °C por 15 min.

3.2. Métodos

3.2.1. Ensaios de partição em sistemas poliméricos de duas fases aquosas estacionários.

Os SDFA foram preparados em tubos de ensaio graduados de 15 mL, pela adição de ácido poliacrílico (NaPA), polietileno glicol (PEG), solução salina (Na₂SO₄ ou NaCl) e da solução de ácido clavulânico (comercial - pura) nas quantidades desejadas em tampão Mcllvaine, resultando num sistema de massa total de 10 g. Os componentes de cada sistema foram acrescentados por pesagem, e homogeneizados por revolução a 7rpm overnight, no dia dos ensaios a biomolécula foi adicionada na concentração de 300µg/mL e o sistema novamente homogeneizado, agora em vórtice por 30 segundos. Em seguida, os sistemas foram transferidos para um banho de temperatura controlada a 25°C e mantidos em repouso por 60 minutos para separação de fases e equilíbrio das mesmas. Após o repouso, amostras das fases superiores e inferiores foram coletadas cuidadosamente, utilizando-se pipetadores automáticos. Para cada sistema foi feito um branco equivalente que consistia dos mesmos componentes com exceção do ácido clavulânico que era substituído por equivalente de água milli-Q.

3.2.2. Ensaios preliminares de fermentação extrativa por SDFA em frascos agitados.

Foram realizados ensaios utilizando Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo do SDFA nas condições definidas no item 3.1.2., aos quais foi adicionada uma suspensão de esporos na concentração final de 10^6 células.mL⁻¹, correspondendo a 10% do volume total. Os frascos foram incubados em agitador orbital com 100 rpm a 28°C, por 96h, e, a cada 24h, alíquotas foram retiradas de cada amostra para acompanhar a produção de ácido clavulânico e consumo de glicerol.

3.2.3. Determinação da concentração do ácido clavulânico

A determinação da concentração do ácido clavulânico foi realizada pelo método descrito por Bird *et al.*, 1982. Esse método se baseia na determinação de um composto oriundo da derivatização do ácido clavulânico com imidazol, através de espectrofotometria a 311 nm. De acordo com a literatura, essa metodologia vem sendo utilizada por muitos autores (Ortiz *et al.*, 2007; Bersanetti *et al.*, 2005; Maranesi *et al.*, 2005) e tem provado ser confiável, pois, possui uma sensibilidade inerente elevada de 99,52%.

3.2.4. Determinação da concentração do glicerol

A concentração de glicerol (substrato para produção de ácido clavulânico por fermentação) ao longo do processo fermentativo foi determinada por método colorimétrico como descrito por Bok e Demain (1977). O método é baseado na oxidação do glicerol pelos íons periodato produzindo formaldeído, que ao reagir com Reagente de Nash forma 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina, de coloração amarelada com máximo de absorbância a 412 nm.

Para 1mL de meio fermentado diluído adicionou-se 1mL de metaperiodato de sódio 0,015 M preparado em HCl 0,12 M. Em seguida, 2mL de ramnose 0,1% foram adicionados para remover excesso de íons periodato. Após homogeneização, adicionaram-se 4mL de Reagente de Nash (acetil-acetona, acetato de amônio e ácido acético glacial) à mistura, que foi homogeneizada e mantida em banho termoregulado a 53°C por 15 minutos antes de ser submetida a análise espectrofotométrica.

4. Metodologia de análise dos resultados

4.1. Coeficiente de Partição

Os resultados obtidos foram analisados primeiramente em termos de coeficiente de partição, K_p , o qual pode ser expresso por:

$$K \equiv \frac{[AC]_T}{[AC]_B} \quad (\text{equação 1})$$

Em que: $[AC]_T$ e $[AC]_B$ correspondem às concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de ácido clavulânico na fase superior e na fase inferior, respectivamente.

4.2. Balanço de Massa

Os balanços de massa para biomoléculas foram calculados de acordo com a expressão:

$$BM = \frac{[AC]_T V_T + [AC]_B V_B}{[AC]_{in} V_{in}} \times 100 \% \quad (\text{equação 2})$$

Em que: $[AC]_T$, $[AC]_B$ e $[AC]_{in}$ referem-se às concentrações ($\mu\text{g/mL}$) da biomolécula nas fases superior, inferior e na solução inicial adicionada ao sistema, respectivamente. V_T , V_B e V_{in} são os volumes das fases superior, inferior e da solução inicialmente adicionada ao sistema, respectivamente.

4.3. Rendimento (η)

Os rendimentos da partição do Ácido Clavulânico também foram avaliados com base no valor da concentração da biomolécula na fase em que se encontra concentrada, sendo η , definido na Eq. 3.

$$\eta = \frac{[AC]_{fase} V_{fase}}{[AC]_{in} V_{in}} \times 100 \% \quad (\text{equação 3})$$

Em que: $[AC]_{fase}$ refere-se à concentração ($\mu\text{g/mL}$) de Ácido Clavulânico na fase concentrada; V_{fase} ao volume da fase concentrada; $[AC]_{in}$, a concentração do ácido adicionada inicialmente; V_{in} , ao volume de solução de ácido adicionada inicialmente ao sistema.

4.4. Razão Volumétrica (R)

Foi calculada, também, a razão volumétrica (R) entre ambas as fases do sistema, V_T = volume superior (mL) e V_B = volume inferior (mL) através da expressão (Eq. 4):

$$R \equiv \frac{V_T}{V_B} \quad (\text{equação 4})$$

O limite de significância para todas as análises estatísticas foi de $\alpha = 0,05$, resultando, portanto em um intervalo de confiança de 95% e o programa empregado para tais análise foi o **Statistica 9.0** (STATSOFT).

5.0. Objetivos

O objetivo geral desse trabalho foi desenvolver um sistema polimérico de extração líquido-líquido de duas fases aquosas utilizando polietilenoglicol e ácido poliacrílico. Para que o objetivo proposto fosse alcançado, os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

- Utilizar ácido poliacrílico com massa molar definida em 8000 g/mol sob diferentes concentrações e polietilenoglicol em diferentes massas molares, também sob diferentes concentrações, avaliando suas influências no coeficiente de partição do ácido clavulânico e otimizando sua extração.
- Estudar e otimizar o efeito do Na_2SO_4 em diferentes composições de PEG no coeficiente de partição do ácido clavulânico.
- Estudar o efeito do NaCl em diferentes composições de PEG no coeficiente de partição do ácido clavulânico.
- Estudar o efeito da concentração de NaCl e Na_2SO_4 em diferentes composições de PEG e ácido poliacrílico 8000g/mol no coeficiente de partição do ácido clavulânico.

6. Resultados e Discussões

6.1. Diagramas de Fases

Os principais diagramas de fases dos sistemas poliméricos de duas fases aquosas envolvendo polietilenoglicol e ácido poliacrílico utilizados, PEG 4000/NaPA 8000/ Na_2SO_4 e PEG 4000/NaPA 8000/NaCl foram construídos anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa durante visita à FCF/USP do professor Dr. Hans Olof Johansson, da Universidade de Lund, Suécia e estão dispostos nos Anexos I (HANS-OLOF et. al, 2011).

6.2. Estudos de Partição de Ácido Clavulânico

Ensaio de partição foram inicialmente realizados com base nas melhores condições obtidas da monografia, desenvolvida em nosso laboratório, de Pereira (2005) e apresentadas na Tabela 1. Confirmando-se a reprodutibilidade dos resultados por repetição simples, Tabela 2, optou-se por trabalhar com o sistema “a”, o qual proporcionava maior coeficiente de partição (K) de valor 8,59 em relação ao sistema “b” com $k = 6,79$, provavelmente, isto se deu devido à diferença dos sais empregados nos dois sistemas. NaCl tende a aumentar o volume da fase superior PEG (ou comprimir o volume da fase inferior

rica em NaPA) diminuindo a repulsão entrópica (força macroscópica cujas propriedades não são primordialmente determinadas por uma força microscópica subjacente mas sim pela tendência estatística geral do sistema de aumentar sua entropia) e hidrofobicidade da fase PEG, enquanto que Na_2SO_4 apresenta comportamento inverso (Johansson *et al.*, 2008). Tais características de NaCl levariam a uma menor concentração do NaPA na fase superior (volume aumentado), acarretando um menor K no sistema “b” assim como foi observado. Tal diferença volumétrica pode ser comprovada pela razão volumétrica (R) de 0,65 para o sistema “b” exposta na tabela 2, quando comparada ao valor de 0,26 do sistema “a”.

TABELA 1. Condições extraídas de (Pereira, 2008). Onde, MPEG = Massa Molar do PEG; CPEG= Concentração do PEG; MNaPA = Massa Molar do NaPA.

Sistema	MPEG	CPEG	MNaPA	CNaPA	pH	Sal
a	4000	10%	8000	20%	6,5	Na_2SO_4 6%
b	4000	20%	8000	20%	6,5	NaCl 1,05%

TABELA 2. Resultados da repetição dos experimentos de Pereira (2008) adicionando 300µg/mL de Ácido Clavulânico Sigma Puro aos sistemas “a” e “b”. Onde, R=Razão volumétrica; K=Coefficiente de partição; BM=Balanço de Massa; ηT =Rendimento da Fase Superior (mais concentrada).

Sistema	R		K		BM		ηT	
	Pereira (2008)	Rosso	Pereira (2008)	Rosso	Pereira (2008)	Rosso	Pereira (2008)	Rosso
a	0,25±0,03	0,26	10,56±2,86	8,59	90±8 %	67%	68±7 %	46%
b	0,75±0,09	0,65	5,91±0,75	6,79	88±6%	58%	72,5±5 %	47%

6.3. Ensaios de Partição Utilizando Na_2SO_4 a 6%

6.3.1. Estudo de Partição de Ácido Clavulânico sob MPEG 2000, 4000 e 8000 e NaPA 8000 utilizando Na_2SO_4

A partir dos resultados apresentados na Tabela 2 desenvolveu-se um planejamento fatorial completo 2^3 (Tabela 3), em que o ponto central do experimento (PC ou 0) estava próximo a melhor condição encontrada anteriormente (sistema “a”, Tabela 1) na expectativa de que os resultados estatísticos delineassem uma tendência que pudesse ser seguida com confiança.

TABELA 3. Planejamento Fatorial Completo 2³.

	-1	0	1
MPEG	2000	4000	8000
CPEG	5	10	15
CNaPA	10	15	20

Cada Sistema foi montado conforme descrito na Tabela 4 e possuía seu equivalente sem a adição do ácido clavulânico e sim de água para servir de branco nas análises. Após aplicação das fórmulas, já mencionadas na seção 5 deste trabalho, obtiveram-se os resultados expostos na mesma tabela, os quais foram devidamente tratados estatisticamente. Os melhores sistemas encontrados neste planejamento foram o 7 e o 8 com respectivamente K=15,26 e $\eta T=70,89$ e K=16,92 e $\eta T=67,61\%$.

TABELA 4. Resultados obtidos a partir das análises das fases dos sistemas dispostos na Tabela 3. Onde, R=Razão Volumétrica; [AC] T=Concentração de Ácido Clavulânico na Fase Superior; [AC] B=Concentração de Ácido Clavulânico na Fase Inferior; K= Coeficiente de Partição; BM=Balanço de Massa; ηT =Rendimento da Fase Superior; ηB =Rendimento da Fase Inferior.

Sistemas	MPEG	CPEG (%)	CNaPA (%)	R	[AC] T	[AC] B	K	BM (%)	ηT (%)	ηB (%)
1	2000	5	10	0,18	65,7	21,05	3,12	80,39	28,47	51,92
2	8000	5	10	0,16	82,3	17,48	4,71	76,63	32,92	43,71
3	2000	15	10	0,59	58,06	18,76	3,1	95,69	61,93	33,76
4	8000	15	10	0,53	46,97	12,3	3,82	70,35	46,97	23,38
5	2000	5	20	0,11	250,79	18,06	13,89	111,43	66,88	44,55
6	8000	5	20	0,11	240,73	16,06	14,99	104,35	64,19	40,15
7	2000	15	20	0,37	96,67	6,33	15,26	83,34	70,89	12,46
8	8000	15	20	0,4	88,18	5,21	16,92	77,68	67,61	10,08
9	4000	10	15	0,29	101,42	8,7	11,66	83,08	64,24	18,84
10	4000	10	15	0,29	108,12	9,45	11,44	88,96	68,48	20,48
11	4000	10	15	0,31	113,27	10,97	10,33	99,28	75,52	23,77
12	4000	10	15	0,29	116,36	9,15	12,72	93,53	73,7	19,83

6.3.1.1. Análise Estatística do Planejamento 2³

6.3.1.2. Resposta K

Para a variável de resposta K o único efeito significativo para alterar seus valores foi a concentração de Ácido Poliacrílico de Sódio (CNaPA) e este foi de caráter positivo (**Figura 6**), ou seja, quanto maior a concentração do mesmo, maior o valor de K. Isto leva a crer que maiores concentrações de NaPA expulsam a molécula de ácido clavulânico para a fase superior, PEG, provavelmente devido à repulsão de cargas exercida entre o NaPA e o Ácido Clavulânico, ambos carregados negativamente. Outro fator iônico relevante é de que o sistema PEG/NaPA é eletetroneutro e cada entrada de 2 biomoléculas (carga negativa -1 cada) na fase superior deve ocasionar a saída de um íon sulfato (carga -2) em um processo termodinamicamente favorável, devido ao sulfato ter maior repulsão pelo PEG do que o antibiótico (Johansson *et al.*, 2008).

FIGURA 6. Gráfico de Pareto dos Efeitos estudados sobre a variável K. Única resposta significativa (3) CNaPA (16,71). Valor de efeito, não corresponde a valor real.

6.3.1.3. Respostas η_T e R

Para a variável de resposta η_T (rendimento de fase superior) tanto CNaPA quanto CPEG (concentração de polietilenoglicol) proporcionaram efeitos positivos e significantes (**Figura 7**), indicando que, quanto maior a concentração de ambos maior o rendimento/recuperação da biomolécula de ácido clavulânico naquela fase. Sendo o efeito da CNaPA maior que o do CPEG pode-se deduzir que a repulsão de cargas causadas pelo NaPA exerce influência maior no deslocamento da biomolécula que a concentração do PEG, isto pode ser explicado olhando-se para a **Figura 8** que representa a interação de CNaPA e CPEG na Razão Volumétrica dos sistemas. Quanto maior CPEG e menor CNaPA maior o R e por consequência maior volume de fase superior o que diminui o rendimento superior. Logo, um maior CNaPA elevaria a concentração de ácido clavulânico na fase superior por alterar as cargas dos sistemas e por diminuir o volume da fase enquanto CPEG só seria relevante perante alteração de volumes uma vez que PEG é neutro.

FIGURA 7. Gráfico de Pareto dos Efeitos estudados sobre a variável ηT . Variáveis significantes CNAPA e CPEG. Valores apenas de efeito, não correspondem a valores reais.

FIGURA 8. Gráfico de Interação das Médias dos Efeitos CNAPA e CPEG (interação 2 por 3) na variável R. Melhor resposta ($,557$) na interação de CPEG 15% com CNAPA 10%. Valores apenas de efeito, não correspondem a valores reais.

Outra interação significativa para a variável R foi a positiva entre a CNAPA e MPEG (massa molar do PEG) no **Figura 9** em que uma diminuição de ambos ocasionou um aumento na razão volumétrica. No entanto, o efeito isolado do CNAPA foi negativo, sua diminuição aumentava o R, enquanto que o efeito isolado de MPEG não foi significativo (gráfico não apresentado).

6.3.1.4. Resposta BM

Para a variável BM (Balanço de Massa) a única variável significativa foi a interação, de caráter negativo, entre CPEG e CNaPA (**Figura 10**). Isto mostra que quanto maior CNaPA e menor CPEG maior o Balanço de Massa, indicando que haveria menos perda de biomolécula para a interfase. Positivamente é o mesmo tipo de resposta que pode gerar condições favoráveis para acúmulo de biomolécula na fase superior como visto na discussão das figuras 7 e 8.

FIGURA 9. Gráfico de Interação das Médias dos Efeitos MPEG e CNAPA (interação 1 por 3) na variável R. Melhor resposta (,381) na interação de MPEG 2000 com CNAPA 10%. Valores apenas de efeito, não correspondem a valores reais.

FIGURA 10. Gráfico de Interação das Médias dos Efeitos CNAPA e CPEG (2 por 3) na variável BM. Melhor resposta (109,129) na interação de CPEG 5% com CNAPA 20%. Valores apenas de efeito, não correspondem a valores reais.

6.3.2. Repetição do Estudo de Partição de Ácido Clavulânico sob MPEG 2000, 4000 e 8000 e NaPA 8000 utilizando Na_2SO_4

Para fins de averiguação dos valores de K descritos na tabela 4, que se encontravam acima do esperado relação ao ensaio anterior (item 6.2) de comparação com PEREIRA 2005. Assim sendo, o ensaio foi repetido.

TABELA 5. Resultados obtidos a partir da repetição dos sistemas dispostos na Tabela 3. Onde, R=Razão Volumétrica; [AC] T=Concentração de Ácido Clavulânico na Fase Superior; [AC] B=Concentração de Ácido Clavulânico na Fase Inferior; K= Coeficiente de Partição; BM=Balanço de Massa; ηT =Rendimento da Fase Superior; ηB =Rendimento da Fase Inferior.

Sistemas	MPEG	CPEG (%)	CNaPA (%)	R	[AC] T	[AC] B	K	BM (%)	ηT (%)	ηB (%)
1	2000	5	10	0,19	42,21	12,34	3,42	85,01	33,67	51,34
2	8000	5	10	0,16	42,72	13,53	3,16	57,77	29,21	28,56
3	2000	15	10	0,59	37,95	4,37	8,68	82,66	69,2	13,46
4	8000	15	10	0,56	40,27	5,35	7,52	87,9	71,13	16,77
5	2000	5	20	0,12	89,19	9,24	9,65	84,72	45,74	38,98
6	8000	5	20	0,09	91,07	10,01	9,10	79,1	36,32	42,78
7	2000	15	20	0,4	60,74	2,82	21,53	88,77	79,6	9,17
8	8000	15	20	0,37	53,18	2,31	23,07	74,41	66,66	7,75
9	4000	10	15	0,31	55,71	5,10	10,91	82,4	63,49	18,91
10	4000	10	15	0,3	53,31	4,83	11,05	78,9	60,75	18,15
11	4000	10	15	0,3	54,20	4,52	11,98	78,78	61,77	17,01
12	4000	10	15	0,34	54,50	4,34	12,55	78,18	62,1	16,08

Embora os planejamentos tenham apresentado resultados numericamente diferentes, principalmente no âmbito do coeficiente de partição, em ambos as melhores condições foram os ensaios 7 e 8 (Tabelas 4 e 5), tanto as razões volumétricas quanto o balanço de massa (Tabelas 4 e 5) são praticamente idênticos e o mais importante: Suas tendências estatísticas apontaram para os mesmos caminhos - tanto CNaPA quanto CPEG deveriam ser elevados de forma a melhorar as respostas K (Figuras 6 e 11) e η_T (Figuras 7 e 13), as quais são as variáveis de resposta mais importantes visto que a primeira revela a preferência da biomolécula por uma fase específica e a segunda o quanto foi recuperada na fase superior (aquela em que o ácido clavulânico tende a particionar). E, por isso, foram adotadas como principais respostas para todos os planejamentos que se seguem.

A diferença estatística mais marcante entre o primeiro planejamento e sua repetição foi a inclusão da variável independente MPEG como significativa para η_T e que uma diminuição daquela resultaria em um aumento do rendimento superior (figura 13) e quando associada a um aumento da concentração de NaPA também teria o valor de η_T aumentado (Figura 15). A interação CNaPA por CPEG na variável η_T não se alterou entre os planejamentos, o aumento de ambos influi favoravelmente no rendimento superior (Figuras 10 e 14). Então, seguindo esta nova informação de tendência e com uma melhor confiança dos dados um novo planejamento foi desenvolvido. A melhor condição aqui encontrada foi a do ensaio número 7 com um K de 21,53 e η_T de 79,6% e serviu de ponto central no planejamento seguinte.

FIGURA 11. Gráfico de Pareto dos Efeitos estudados sobre a variável K. Respostas significantes: CPEG (2), CNAPA (3) e CPEG por CNAPA (2 por 3). Valores apenas de efeito, não correspondem a valores reais.

FIGURA 12. Gráfico de Interação das Médias dos Efeitos CNAPA e CPEG (2 por 3) na variável K. Melhor resposta (22,495) na interação de CPEG 15% com CNAPA 20%. Valores apenas de efeito, não correspondem a valores reais.

FIGURA 13. Gráfico de Pareto dos Efeitos estudados sobre a variável ηT . Respostas significantes: CPEG (2), MPEG (1), CNAPA (3), MPEG por CNAPA (1 por 3) e CPEG por CNAPA (2 por 3). Valores apenas de efeito, não correspondem a valores reais.

FIGURA 14. Gráfico de Interação das Médias dos Efeitos CNAPA e CPEG (2 por 3) na variável ηT . Melhor resposta (76,19) na interação de CPEG 15% com CNAPA 20%. Valores apenas de efeito, não correspondem a valores reais.

FIGURA 15. Gráfico de Interação das Médias dos Efeitos MPEG e CNAPA (1 por 3) na variável ηT . Melhor resposta (65,691) na interação de MPEG 2000 com CNAPA 20%. Valores apenas de efeito, não correspondem a valores reais.

6.3.3. Estudo de Partição de Ácido Clavulânico sob MPEG 400, 2000 e 4000 e NaPA 8000 utilizando Na₂SO₄

Com base no planejamento anterior e priorizando as variáveis de resposta K e ηT , onde um incremento de CPEG e CNaPA favoreceria o aumento de ambos e um decréscimo de MPEG favoreceria ηT , um novo planejamento foi desenvolvido (Tabela 6), o qual gerou a tabela 7. Os melhores sistemas aqui encontrados para partição do ácido clavulânico foram o 4 e o 7, com respectivos valores K=18,81 e ηT =94,76% para o primeiro e K=19,86 e ηT =88,85% para o segundo (tabela 7).

TABELA 6. Planejamento Fatorial Completo 2³.

	-1	0	1
MPEG	400	2000	4000
CPEG	12,5	15	17,5
CNaPA	17,5	20	22,5

TABELA 7. Resultados obtidos a partir das análises das fases dos sistemas dispostos na Tabela 6. Onde, R=Razão Volumétrica; [AC] T=Concentração de Ácido Clavulânico na Fase Superior; [AC] B=Concentração de Ácido Clavulânico na Fase Inferior; K= Coeficiente de Partição; BM=Balanco de Massa; ηT =Rendimento da Fase Superior; ηB =Rendimento da Fase Inferior.

Sistemas	MPEG	CPEG (%)	CNaPA (%)	R	[AC] T	[AC] B	K	BM (%)	ηT (%)	ηB (%)
1	400	12,5	17,5	0,46	54,79	3,76	14,57	98,86	85,92	12,94
2	4000	12,5	17,5	0,33	57,16	4,90	11,66	92,73	73,76	18,97
3	400	17,5	17,5	0,61	48,82	3,42	14,29	101,78	91,28	10,5
4	4000	17,5	17,5	0,57	51,40	2,73	18,81	103,66	94,76	8,9
5	400	12,5	22,5	0,33	66,45	3,93	16,89	98,26	83,23	15,03
6	4000	12,5	22,5	0,27	69,91	4,79	14,59	93,63	74,43	19,2
7	400	17,5	22,5	0,5	53,55	2,70	19,86	97,8	88,85	8,95
8	4000	17,5	22,5	0,38	40,55	4,22	9,61	71,18	55,87	15,31
9	2000	15	20	0,42	54,50	4,20	12,98	95,08	80,38	14,7
10	2000	15	20	0,41	59,20	3,93	15,05	99,46	85,7	13,76
11	2000	15	20	0,41	60,44	4,04	14,95	101,63	87,49	14,14
12	2000	15	20	0,39	58,54	4,13	14,19	99,57	84,33	15,24

6.3.3.1. Análise Estatística do Planejamento 2³

6.3.3.2. Resposta K

Para a variável de resposta K todas as respostas foram significativas com exceção da interação 1 por 2 (MPEG por CPEG). Os efeitos mais importantes foram: o efeito positivo do CPEG, a interação 1*2*3 (MPEG por CPEG por CNaPA) e efeito negativo do MPEG.

É interessante notar que na figura 17 da interação 1*2*3 os valores de 3 vértices

estão bastante próximos e todos concentrados na região de maior valor de CPEG (17,5%), indicando que provavelmente a variável independente CPEG está exercendo força sobre as demais e influenciando no resultado. Isto é corroborado pelo fato do efeito positivo de CPEG (2) na variável K ser extremamente significativo (figura 16).

Baseando-se apenas no vértice de valor de efeito mais elevado (19,53) da figura 17 teríamos um maior K com aumento de MPEG, aumento de CPEG e diminuição de CNaPA, no entanto, tanto a tendência do planejamento anterior, quanto o efeito independente do MPEG (efeito -3,96) no pareto de K (Figura 16) indicam que uma diminuição da MPEG é que influi positivamente no coeficiente e não seu aumento. Na figura 19 da interação 2*3 (CPEG por CNaPA) um aumento do CPEG e diminuição do CNaPA concomitantes influem na melhoria de K.

Na interação 1*3 (MPEG por CNaPA) da figura 18 o valor mais baixo de MPEG fica claramente definido com valor de efeito bastante próximos 18,044, indicando que MPEG baixa com alta CNaPA possuem um alto efeito sob K enquanto que o efeito isolado CNaPA não é considerado nem menos significativo (Figura 16).

Com este experimento concluiu-se que: o efeito do aumento de CNaPA e CPEG são extremamente fortes e influenciam positivamente nos valores de K, o suficiente para compensar outros valores de efeito mais fracos como MPEG.

FIGURA 16. Gráfico de Pareto dos Efeitos estudados sobre a variável K. Respostas significantes: Todas exceto a CPEG (2), CNAPA (3) e interação MPEG (1) * CPEG (2). Valores apenas de efeito, não correspondem a valores reais.

FIGURA 17. Gráfico de Interação das Médias dos Efeitos MPEG, CPEG e CNAPA (1 por 2 por 3) na variável K. Melhor resposta: (19,53). Valores apenas de efeito, não correspondem a valores reais.

FIGURA 18. Gráfico de Interação das Médias dos Efeitos MPEG, e CNAPA (1 por 3) na variável K. Melhores respostas: (18,044). Valores apenas de efeito, não correspondem a valores reais.

FIGURA 19. Gráfico de Interação das Médias dos Efeitos CPEG, e CNAPA (2 por 3) na variável K. Melhor resposta: (16,171). Valores apenas de efeito, não correspondem a valores reais.

6.3.3.3. Resposta ηT

Para a variável de resposta ηT todas as respostas foram significativas com exceção da variável independente CPEG e da interação 1 por 2 (MPEG por CPEG). Os efeitos mais importantes foram: o efeito negativo da MPEG, o efeito negativo de CNaPA e interação $1*2*3$ (MPEG por CPEG por CNaPA) (Figura 20).

Note-se que na figura 21 da interação $1*2*3$, 5 vértices se apresentam com valores de efeito muito próximos, acima de 80, assim como ocorreu com a resposta K um ou mais efeitos estão influenciando com demasiada força sob os demais. Levando-se em consideração que 4 dos 5 pontos estão concentrados na menor massa molar de PEG, acredita-se que MPEG é o efeito influenciando com mais força e embora o valor de efeito 95,576 seja maior que 92,294, novamente, como já discutido, um aumento de MPEG foge à tendência geral do planejamento e os valores aqui servem apenas como guias e não como regras. O vértice CNaPA 17,5% (menor), CPEG 17,5% (maior) e MPEG 400 (menor) obedece a todos os efeitos de pareto da figura 20 e tem o segundo maior valor de efeito, sendo aqui então considerado o melhor.

FIGURA 20. Gráfico de Pareto dos Efeitos estudados sobre a variável ηT . Respostas significantes: Todas exceto CPEG (2) e a interação MPEG (1) por CPEG (2). Valores apenas de efeito, não correspondem a valores reais.

FIGURA 21. Gráfico de Interação das Médias dos Efeitos MPEG, CPEG e CNaPA (1 por 2 por 3) na variável ηT . Melhores respostas: (95,57) e (92,29). Valores apenas de efeito, não correspondem a valores reais.

6.3.3.4. Próximo Planejamento

O próximo planejamento foi executado fixando MPEG em 400 g/mol (mais baixo valor), uma vez que já é um valor extremamente baixo e consta na literatura (SILVA et al., 2009) como o valor otimizado de purificação de ácido clavulânico ao se utilizar sistema PEG/fosfato e fermentação extrativa. Aumentou-se CPEG e também, ligeiramente, CNaPA de forma a comprovar se seu aumento geraria respostas mais altas ou se tal ocorrência era por efeito de influência de outros fatores. O sistema 4, um dos melhores resultados aqui encontrados, foi utilizado como ponto de máximo no planejamento seguinte, isto se deve ao fato de como demonstrado no item 6.5.1, tal sistema representa o limite de precipitação dos componentes e consequente instabilidade de manuseio do mesmo.

6.3.4. Estudo de Partição de Ácido Clavulânico sob MPEG 400 e NaPA 8000 utilizando Na_2SO_4

Com base no planejamento anterior, e mantendo o ponto de máximo na condição na condição PEG 400, CPEG 17,5% e CNaPA 22,5% ao invés de central, utilizando os demais pontos em torno do mesmo e priorizando as variáveis de resposta K e ηT , MPEG foi fixada em 400 por já estar em valor muito baixo e valores baixos favoreciam ambas as respostas, CPEG foi elevada, pois favorecia K e CNaPA ligeiramente elevada para comprovar se um

aumento favoreceria os valores K na interação 1*2*3. O novo planejamento está descrito na Tabela 8 e gerou a tabela 9, onde se pode ver o sistema 4 com os melhores resultados: K=19,14 e $\eta T=91,21\%$.

TABELA 8. Planejamento Fatorial Completo 2².

	-1	0	1
MPEG	400	400	400
CPEG	15	16,5	17,5
CNaPA	20	21,25	22,5

TABELA 9. Resultados obtidos a partir das análises das fases dos sistemas dispostos na Tabela 8. Onde, R=Razão Volumétrica; [AC] T=Concentração de Ácido Clavulânico na Fase Superior; [AC] B=Concentração de Ácido Clavulânico na Fase Inferior; K= Coeficiente de Partição; BM=Balanço de Massa; ηT =Rendimento da Fase Superior; ηB =Rendimento da Fase Inferior.

Sistemas	MPEG	CPEG (%)	CNaPA (%)	R	[AC] T	[AC] B	K	BM (%)	ηT (%)	ηB (%)
1	400	15	20	0,49	41,92	4,15	10,10	100,69	83,79	16,89
2	400	15	22,5	0,46	45,87	3,24	14,16	101,71	88,28	13,43
3	400	17,5	20	0,55	37,69	2,92	12,90	92,38	80,91	11,47
4	400	17,5	22,5	0,45	49,28	2,57	19,14	101,69	91,21	10,48
5	400	16,25	21,25	0,51	44,65	3,78	11,81	104,08	89,25	14,84
6	400	16,25	21,25	0,48	45,01	3,43	13,11	100,36	86,63	13,73
7	400	16,25	21,25	0,51	45,08	4,05	11,14	105,99	90,11	15,88
8	400	16,25	21,25	0,54	45,33	4,08	11,12	109,65	93,95	15,70

6.3.4.1. Análise Estatística do Planejamento 2²

6.3.4.2. Resposta K

Apenas a resposta CPEG foi significativa e de influência positiva (Figura 22), quanto maior CPEG maior valor de K.

FIGURA 22. Gráfico de Pareto dos Efeitos estudados sobre a variável K. Resposta significativa: Apenas CPEG (1). Valores apenas de efeito, não correspondem a valores reais.

6.3.4.3. Resposta ηT

Tanto o efeito negativo de CNaPA quanto da interação CPEG por CNaPA (1 por 2) foram significativos (Figura 23). Quanto menor CNaPA e maior o CPEG melhor o rendimento superior (Figura 24).

FIGURA 23. Gráfico de Pareto dos Efeitos estudados sobre a variável ηT . Respostas significantes: CNaPA (2) e a interação CPEG (1) com CNaPA (2). Valores apenas de efeito, não correspondem a valores reais.

FIGURA 24. Gráfico de Interação das Médias dos Efeitos CPEG e CNaPA (1 por 2) na variável ηT . Melhor resposta: (96,63). Valores apenas de efeito, não correspondem a valores reais.

6.3.4.4. Resultado Otimizado Na₂SO₄

Este planejamento confirmou que CNaPA exerce forte influência negativa apenas no rendimento superior não sendo significativo para o coeficiente de partição o qual possui apenas CPEG como efeito significativo. Provavelmente no caso do planejamento anterior (item 6.3) as demais forças (MPEG e CPEG) estavam influenciando em sua significância como especulado previamente. Como demonstrado no item 6.5.1., um sistema na condição PEG 400, CPEG 17,5% e CNaPA 22,5% é o limite da precipitação para os sistemas com Na₂SO₄, e portanto considera-se este resultado otimizado com resultado $K=19,14$ e $\eta_T = 91,21\%$. Tal resultado é semelhante à literatura onde o melhor valor de K encontrado foi de 18,1 e rendimento de 88% utilizando massa molar de PEG 400 e sal de fosfato sob pH 6.4 (SILVA *et al.*, 2009).

6.4. Ensaios de Partição Utilizando NaCl a 1,05%

6.4.1. Estudo de Partição de Ácido Clavulânico sob MPEG 2000, 4000 e 8000 e NaPA 8000 utilizando NaCl

Assim como no item 6.3, relativo ao Na₂SO₄, o NaCl também está sendo alvo de estudos de partição e foi inicialmente testado seguindo a tabela 10, a qual é constituída pelas mesmas condições iniciais do item 6.3.1. de forma a se poder futuramente comparar ambos os sais em suas respectivas situações ótimas de extração. Os resultados obtidos a partir deste planejamento estão dispostos na tabela 11 e os melhores ensaios encontrados foram o de número 7 e 8 com valores respectivos de $K=4,21$ e $K=4,28$.

TABELA 10. Planejamento Fatorial Completo 2³.

	-1	0	1
MPEG	1500	4000	8000
CPEG	5	10	15
CNaPA	10	15	20

TABELA 11. Resultados obtidos a partir das análises das fases dos sistemas dispostos na Tabela 10. Onde, R=Razão Volumétrica; [AC] T=Concentração de Ácido Clavulânico na Fase Superior; [AC] B=Concentração de Ácido Clavulânico na Fase Inferior; K= Coeficiente de Partição; BM=Balanco de Massa; η T=Rendimento da Fase Superior; η B=Rendimento da Fase Inferior.

Sistemas	MPEG	CPEG (%)	CNaPA (%)	R	[AC] T	[AC] B	K	BM (%)	η T (%)	η B (%)
1	1500	5	10	0,48	20,68	12,15	1,70	99,04	44,34	54,70
2	8000	5	10	0,37	28,52	13,47	2,12	97,19	42,90	54,29
3	1500	15	10	1,43	21,14	6,43	3,29	97,07	80,07	17,00
4	8000	15	10	1,07	28,09	8,28	3,39	98,89	77,50	21,39
5	1500	5	20	0,23	36,67	10,34	3,55	93,66	41,93	51,73
6	8000	5	20	0,16	46,45	12,95	3,59	88,99	32,72	56,27
7	1500	15	20	0,63	33,96	8,06	4,21	99,92	72,72	27,20
8	8000	15	20	0,57	30,81	7,20	4,28	96,04	68,26	27,79
9	4000	10	15	0,51	34,21	9,62	3,56	94,84	61,07	33,77
10	4000	10	15	0,52	35,85	9,32	3,85	97,20	64,69	32,51
11	4000	10	15	0,53	35,74	9,59	3,73	97,70	65,04	32,66
12	4000	10	15	0,52	34,32	9,59	3,58	94,37	61,27	33,10

6.4.1.1. Análise Estatística do Planejamento 2³

6.4.1.2. Resposta K

O efeitos da concentrações de NaPA e do PEG foram significantes e positivos indicando que um aumento de suas concentrações acarreta incremento do coeficiente de partição enquanto que os demais efeitos foram insignificantes (figura 25). A interação entre CPEG e CNaPA na figura 26 indica o mesmo.

FIGURA 25. Gráfico de Pareto dos Efeitos estudados sobre a variável K. Respostas significantes: CPEG (2), CNaPA (3) e a interação CPEG (2) com CNaPA (3). Valores apenas de efeito, não correspondem a valores reais.

FIGURA 26. Gráfico de Interação das Médias dos Efeitos CPEG e CNaPA (2 por 3) na variável K. Melhor resposta: (4,367). Valores apenas de efeito, não correspondem a valores reais.

6.4.1.3. Resposta ηT

O efeito mais significativo para a resposta recuperação superior foi a concentração do PEG. Um aumento na concentração do PEG acarreta um aumento em ηT (Figura 27).

FIGURA 27. Gráfico de Pareto dos Efeitos estudados sobre a variável ηT . Respostas significantes: CPEG (2), CNaPA (3) e MPEG (1). Valores apenas de efeito, não correspondem a valores reais.

6.4.1.4. Próximo Planejamento

Baseado nos resultados deste planejamento o próximo foi construído aumentando-se a CPEG e CNaPA de forma a favorecer K e fixando-se a MPEG em 1500 já que a massa molar do PEG não apresenta significância em relação ao coeficiente de partição e minimamente significativa ao rendimento quando baixa. O ponto central a ser utilizado foi a melhor condição encontrada neste, o ensaio número 7 (Tabela 11).

6.4.2. Estudo de Partição de Ácido Clavulânico sob MPEG 1500 e NaPA 8000 utilizando NaCl

Com base no planejamento anterior e priorizando as variáveis de resposta K e η_T , onde um incremento de CPEG e diminuição de MPEG favoreciam as variáveis acima mencionadas um novo planejamento foi desenvolvido (Tabela 12), o qual gerou a tabela 13. O melhor sistema aqui encontrado para partição do ácido clavulânico foi o de número 3, com respectivos valores K=11,96 e η_T =90,18% (tabela 13).

TABELA 12. Planejamento Fatorial Completo 2².

	-1	0	1
MPEG	1500	1500	1500
CPEG	10	15	20
CNaPA	15	20	25

TABELA 13. Resultados obtidos a partir das análises das fases dos sistemas dispostos na Tabela 12. Onde, R=Razão Volumétrica; [AC] T=Concentração de Ácido Clavulânico na Fase Superior; [AC] B=Concentração de Ácido Clavulânico na Fase Inferior; K= Coeficiente de Partição; BM=Balanço de Massa; η_T =Rendimento da Fase Superior; η_B =Rendimento da Fase Inferior.

Sistemas	MPEG	CPEG (%)	CNaPA (%)	R	[AC] T	[AC] B	K	BM (%)	η_T (%)	η_B (%)
1	1500	10	15	0,65	32,72	12,98	2,52	105,74	65,58	40,16
2	1500	10	25	0,35	53,41	7,91	6,75	96,91	68,38	28,53
3	1500	20	15	1,18	34,10	8,37	4,07	112,75	93,27	19,48
4	1500	20	25	0,66	41,68	3,48	11,96	90,18	80,04	10,14
5	1500	15	20	0,63	37,66	8,72	4,32	97,15	71,18	25,97
6	1500	15	20	0,70	34,74	9,03	3,85	97,02	70,76	26,26
7	1500	15	20	0,67	35,74	8,53	4,19	98,40	72,47	25,93
8	1500	15	20	0,67	37,39	8,41	4,45	97,38	72,81	24,57

6.4.2.1. Análise Estatística do Planejamento 2²

6.4.2.2. Resposta K

O efeito das concentrações do NaPA e do PEG foram significantes e positivos indicando que um aumento de suas concentrações acarretam incremento do coeficiente de partição (figura 28). A interação entre CPEG e CNaPA na figura 29 indica o mesmo.

FIGURA 28. Gráfico de Pareto dos Efeitos estudados sobre a variável K. Respostas significantes: CNaPA (2), CPEG (1) e interação CPEG (1) com CNaPA (2). Valores apenas de efeito, não correspondem a valores reais.

FIGURA 29. Gráfico de Interação das Médias dos Efeitos CPEG (1) e CNaPA (2), (1 por 2) na variável K. Melhor resposta: (10,897). Valores apenas de efeito, não correspondem a valores reais.

6.4.2.3. Resposta ηT

O efeito mais significativo para a resposta recuperação superior foi a concentração do PEG. Um aumento na a concentração do PEG acarreta um aumento em ηT (Figura 30).

FIGURA 30. Gráfico de Pareto dos Efeitos estudados sobre a variável η_T . Resposta mais significativa: CPEG (1). Valores apenas de efeito, não correspondem a valores reais.

6.4.2.4. Resultado Otimizado NaCl

O próximo planejamento teria um aumento na concentração de CNaPA de forma a favorecer K e um aumento de CPEG de forma a favorecer tanto K quanto η_T , evitando no entanto a precipitação de componentes, uma vez que as concentrações de PEG e NaPA já se encontram substancialmente elevadas, 20 e 25% respectivamente. No entanto, valores mais elevados de CPEG e CNaPA não permitiram uma separação de fases, sendo então os melhores resultados prévios obtidos considerados otimizados com $K = 11,96$ e $\eta_T = 80,04\%$, no caso o sistema número 4, com MPEG 1500, CPEG 20% e CNaPA 25% onde houve aumento de 2,84 vezes no coeficiente de partição e 17,46% no rendimento em relação ao ensaio item 6.4.1. Tais resultados estão dentro do esperado para a literatura deste tipo de sistema. Saranavan *et al.*, 2008 obtiveram partição de 15,77 para mioglobina e 5,51 para ovoalbumina e respectivos rendimentos de 95,4% e 87,4% usando o sistema PEG/NaPA com NaCl. Os autores descrevem ainda que, houve partição preferencial para a fase topo como decorrente de um gradiente eletrostático entre as fases aquosas formado pelos íons Na^+ e Cl^- .

6.5. Sobre a Construção dos Planejamentos Experimentais

6.5.1. Planejamentos Botched

Planejamentos experimentais costumam seguir um padrão de equidistância entre os níveis inferior, ponto central e superior, comumente denominados, respectivamente, -1, 0 e +1 números estes codificados para representar os reais valores das variáveis pesquisadas. Neste trabalho tal padrão não foi seguido. A ausência de valores de PEG que permitissem

igual distância do ponto central para os demais níveis ou uma concentração máxima limitante de algum componente não permitiam que esta condição clássica fosse aplicada.

Consta no livro *Como Fazer Experimentos* (2007) a seguinte fórmula que explica como as variáveis são codificadas: $(\text{Nível Desejado} - \text{Ponto Central}) / ((\text{Nível Superior} - \text{Nível Inferior}) / 2) = \text{Valor Codificado do Nível Desejado}$. **Exemplo:** em um Planejamento Padrão com nível superior 60, central 50 e inferior 40, o valor codificado para o nível superior seria $(60-50)/((60-40)/2) = 10/10 = 1$, logo, o valor codificado para o nível superior seria +1.

A fórmula supracitada entende um intervalo fixo e equidistante, representado pelo trecho $((\text{Nível Superior} - \text{Nível Inferior}) / 2)$, entre os níveis superior e inferior com relação ao ponto central. No caso deste trabalho, tal fórmula não poderia ser empregada, pois o intervalo entre os níveis superior-central e o intervalo entre os níveis inferior-central são distintos devido à assimetria dos Planejamentos.

De forma a provar que a fuga deste padrão ainda sim permitiria que os estudos fossem corretamente analisados estatisticamente pelo software Statistica 9.1 (StatSoft), interpretando os valores das variáveis como dados numéricos e não categóricos; e ao interpretar como numéricos fazer a devida conversão para valores codificados corretos ao invés de aplicar -1, 0 e +1 uma nova formula foi empregada.

A partir da fórmula original se pôde chegar à seguinte fórmula para codificação dos níveis empregados nos planejamentos estudados: $(|\text{Nível Desejado} - \text{Nível Central}|) / \text{Intervalo} = \text{Valor Codificado do Nível Desejado}$. Onde o dito “Intervalo” poderia tanto ser a diferença entre o nível superior e central ou entre o nível inferior e central. **Exemplo:** em um Planejamento Assimétrico com nível superior 60, central 50 e inferior 30, o intervalo pode ser tanto $60-50=10$ quanto $|30-50|=20$. A escolha do intervalo modifica os valores codificados, mas não influencia no resultado estatístico. **Exemplo:** caso o intervalo escolhido fosse 10, para o nível superior 60 seu valor codificado seria $(60-50)/10=10/10=1$, para o nível inferior 30 seria $(|30-50|)/10=2$ e o central 50 seria 0. Caso o intervalo escolhido fosse 20, para o nível superior 60 seu valor codificado seria $(60-50)/20=10/20=0,5$, para o nível inferior 30 seria $(|30-50|)/20=1$ e o central 50 seria 0. Teríamos então a possibilidade de trabalhar então com +1, 0, -2 (usando intervalo 10) ou +0,5, 0, +1 (usando intervalo 20). Ambas as opções retratam a mesma informação usando grandezas diferentes. Decidiu-se então adotar como intervalo padrão aquele que representa a diferença entre o nível do fator limitante no estudo e o ponto central. **Exemplo:** entre o menor PEG que se pode trabalhar e seu ponto central ou entre o ponto central e a máxima concentração de um sal que se pode trabalhar antes que haja precipitação do sistema.

Para os fins de comparação foram utilizados apenas os gráficos de Pareto dos Efeitos para as respostas coeficiente de partição (K) e rendimento superior (ηT), as

principais respostas neste estudo, contudo, as interações (quadrado e cubo), quando significativas, tiveram seus gráficos analisados, mas não divulgados para evitar excesso de informação redundante.

Ao substituir no Statistica 9.1 (StatSoft) os reais valores das variáveis pelos novos valores codificados e comparar os gráficos gerados antes e após a substituição pôde-se apurar a capacidade do software de lidar como modelos assimétricos.

6.5.2. Estudo de Precipitação de Componentes na Presença de Na_2SO_4

De forma a excluir a precipitação e assim instabilidade de análise encontrada nos pontos centrais do estudo anterior, um ensaio de precipitação aumentando-se gradualmente as concentrações de PEG e NAPA na presença de Na_2SO_4 foi realizado.

Quanto mais alta a concentração de Na_2SO_4 mais concentrado se torna o PEG, provavelmente devido ao aumento do efeito hidrofóbico causado pelo sal e observado através da diminuição do volume da fração superior (Johansson et al.,2008). Este efeito, combinado ao aumento de CPEG e CNaPA pode explicar uma precipitação dos componentes dos por diminuir a disponibilidade de água em ambas as fases, impendendo a execução daquele planejamento.

A fim de evitar tal precipitação e desperdício de material decidiu-se fazer um estudo de precipitação de componentes ao utilizar o Na_2SO_4 e assim descobrir quais valores limites de estudo das variáveis CPEG e CNaPA. Evitando também a imprecisão da leitura de [AC]B citada 6.6.1. ao combinar-se elevados valores de CPEG e CNaPA que impedem uma reprodutibilidade confiável de K.

FIGURA 31. Gráfico de Limite de concentrações CPEG e CNaPA na presença de Na_2SO_4 de forma a evitar precipitação de componentes dos sistemas. Para CNaPA 15 e 17,5% o limite de CPEG é aproximadamente 22,5%; CNaPA 20 e 22,5% o limite de CPEG é aproximadamente 17,5%; CNaPA 25% o limite de CPEG é aproximadamente 15%.

De acordo com a figura 31 percebe-se que para CNaPA 15 e 17,5% começa a existir uma instabilidade no sistema na proximidade de concentração de PEG de 25%, para CNaPA 20 e 22,5% o limite de CPEG é aproximadamente 17,5% e CNaPA 25% o limite de CPEG é aproximadamente 15%.

Com base nestes dados se torna mais confiável fixar como máximo a condição MPEG 400g/mol, CNaPA 17,5% CPEG 22,5% encontrada no item 6.3.4 e considerar seu resultado como otimizado nos valores $K=19,14$ e $\eta_T = 91,21\%$ de forma a se manter fora da zona de precipitação.

7. Fermentação Extrativa

Baseando-se no mesmo experimento que deu origem ao item 6.5.2. deu-se início a um ensaio de fermentação extrativa a fim de estabelecer a metodologia ideal para fermentação usando como condições MPEG 400 g/mol, CPEG 35%, MNaPA 8000 g/mol, CNaPA 10% sob as condições: 100 rpm, pH 6.8, glicerol 5g/L e 28°C (Viana et al., 2010). O meio utilizado foi o de soja descrito no item 3.1., com a soja tratada de duas formas diversas, sendo filtrada ou centrifugada antes de começar a montagem do sistema.

TABELA 16. Concentração de glicerol (g/L) de acordo com o tratamento do meio de soja e com o tempo de fermentação (horas). Condições de Fermentação MPEG 400 g/mol, CPEG 35%, MNaPA 8000 g/mol, CNaPA 10% e glicerol 5g/L.

Tratamento e Fase	24h	48h	72h	96h
Filtrado Top	1.6	1.4	0.4	0.2
Filtrado Bottom	0.6	0.6	0.0	0.0
Centrifugado Top	3.1	3.3	0.6	0.4
Centrifugado Bottom	0.1	0.2	0.0	0.0

Na Tabela 16 pode-se ver o impacto de filtrar ou centrifugar o meio na perda de glicerol, inicialmente presente na concentração de 5g/L. No meio centrifugado permanece uma maior concentração de glicerol, aproximadamente 3,2g/L com 24 horas de fermentação enquanto que no meio filtrado apenas 2,2g/L do mesmo. Provavelmente uma parte do glicerol permaneceu retida no papel de filtro. Tanto nos ensaios filtrados quanto centrifugados o glicerol permaneceu primordialmente na fase superior e foi consumido de forma mais abrupta às 72h de fermentação, zerando na fase bottom e quase se esgotando na fase top.

Nos ensaios onde se utilizou o meio de soja filtrado, às 72h (Tabela 17) foi onde

houve a maior produção de ácido clavulânico e coeficiente de partição 53,89. Maior produção de AC (672 mg/L) por *S. clavuligerus* nas condições ótimas utilizando farinha de soja, glicerol e ornitina após 72h foi relatada por Wang et al. (2005). No entanto, esse meio de cultura é muito mais caro do que o uso individual da farinha de soja e, provavelmente, seria inadequado para o aumento de escala para fins industriais.

A remoção das células e separação das fases ocasionou uma perda substancial de volume das fases (quase 20% do total), principalmente da fase inferior, por isso os valores calculados e dispostos na tabela 17 não consideram a perda de volume das fases e utilizam como padrão uma razão volumétrica de aproximadamente 3.0 (ensaios 5 a 8, Tabela 17) de forma a uniformizar os resultados. Estes ensaios foram considerados educacionais e devem ser repetidos futuramente de forma a minimizar este erro antes de serem considerados válidos.

Nos ensaios onde se utilizou o meio de soja centrifugado não foi possível analisar os resultados pois os brancos apresentaram leitura igual ou ligeiramente superior às amostras, revelando que provavelmente a filtração remove agentes que podem ser lidos a 512nm e confundidos com leitura real de ácido clavulânico pelo método de Bird et. al 1982.

TABELA 17. Concentração de ácido clavulânico no meio de soja filtrado em cada fase de acordo com o tempo de fermentação (horas) e seu respectivo coeficiente de partição (K).

Tempo (h)	[AC]T	[AC]B	K
24	25,57	19,90	1,28
48	76,72	4,60	16,68
72	247,90	4,60	53,89
96	34,40	9,20	3,74

8. Conclusões

- As melhores condições de extração, otimizadas, utilizando como sal o Na_2SO_4 , foram: MPEG=400 g/mol, CPEG=17,5% (m/m) e CNaPA=22,5% (m/m) com $K=19,14$, $\eta_T=91,21\%$, $BM=101,69$ e $R=0,45$. Tal resultado é semelhante à literatura onde o melhor valor de K encontrado foi de 18,1 e rendimento de 88% utilizando massa molar de PEG 400 e sal de fosfato sob pH 6.4 (SILVA *et al.*, 2009).
- As melhores condições de extração, otimizadas, utilizando como sal o NaCl, foram: MPEG=400 g/mol, CPEG=35% (m/m) e CNaPA=10% (m/m) com $K=11,96$ $\eta_T=80,04\%$, $BM=90,18$ e $R=0,66$. Saranavan *et al.*, 2008 obtiveram partição de 15,77 para mioglobina e 5,51 para ovoalbumina e respectivos rendimentos de 95,4% e 87,4% usando o sistema PEG/NaPA com NaCl, mostrando que os valores obtidos estão dentro do esperado para este tipo de sistema.
- Os valores de K e η_T encontrados se assemelham ao que existe na literatura de fermentação extrativa de ácido clavulânico, indicando que se caminha na direção certa de otimização de extração. Em SILVA *et al.*, 2009 o melhor valor de K encontrado foi de 18,1 e rendimento de 88% utilizando massa molar de PEG 400 e sal de fosfato sob pH 6.4.
- Os valores distintos de R nos dois sais podem ser explicados devido à tendência de Na_2SO_4 ter uma maior repulsa por PEG comprimindo a fase superior (Johansson *et al.*, 2008).
- Com os elevados valores de K , η_T e BM encontrados mostra-se ser possível extrair com sucesso o ácido clavulânico com altas partições, recuperação na fase superior e sem grandes perdas.
- Sob todas as condições estudadas o ácido clavulânico demonstrou preferência pela fase superior constituída principalmente por PEG;
- Em todos os testes comparativos entre ensaios analisados com valores reais e com valores codificados os gráficos se mostraram quase idênticos, com leves variações nos valores de efeito, e respeitaram as mesmas tendências estatísticas, logo, o programa Statística 9.1 (StatSoft) é capaz de reconhecer os dados inseridos como numéricos e corretamente codificá-los de acordo com a necessidade, sem aplicar indiscriminadamente o padrão de equidistância do ponto central com intervalo fixo de 1 (-1, 0, +1). Sendo assim, os estudos feitos neste trabalho embora sigam o padrão assimétrico são válidos estatisticamente;
- Em sistemas contendo Na_2SO_4 devido à instabilidade do sistema deve-se utilizar

$C_{PEG} < 20\%$ e $C_{NaPA} \leq 22,5\%$.

- É possível fermentar em shaker e obter altos coeficientes de partição para o ácido clavulânico usando as condições extração: $M_{PEG} = 400$, $C_{PEG} = 35\%$ (m/m) e $C_{NaPA} = 10\%$ (m/m) com $K = 25,52$ mas com perda de volume na fase inferior ao separar as fases, dificultando os cálculos das variáveis.

9. Referências bibliográficas

- ABBOTT, N.L.; BLANKSCHTEIN, D. E HATTON, T.A. Protein partitioning in two-phase aqueous polymer system. 5. Decoupling of the effects of protein concentration, salt type, and polymer molecular weight. **Macromolecules**. 26, 825-828. 1993.
- AHMAD, A.L.; DEREKA, C.J.C.; ZULKALI, M.M.D. Optimization of thaumatin extraction by aqueous two-phase system (ATPS) using response surface methodology (RSM). **Separation and Purification Technology**, v. 62, p.702–708, 2008.
- ALBERTSSON, P. A. Chromatography and partition of cells and cells fragments. **Nature**. 177, 1956.
- ALBERTSSON, P.A. **Partition of cell particles and macromolecules**: separation and purification of biomolecules, cell organelles, membranes, and cells in aqueous polymer two phase systems and their use in biochemical analysis and biotechnology. 3.ed. New York: Wiley-Interscience, 1986. 346p.
- ALBERTSSON, P.A., Partition of cell particles and macromolecules, 2nd ed., **Jon Wiley and Sons**, New York, 1971.
- ASENJO, J.A. Separation Processes in Biotechnology. **Marcell Dekker Inc.**, New York, 801p., 1990.
- BABU, B.R.; RASTOGI, N.K.; RAGHAVARAO, K.S.M.S. Liquid–liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase system. **Chemical Engineering and Processing**, v.47, p. 83–89, 2008.
- BAGGALEY, K.H., BROWN, A. G., SCHOFIELD, C. J. Chemistry and biosynthesis of clavulanic acid and others clavams. **Natural Products Report**. v.14, p. 309-333, 1997.
- BARBOZA, M.; ALMEIDA, R. M.R.G.; HOKKA, C. O. Influence of temperature on the kinetics of adsorption and desorption of clavulanic acid by ionic exchange. **Biochemical Engineering Journal**, v. 14, p. 19–26, 2003.
- BENICIO DE BARROS NETO; IEDA SPACINO SCARMINIO; ROY EDWARD BRUNS. **Como Fazer Experimentos**. Campinas: Unicamp, 2007.
- BERSANETTI, P.A.; ALMEIDA, R.M.R.G.; BARBOZA, M.; ARAUJO, M.L.G.C.; HOKKA, C.O. Kinetic studies on clavulanic acid degradation. **Biochemical Engineering Journal**, v.23, p.31-36, 2005.
- BERSANETTI, P.A.; BARBOZA, M.; HOKKA, C.O.; ARAUJO, M.L.G.C. Estudos cinéticos de hidrólise do ácido clavulânico. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 13., Teresópolis, 2000. *Anais*. Teresópolis: Sinaferm, 2000. v.6, 1-39.
- BIRD, A.E.; BELLIS, J.M.; GASSON, B.C. Spectrophotometric assay of clavulanic acid by reaction with imidazole. **Analyst**, v.107, p.1241-1245, 1982.
- BOK, H. S.; DEMAİN, A.L. An improved colorimetric assay for polyols. **Analytical Biochemistry**, v.81, 18–20, 1977.
- BROWN, A. G.; BUTTERWORTH, D.; COLE, M.; HANSCOMB, G.; HOOD, J.D.; READING, C.; ROINSON, G. N. Naturally occurring β -lactamase inhibitors with antibacterial activity, **The Journal of Antibiotics**, v.29, n.6, p.668-669, 1976. apud ORTIZ, S. Estudo da Produção de Ácido Clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* em Diferentes Concentrações de Lípidios e de Fontes Complexas de Nitrogênio. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de São Carlos, Brasil. 2005.
- BUTTERWORTH, D. Clavulanic acid: properties, biosynthesis, and fermentation. In: VANDAMME, E.J., ed. **Biotechnology of industrial antibiotics**. New York: Marcel Decker, 1984. p.225-235. (Drugs and the Pharmaceutical Sciences, v.22).
- CASCONE, O.; ANDREWS, B. A.; ASENJO, J. A. Partitioning and Purification of thaumatin in aqueous two-phase system. **Enzyme Microbiology Technology**, v.13, p.629, 1991.
- CHALLIS, G.L.; HOPWOOD, D.A. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.100, p.14555-14561, 2003.
- CHAMPLUVIER, B., KULA, M. R. Dye-ligand membranes as selective adsorbents for rapid purification of enzymes: a case study. **Biotechnololy and Bioengineering**. v.40, 33-40, 1992.
- CHEN, J.P.; LEE, M.S. Enhanced production of *Serratia marcescens* chitinase in PEG/dextran aqueous two-phase. **Enzyme Microbiol. Technol.**, v.17, p. 1021–1027, 1995.

- COSTA, S. A., PESSOA, JR A., ROBERTO, I. C. Partitioning of xylanolytic complex from *Penicillium janthinellum* by an aqueous two-phase system. **Journal of Chromatography B**, v. 743, p. 339-348, 2000.
- DEMAIN, A.L. Induction of microbial secondary metabolism. **International Microbiology**, v.1, p.259-264, 1989.
- DEMAIN, A.L. The business of biotechnology. **Industrial Biotechnology**, v.3, p.269-283, 2007.
- DIAMOND, A. D.; HSU, J. T., Aqueous two phase systems for biomolecule separation. **Advanced in Biochemistry Engineering**, v.47, p.89-135, 1992.
- DISSING, U.; MATTIASSON, B. Cultivation of *Lactococcus lactis* in a polyelectrolyte-neutral polymer aqueous two phase system. **Biotechnol. Lett.**, v. 16, p. 333, 1994.
- DROUIN, C.M.; COOPER, D.G. **Biosurfactants and aqueous two-phase fermentation. Biotechnol. Bioeng.**, v. 40, p. 86, 1992.
- ELANDER, R.P. Industrial production of β -lactam antibiotics, **Applied Microbiology and Biotechnology**. 61, 385-392, 2003.
- FINLAY, J.; MILLER, L.; POUPARD, J.A. A review of the antimicrobial activity of clavulanate. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.52, p.18-23, 2003.
- FOULSTONE, M.; READING, C. Assay of amoxicillin and clavulanic acid, components of augmentin, in biological fluids with performance liquid chromatography. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.22, p.753-762, 1982.
- GAVASANE, M. R., GAIKAR, V. G. Aqueous two-phase affinity partitioning of *Penicillin acylase* from *E. coli* in presence of PEG-derivatives. **Enzyme and Microbial Technology**, v.32, p. 665-675, 2003.
- HANS-OLOF, J., FEITOSA, E., PESSOA JR., A. Phase diagrams of the Aqueous Two-Phase Systems of Poly(ethylene glycol)/Sodium Polyacrylate/Salts. **Polymers**, v.3, 587-601, 2011.
- HARRIS, P.A., KARLSTRÖM, G., TJERNELD, F. Enzyme purification using temperature-induced phase formation. **Bioseparation**, v.2, 237-246, 1991.
- JOHANSSON, G., ANDERSSON, M., AKERLUND, H-E. Counter distribution of yeast enzymes with polymer-bound triazine dye affinity ligands. **Journal of Chromatography**, v.289, p.483-493, 1984.
- JOHANSSON, H. O., KARLSTRÖM, G., TJERNELD, F. Experimental and Theoretical Study of Phase Separation in Aqueous Solutions of Clouding Polymers and Carboxylic Acids. **Macromolecules**, v.26, 4478-4483, 1993.
- JOHANSSON, H. O., MAGALDI, F.M., FEITOSA, E., PESSOA JUNIOR, A. Protein partitioning in poly(ethylene glycol) sodium polyacrylate aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography A**, v. 1178, p. 145-153, 2008.
- JOHANSSON, H.-O., KARLSTRÖM, G., TJERNELD, F., HAYNES, C.A., Driving forces for phase separation and partitioning in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**, v.711, 3-17, 1998.
- JÖNSSON, M., JOHANSSON, H.-O. Protein partitioning in thermoseparating systems of a charged hydrophobically modified ethylene oxide polymer. **Journal of Chromatography A**, v.983, 133-144, 2003.
- KIM, S.H.; YOO, Y.J. **Extractive** purification of enzymes from animal tissue using aqueous two phase. **Journal Ferment. Bioeng.**, v. 71, p. 373, 1991.
- KIM, Y.J.; WEIGAND, W.A. Experimental analysis of a product inhibited fermentation in an aqueous two-phased system. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v.34/35, p. 419, 1992.
- KUBOI, R.; MARUKI, T.; TANAKA, H.; KOMASAWA, I. Fermentation of *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and production of subtilin in polyethylene glycol/phosphate aqueous two-phase systems. **J. Ferment. Bioeng.**, v. 78, p. 431, 1994.
- KULA, M-R.; KRONER, K. H.; HUSTED, T.H. Purification of enzymes by liquid-liquid extraction. **Advances in Biochemical Engineering**, v.24, p.73-118, 1982.
- KWON, Y.J. KAUL, R. MATTIASSON, B. Extractive bioconversion for lactic acid production in poly(ethyleneimine) based aqueous two-phase system. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 50, p. 280, 1996.
- LE DUY, A., ZAJIC, J.E. A Geometrical Approach for Differentiation of an Experimental Function at a Point: Applied to Growth and Production. **Biotechnol. Bioeng.**, v.15, p.805-815, 1973.
- LEE, Y.H.; CHANG, H.N. Production of alkaline protease by *Bacillus licheniformis* in an

- aqueous two-phase system. **Journal Ferment. Bioeng.**, v. 69, p. 89, 1990.
- MALINOWSKI, J. J. Two-phase partitioning bioreactors in fermentation technology Research review paper. **Biotechnology Advances**, v.19, p. 525–538, 2001.
- MALPIEDI, L.P.; PICO, A.G.; NERLI, B.B. Features of partitioning pattern of two pancreatic enzymatic precursors: Trypsinogen and chymotrypsinogen in polyethyleneglycol–sodium citrate aqueous biphasic systems. **J. Chromatogr. B.** v.870, p.1-7, 2008.
- MARANESI, G.L.; BAPTISTA NETO, A.; HOKKA, C.O.; BADINO, A.C. Utilisation of vegetable oil in the production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.21, n.4, p.509-514, 2005.
- MAYER, A.F.; HARTMANN R.; DECKWER, W.D. Diffusivities of clavulanic acid in porous sorption systems with ion-pairing. **Chemical Engineering Science**, v.52, n.24, p.4561-4568, 1997.
- MAYERHOFF, Z. D. V. L.; ROBERTO, I. C.; FRANCO, T. T. Purification of xylose reductase from *Candida mogii* in aqueous two-phase systems. **Biochemical Engineering Journal**, v.18, p.217-223, 2004.
- MERCHUK, J. C., ANDREWS, B. A., ASENJO, J. A. Aqueous two-phase systems for protein separation. Studies on phase inversion. **Journal of Chromatography B**, v.711, p.285-293, 1998.
- Ministério da Saúde. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspDetalhes&id_area=1450&CO_NOTICIA=10058. Acesso em: 20 de abril de 2009.
- MOKHTARANI, B.; KARIMZADEH, R.; AMINI, H.M.; MANESH, S.D. Partitioning of Ciprofloxacin in aqueous two-phase system of poly(ethylene glycol) and sodium sulphate. **Biochemical Engineering Journal**, v. 38, p. 241–247, 2008.
- NAGARAJAN, R.; BOECK, L.D.; GORMAN, M.; HAMILL, R.L.; HIGGENS, C.E.; HOEHN, M.M. Beta-lactam antibiotics from *Streptomyces*. **Journal of the American Chemical Society**, v.93, p.2308-2310, 1971.
- OLIVEIRA, G.G.G., SILVA, D. P., ROBERTO, I. C., VITOLO, M., PESSOA JUNIOR, A., Purificação de glicose-6-fosfato desidrogenase em sistemas de duas fases aquosas utilizando PEG/citrato. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.37, n.2, p.176-187, 2001.
- OLIVEIRA, J. H. H. L. DE; GRANATO, A. C.; HIRATA, D. B.; HOKKA, C. O.; BARBOZA, M. Ácido Clavulânico e Cefamicina C: Uma Perspectiva da Biossíntese, Processos de Isolamento e Mecanismo de Ação. **Quim. Nova**, V. 32, Nº 8, p. 2142-2150, 2009.
- ORTIZ, S.C.A.; HOKKA, C.O.; BADINO Jr., A.C. Utilization of soybean derivatives on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p.1071-1079, 2007.
- PELCZAR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2.ed. São Paulo: Makron Books, 1996. v.2, p.116-126.
- PEREIRA, J. Extração líquido - líquido do ácido clavulânico em sistemas poliméricos de duas fases aquosas (SPDFA) utilizando polietileno glicol (PEG) e poliácido de sódio (NaPA). **Dissertação de Mestrado**. Universidade de São Paulo, Brasil. 2008.
- PEREIRA, M. Purificação de uma endo-poligalacturonase, produzida por *Kluyvermyces marxianus*, utilizando sistemas de duas fases aquosas. **Dissertação de Doutorado**. Universidade do Minho, Portugal. 2005.
- PEREIRA, M. Purificação de uma endo-poligalacturonase, produzida por *Kluyvermyces marxianus*, utilizando sistemas de duas fases aquosas. **Dissertação de Doutorado**. Universidade do Minho, Portugal. 2005.
- PERSSON, I., STALBRAND, H., TJERNELD, F., HAHN-HÄGERDAL, B. Semicontinuous production of cellulolytic enzymes with *Trichoderma reesei* Rutgers C30 in an aqueous two-phase system. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 27, p. 27-36, 1991.
- PERSSON, I.; TJERNELD, F.; HAHN-HÄGERDAL, B. Production of b-glucosidase with *Aspergillus phoenicis* QM329 in aqueous two-phase systems. **Biotechnology Technology**, v. 3, p. 265, 1989.
- PESSOA Jr. A.; KILIKIAN, B.V., coord. **Purificação de produtos biotecnológicos**. São Paulo: Manole, 2005. 444p.
- PESSOA Jr. A.; KILIKIAN, B.V., coord. **Purificação de produtos biotecnológicos**. São Paulo: Manole, 2005. 444p.
- PORTO, A.L.F.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; LIMA FILHO, J.L. Effects of culture conditions on protease

- production by *Streptomyces clavuligerus* growing on the soy bean flour medium. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.60, p.115-122, 1996.
- PORTO, T. Extração da Pró-toxina épsilon e de uma Protease a partir de *Clostridium perfringens* em Sistemas de Duas Fases Aquosas utilizando PEG/Citrato. **Dissertação de Mestrado**. Universidade de São Paulo, Brasil. 2006.
- PORTO, T. Extração da Pró-toxina épsilon e de uma Protease a partir de *Clostridium perfringens* em Sistemas de Duas Fases Aquosas utilizando PEG/Citrato. **Dissertação de Mestrado**. Universidade de São Paulo, Brasil. 2006.
- PORTO, T.S.; MEDEIROS E SILVA, G.M.; PORTO, C.S.; CAVALCANTI, M.T.H.; NETO, B.B.; LIMA-FILHO, J.L.; CONVERTI, A.; PORTO, A.L.F.; PESSOA JR., A. Liquid-liquid extraction of proteases from fermented broth by PEG/citrate aqueous two-phase system, **Chemical Engineering and Processing**, v.47, p. 716-721, 2008.
- READING, C., COLE, M. Clavulanic Acid: a Beta-Lactamase-Inhibiting Beta -Lactam from *Streptomyces clavuligerus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. 852-857, V. 11, N°5, 1977.
- RITO-PALOMARES, M. Practical application of aqueous two-phase partition to process development for the recovery of biological products: Review. **Journal of Chromatography B**, v. 807, p. 3–11, 2004.
- ROKEM, J.S.; LANTZ, A.E.; NIELSEN, J. Systems biology of antibiotic production by microorganisms. **Natural Product Reports**, v.24, p.1262-1287, 2007.
- SAEKI S., KUWAHARA N., NAKATA M., KANEKO M. Upper and lower critical solution temperatures in poly (ethylene glycol) solutions. **Polymer**, v.17, 685-689, 1976.
- SANTOS, V. C.; PEREIRA, J. F. B.; HAGA, R. B.; RANGEL-YAGUI, C. O; TEIXEIRA, J. A. C.; CONVERTI, A.; PESSOA-JR, A. Stability of clavulanic acid under variable pH, ionic strength and temperature conditions. A new kinetic approach. **Biochemical Engineering Journal**, aceito para publicação em 22 de fevereiro de 2009.
- SARAVANAN, S.; RAO, J.R.; NAIR, B.U.; RAMASAMI, T. Aqueous two-phase poly(ethylene glycol)–poly(acrylic acid) system for protein partitioning: Influence of molecular weight, pH and temperature. **Process Biochemistry**. v.43 905–911, 2008.
- SARMENTO, M.J., PIRES, M. J., CABRAL, J. M. S., AIRES-BARROS, M. R. Liquid-liquid extraction of a recombinant protein, cytochrome b5, with aqueous two-phase systems of polyethylene glycol and potassium phosphate salts. **Journal of Chromatography A**, v. 668, p.117-120, 1994.
- SARUBBO, L. A. **Caracterização de um novo sistema bifásico aquoso e aplicação em extração de proteínas com coluna de discos perfurados rotativos**. Tese (Doutorado em Engenharia Química)– Universidade de Campinas/UNICAMP, Campinas, 174 p., 2000.
- SAUDAGAR, P.S.; SURVASE, S.A.; SINGHAL, R.S. Clavulanic acid: a review. **Biotechnology Advances**, v.26, p.335-351, 2008.
- SCHMIDT, A. S.; VENTON, A. M.; ASENJO, J. A. Partitioning and purification of α -amylase in aqueous two-phase. **Enzyme Microbiology Technology**. v. 16, p. 131-142, 1994.
- SCHÜGERL, K. Integrated processing of biotechnology products. Research review paper **Biotechnology Advances**, v. 18, p.581-599, 2000.
- SEADER, J. P., HENLEY, J. E. **Separation process principles**. John Wiley & Sons, New York, p.886,1998.
- SILVA, C.S, BOVAROTTI E., RODRIGUES M.I., HOKKA C.O., BARBOZA M. Evaluation of the effects of the parameters involved in the purification of clavulanic acid from fermentation broth by aqueous two-phase systems. **Bioprocess Biosyst Eng.** v. 32(5), p.625-632. 2009.
- SILVA, D. P. **Obtenção das Enzimas Hexoquinase e Glicose-6-fosfato Desidrogenase utilizando *Saccharomyces cerevisiae***. São Paulo: FCF/USP, p. 165, 2000. (Dissertação de Mestrado).
- SINHA, J., DEY, P.K., PANDA, T. Extractive fermentation for improved production of endoglucanase by an intergeneric fusant of *Trichoderma reesei*/*Saccharomyces cerevisiae* using aqueous two-phase system. **Biochem. Eng. J.**, v. 6, p. 163-175, 2000.
- STREDANSKY, M.; SVORC R.; STURDIK, E.; DERCOVA, K. Repeated batch α -amylase production in aqueous two-phase system with *Bacillus* strains. **J. Biotechnol.**, v. 27, p. 181, 1993.
- TJERNELD, F.; PERSSON, I. AND ALBERTSSON, P A. Enzymatic hydrolysis of cellulose in

- aqueous two-phase systems. I. Partition of cellulases from *Trichoderma reesei*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.27, p.1036-1043, 1985.
- TUBIO, G.; NERLI, B.; PICÓ, G. Relationship between the protein surface hydrophobicity and its partitioning behavior in aqueous two-phase systems of polyethyleneglycol-dextran. **Journal of chromatography B**, v.799, p.293-301, 2004.
- VIANA, D.A, CARNEIRO-CUNHA, M.N., ARAÚJO, J.M., BARROS-NETO, B., LIMA-FILHO J.L., CONVERTI, A., PESSOA-JÚNIOR, A AND PORTO, A.L.F. Screening of Variables Influencing the Clavulanic Acid Production by *Streptomyces* DAUFPE 3060 Strain. **Applied biochemistry and biotechnology**. v. 160 (6), p.1797-1807, 2010.
- VIANA,D. Produção e Extração de Ácido Clavulânico de *Streptomyces* spp. por Fermentação Extrativa Utilizando Sistemas de Duas Fases Aquosas. **Qualificação de doutorado USP**, p. 120, 2007.
- WALSH, C. **Antibiotics**: actions, origins, resistance. Washington: ASM Press, p.3, 4, 89, 108, 114. 2003.
- WANG, Y.-H.; YANG, B.; REN, J.; DONG, M.-L.; LIANG, D.; XU, A.-L. Optimization of medium composition for the production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*. **Process Biochemistry**, v.40, n.3/4, p.1161–1166, 2005.
- WATVE, M.G.; SHEJWAL, V.; SONAWANE, C.; RAHALKAR, M.; MATAPURKAR, M.; SHOUCHE, Y.; PATOLE, M.; PADNIS, N.; CHAMPHENKAR, A.; DAMLE, K.; KARANDIKAR, S.; KRHIRSAGAR, V.; JOG, M. The “K” selected oligophilic bacteria: a key to uncultured diversity? **Current Science**, v.78, p.1535-1542, 2000.
- WILLIAMS, D.A.; LEMKE, T.L. **Foye's principles of medicinal chemistry**. 5.ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1128p. 2002.
- WISE, W. S. The measurement of the aeration of culture media. **J. Gen. Microbiol.**, v.5, p.167-177, 1951.
- ZASLAVSKY, B.Y. **Aqueous two-phase partitioning**. Marcel Dekker Inc., New York. 1995.

10. A N E X O S

10.1. ANEXO I - Curvas Binodais do sistema PEG/NaPA

Anexo 1- binodal do sistema PEG 2000/NaPA8000/ Na₂SO₄ 6 % (p/p).

Os círculos abertos representam sistemas de uma fase, os círculos fechados representam sistemas de 2 fases.

Temperatura: 22-25 °C.

Anexo 2- binodal do sistema PEG 4000/NaPA8000/ Na₂SO₄ 6 % (p/p).

Os quadrados abertos representam sistemas de uma fase, os quadrados fechados representam sistemas de 2 fases.

Temperatura: 22-25 °C.

Anexo 3- binodal do sistema PEG 8000/NaPA8000/ NaCl 1.05 % (p/p).

Os círculos abertos representam sistemas de uma fase, os círculos fechados representam sistemas de 2 fases.

Temperatura: 22-25 °C.

Anexo 4 - binodal do sistema PEG 4000/NaPA8000/ NaCl 1.05 % (p/p).

Os círculos abertos representam sistemas de uma fase, os círculos fechados representam sistemas de 2 fases.

Temperatura: 22-25 °C.

10.2. ANEXO II - Artigos Científicos

10.2.1.**Potassium Clavulanate partition in two phase systems consisting of polyethylene glycol and polyacrylic acid in the presence of sodium sulfate or sodium chloride**

Bruno Ubertino Rosso^a, Tatiana Souza Porto^b, Attilio Converti^c, Adalberto Pessoa Junior^{a,*}

^a*Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo – USP, Brazil, , Av. Prof. Lineu Prestes, 580, B.16. 05508-000, São Paulo, SP, Brazil*

^b*Department of Animal Morphology and Physiology, Unity Sede Dois Irmãos, Federal Rural University of Pernambuco– UFRPE, Brazil, , Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, 52171-900, Recife, PE, Brazil*

^c*Department of Chemistry and Process Engeneering, University of Genova, Via Opera Pia 15, 16145, Gênova, Itália.*

*Corresponding author: Tel.: +55-11-3091-3862

E-mail address: pessoajr@usp.br

Abstract

The industrial scale production viability of commercial and therapeutical biotechnological products, such as drugs, is significantly dependent of the separation and purification techniques applied. The use of two-aqueous phase systems (ATPS) is proposed as an alternative to purification, because allows the separation and analysis of biological particles, so that these do not lose their activities or desired properties. This technique is interesting for large scale purification because it allows selective partition with high yield potential and good cost-benefit relation. The present work intends to study the purification of clavulanic acid (CA) by liquid-liquid extraction in ATPS applying a new aqueous polymeric system composed of two polymers, namely polyethylene-glicol (PEG) and polyacrylate (PAA). Different aqueous polymeric system (PEG/PAA) compositions are being utilized, employing different molar masses and concentrations of PEG and 8000g/mol molar mass of PAA. At light of the information obtained the best extraction point for clavulanic acid, in the presence of Na_2SO_4 was defined at MPEG=400 g/mol, CPEG=17,5% (m/m) and CNaPA=22,5% (m/m) with $K=19,14$, $\eta_T=91,21\%$, $\text{BM}=101,69$ e $R=0,45$. While in the presence of NaCl, the best result found was at: MPEG=400 g/mol, CPEG=35% (m/m) e CNaPA=10% (m/m) with $K=11,96$ $\eta_T=80,04\%$, $\text{BM}=90,18$ and $R=0,66$.

Experimental Activity Description

Introduction

Potassium Clavulanate, the most common form of clavulanic acid (AC) is a broad spectrum antibiotic effective against Gram-positive and Gram-negative bacteria, however of low activity when used as such (Saudagar et al. 2008). Moreover, other highly active β -lactam antibiotics like penicillins and cephalosporins are susceptible to the action of β -lactamases, enzymes produced by pathogenic bacteria such as *Escherichia coli*, *Klesbiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Haemophilus*, *Moraxella catarrhalis* and *Staphylococcus aureus* (Brown et al., 1976, Singh, 2004) that break the β -lactam ring and consequently render the antibiotics inactive. Taking into consideration that β -lactam antibiotics now account for 65% of the world market of antibiotics (Elander, 2003) the combined effect of antibacterial and β -lactamase inhibition of clavulanic acid makes it an important drug both clinically and economically (Saudagar, 2008), when used in conjunction with β -lactam antibiotics.

AC has limited availability in the market given the complexity of its manufacturing process. The technology involved and the intellectual property rights belong to GlaxoSmithKline's (GSK). Currently only two companies other than GSK produce AC, these being the LEK DD (group Sandoz division of Novartis) and CIPAN (Companhia Industrial Produtora de Antibioticos - Portugal) (Saudagar et al., 2008). It is therefore of utmost importance to establish a simple method of extraction of this drug that might cheapen its production process.

One of the main current purification processes of clavulanic acid involves the use of ion exchange chromatography (Barbosa et al, 2003), which like most notorious chromatographic processes have well-documented advantages but also drawbacks such as high cost and low productivity (Azevedo et al., 2009). There are reports of other drugs that were produced by ion

exchange chromatography and now being tested in aqueous two phases systems (ATPS's) such as IL-18 (interleukin-18) with recovery of 98% and purity of 92% in a polyethylene glycol (PEG) rich phase (Kornmann and Baer, 2008).

The aqueous two-phase systems result from incompatibility between aqueous solutions of components such as two structurally distinct polymers (eg, PEG and dextran) or a polymer and a salt (eg phosphate) above a critical concentration (Albertsson, 1986). Have among their advantages ease of scale-up, the ability to provide good resolution factors in high yields and activities; the fact of providing soft environments for treating biological materials (possibility of operating at room temperature) and possibility of fast operation and capacity of being selective (Albertsson, 1986; Diamond and Hsu, 1990; Rose et al., 2010).

This work was proposed to find the best conditions of partition and recovery of clavulanic acid from using aqueous two-phase system consisting of two polymers, PEG and polyacrylic acid (PAA), in the presence of two distinct salts Na_2SO_4 / NaCl using statistical designs, whose efficiency in the analysis ATPS's data have been proven, including the partition of AC itself (Silva et al., 2009).

Materials and methods

a. Materials

The sodium clavulanate used was purchased from commercial enterprise ® Galena (Campinas, São Paulo, Brazil) with 54% purity.

The polymers used in these design were: Polyethylene glycol (PEG) 400, 2000, 4000 and 8000 g / mol (Merck) and sodium polyacrylic (NaPA) of molar mass 8000 g / mol (Sigma-Aldrich). All other reagents used were of analytical grade. Solutions were prepared in pH 6.47 McIlvaine buffer consisting of 5.3 mM dibasic sodium phosphate and 1.36 mM citric acid. Deionized water used was obtained by Millipore Milli-Q purification system (Bedford, MA).

b. Methods

The ATPS were prepared in graduated test tubes of 15 ml. NaPA, PEG, salts (Na_2SO_4 or NaCl) and clavulanic acid solution were added in the desired quantities unto McIlvaine buffer, resulting in a total system mass 10 g and mixed by stirring overnight at 7 rpm revolution. On the day of testing the biomolecule was added at a concentration of 300 mg / mL and the system was mixed again, now in vortex for 30 seconds. Then, the systems were transferred to a temperature controlled bath at 25 ° C and kept at rest for 60 minutes for separation and phase equilibrium. After this equilibrium, samples of upper and lower phases were carefully collected, using automated pipettors. For each system a blank equivalent was made consisting of the same components except that clavulanic acid was replaced by the equivalent of milli-Q water (Millipore).

Determination of Clavulanic Acid Concentration

The determination of the concentration of clavulanic acid was performed using the method described by Bird et al. (1982).

Methodology for Results Analysis

Partition Coefficient (K)

$$K \equiv \frac{[AC]_T}{[AC]_B}$$

Wherein: $[AC]_T$ and $[AC]_B$ represent the concentrations ($\mu\text{g/mL}$) of clavulanic acid in the top phase and bottom phase respectively

Mass Balance (MB)

$$BM = \frac{[AC]_T V_T + [AC]_B V_B}{[AC]_{in} V_{in}} \times 100\%$$

Wherein: $[AC]_T$, $[AC]_B$ and $[AC]_{in}$ represent the concentrations ($\mu\text{g/mL}$) of the biomolecule in the top phase, bottom and initial acid solution added, respectively and V_T , V_B e V_{in} the respective volumes (mL).

Yield (η)

$$\eta = \frac{[AC]_{phase} V_{phase}}{[AC]_{in} V_{in}} \times 100\%$$

Wherein: $[AC]_{phase}$ represents the concentration ($\mu\text{g/mL}$) of clavulanic acid in a specific phase; V_{phase} its volume (mL); $[AC]_{in}$, the initial clavulanic acid concentration added; V_{in} , the initial clavulanic acid solution volume (mL).

Volumetric Ratio (R)

$$R = \frac{V_T}{V_B}$$

Wherein: V_T = top phase volume (mL) e V_B = bottom phase volume (mL).

The limit of significance for all statistical analysis was $\alpha = 0.05$, thus resulting in a confidence interval of 95% and the program used for such analysis was Statistica 10.0 (STATSOFT).

Results and Discussion

NaCl Assays

So far two full statistical designs (Tables 1 and 2) were carried while studying the influence of NaCl on PEG/NaPA systems for the extraction of clavulanic acid. Under the first one (Table 1), a 2^3 full factorial design, the best results were found at assays 7 and 8, with corresponding partition coefficients (K) of 4.21 and 4.28 and top phase yields (η_T) of 72.72% and 68.26%. Both assays represent the points of maximum values for variables concentration of PEG (CPEG) and NaPA (CNaPA), respectively 15% and 20%. These results are in accord to the no significance (represented by an “*” in Table 3) of PEG molar mass (MPEG) as shown on Table 3 for the response K.

As for the response η_T , MPEG has a slightly negative influence (-3.44), Table 3, meaning the lower the peg molar mass was, higher the recovery of clavulanic acid in the top phase would be. On light of that, the assay 7 was considered the one with the best results for it represented the lower MPEG when compared with assay 8, 1500 instead of 8000 g/mol and also higher recovery, 4.46% higher.

With the most important responses being set as K, which determines the prevalence of the biomolecule in one phase in relation to the other, and η_T as the molecule clearly chose the top phase as its partition target, the next statistical design was constructed so to further increase these responses, utilizing the assay 7 of Table 1 as central point of NaCl statistical design 2 (Table 2), MPEG was fixed at 1500 g/mol as already above mentioned it had no significance on K and already too low significance on η_T , resulting in a 2^2 full factorial design. CPEG and CNaPA had their values increased to comply with the effect values shown on Table 3, positive effects of both responses for K, and positive of CPEG and slightly negative (-4,81) of CNaPA for η_T . Thus the new design was built to favor K over η_T .

Under the second design (Table 2) the assay with the best results was number 4 with a $K=11.96$ and a $\eta_T=80.04\%$. Again, same as in the previous design, this assay was found within the maximum values for variables CPEG and CNaPA, this time, respectively, 20% and 25%, repeating the behavior of the precedent study. When looking to the effect values of the responses onto the variable K at table 3 in this particular study, 13.15 for CPEG, 23.57 for CNaPA and 7.1 for their interaction, all of them positive, from this interaction a surface plot graphic was made (Figure 1), showing the influence of both variables in K values and the a straight plane with no signs of reaching a plateau makes clear that there is still room for an increment of the partition coefficient by means of increasing both responses. As for η_T the only response complying with K is the positive CPEG of 19,87 effect, but as the yield is still satisfyingly high 80%, in the next design to be built K will still be favored over η_T .

From both studies one can assume that the clavulanic acid can be successfully extracted by PEG/NaPA NaCl systems and shows a preference towards the top phase when partitioned. This top phase preference might be explained by an electrostatic charge difference between both phases, caused by the presence of the NaCl salt, K^+ from the commercial used potassium clavulanate and the Na^+ ion present in the sodium polyacrilate (NaPA polymer) in the liquid system solution and the resultant negatively charged clavulanic acid when in solution. By its nature the PEG/NaPA systems are electroneutral (Johansson *et al.*, 2008) but the addition of NaCl may cause a common ion effect, displacing Na^+ from the polymer towards the top phase as its solubility decreases with the increase of other ions coming from the NaCl and the potassium clavulanate itself, favoring a super positive charge in the top phase and reinforcing the pre-existing repulsion of polyacrilate and positive molecules due to its COO^- groups and the incoming Cl^- . With this, the top phase would result being positively charged and the bottom phase negatively charged, to which the now negative clavulanic acid in solution would move to a more accommodating electrical region, being the top phase.

Volume exclusion effect might also be in action as the molar mass of the NaPA polymer (8000 g/mol) surpasses that of the the PEG (1500), but as in the first statistical design, assays 7 and 8 had

the same results under the same variables except MPEG which varied from 1500 to 8000 g/mol and the latest matched the NaPA molar mass, stands to reason that if such force is in action its effect is negligible when compared to the electrical ionic phase differences.

The best result, namely $K=11.96$ and a $\eta T=80.04\%$, considered to be optimized as any increase in the variables would result in a single phase system, is in accordance to other results throughout literature as in order of magnitude. Saranavan *et al.*, 2008 obtained a $K=15.77$ for mioglobin and 5,51 for ovalbumin and respective yields of 95,4% and 87,4% using the PEG/NaPA NaCl systems, while Silva *et al.*, 2009 extracted clavulanic acid with a $K=18.1$ and a yield of 88% utilizing MPEG 400 and phosphate salt under pH 6.4.

TABLE 1. NaCl Statistical Design 1 variables MPEG, CPEG and CNaPA and its responses R, [AC]T, [AC]B, K, BM (%), ηT (%) and ηB (%). Where, MPEG= PEG molar mass, CPEG= PEG concentration, CNaPA= NaPA concentration, R= Volumetric Ratio; [AC] T=Clavulanic Acid Concentration in the Top Phase ($\mu\text{g/mL}$); [AC] B= Clavulanic Acid Concentration in the Bottom Phase ($\mu\text{g/mL}$); K= Partition Coefficient; MB= Material Balance; ηT =Top phase yield; ηB =Bottom phase yield.

Assays	MPEG	CPEG (%)	CNaPA (%)	R	[AC] T	[AC] B	K	MB (%)	ηT (%)	ηB (%)
1	1500	5	10	0,48	20,68	12,15	1,7	99,04	44,34	54,7
2	8000	5	10	0,37	28,52	13,47	2,12	97,19	42,9	54,29
3	1500	15	10	1,43	21,14	6,43	3,29	97,07	80,07	17
4	8000	15	10	1,07	28,09	8,28	3,39	98,89	77,5	21,39
5	1500	5	20	0,23	36,67	10,34	3,55	93,66	41,93	51,73
6	8000	5	20	0,16	46,45	12,95	3,59	88,99	32,72	56,27
7	1500	15	20	0,63	33,96	8,06	4,21	99,92	72,72	27,2
8	8000	15	20	0,57	30,81	7,2	4,28	96,04	68,26	27,79
9	4000	10	15	0,51	34,21	9,62	3,56	94,84	61,07	33,77
10	4000	10	15	0,52	35,85	9,32	3,85	97,2	64,69	32,51
11	4000	10	15	0,53	35,74	9,59	3,73	97,7	65,04	32,66
12	4000	10	15	0,52	34,32	9,59	3,58	94,37	61,27	33,1

TABLE 2. NaCl Statistical Design 2 variables CPEG and CNaPA and its responses R, [AC]T, [AC]B, K, BM (%), ηT (%) and ηB (%). Where, CPEG= PEG concentration, CNaPA= NaPA concentration, R= Volumetric Ratio; [AC] T=Clavulanic Acid Concentration in the Top Phase ($\mu\text{g/mL}$); [AC] B= Clavulanic Acid Concentration in the Bottom Phase ($\mu\text{g/mL}$); K= Partition Coefficient; MB= Material Balance; ηT =Top phase yield; ηB =Bottom phase yield.

Assays	CPEG (%)	CNaPA (%)	R	[AC] T	[AC] B	K	MB (%)	ηT (%)	ηB (%)
1	10	15	0,65	32,72	12,98	2,52	105,74	65,58	40,16
2	10	25	0,35	53,41	7,91	6,75	96,91	68,38	28,53
3	20	15	1,18	34,1	8,37	4,07	112,75	93,27	19,48
4	20	25	0,66	41,68	3,48	11,96	90,18	80,04	10,14
5	15	20	0,63	37,66	8,72	4,32	97,15	71,18	25,97
6	15	20	0,7	34,74	9,03	3,85	97,02	70,76	26,26
7	15	20	0,67	35,74	8,53	4,19	98,4	72,47	25,93
8	15	20	0,67	37,39	8,41	4,45	97,38	72,81	24,57

Table 3. Statistical effects for the responses K (partition coefficient) and ηT (top phase yield) according with the NaCl statistical designs 1 and 2. Where, * = no significance.

Variables	Design NaCl 1		Design NaCl 2	
	K	ηT	K	ηT
MPEG (1)	*	-3,44	*	*
CPEG (2)	10,95	22,56	13,15	19,87
CNaPA (3)	13,29	-4,81	23,57	-5,26
1*2	*	*	*	*
1*3	*	*	*	*
2*3	-3,89	*	7,1	-8,09
1*2*3	*	*	*	*

Figure 1. Response Surface Plot for the response K obtained through the interaction of the variables CNaPA and CPEG on the NaCl Statistical Design 2.

Na₂SO₄ Assays

For the Na₂SO₄ study, three statistical designs (two 2³ and one 2² full factorial designs) were carried in order to reach an ideal set of response values under PEG/NaPA systems for the extraction of clavulanic acid.

The first design, seen in Table 4, reached best response values for the partition coefficient K (21,53 and 23,07) and top phase yield ηT (79,60% and 66,66%) under the assays 7 and 8, respectively. Exactly the same conditions of the assays of the first statistical design executed for the NaCl Salt (7 and 8 on Table 1), but with different orders of magnitude for K, approximately 5 times higher when Na₂SO₄ was used, indicating a more selective system for clavulanic acid in the presence of the later salt. An overall tendency was observed, independent of the salt type, for higher concentrations of PEG (CPEG) and NaPA (CNaPA) and no significance effect for the PEG molar mass (MPEG), as represented on Tables 3 and 7 by an “*” on the NaCl Design 1 and Na₂SO₄ Design 1. Observing ηT , in the first Na₂SO₄ design, MPEG had a negative effect (-9,84), Table 7, as it was

with NaCl, a lower value of PEG molar mass increased the recovery of the clavulanic acid in the top phase. And also as for the response K, an increase in CPEG and CNaPA (response values 44,25 and 7,84), displayed in Table 7, showed an increase in the recovery for the antibiotic onto the top phase.

Based on the results of the first statistical design, the assay 7 was chosen over the assay 8 for central point in the second design, due to the lower molar mass of the first and the still relevant effect of the PEG molar mass reduction in the top phase recovery. Therefore PEG molar mass was reduced while PEG and NaPA concentrations were increased resulting in the Table 5 experiments. In this second design, best achieved results were found again in the assay 7, showing a continual tendency for lower PEG molar mass, higher CPEG and CNaPA with results as high as 19,86 for the partition coefficient and 88,85% recovery in the top phase, a slight decrease in K (7,75%), when compared with the previous statistical design but a 9,25% increase in the top recovery.

Looking at Table 7, at the Statistical Design Column 2, it can be seen that although there was still a negative tendency for lower MPEG (-3,96), the assay 7 has an already too low PEG mass (400 g/mol) (Table 5) and it was not lowered anymore but fixed for the next design (Table 8). As for CPEG the response nT was non significant and for CNaPA negative (-5,07), indicating that the best result could be between the previous concentration of 20 and the latest used of 22,5%. For the response K, all the interactions but 1*2 were significant and negative, indicating all variables should be reduced at the same time to increase the partition coefficient but as MPEG was already too low and to be fixed only the interaction 2*3 was considered, with its negative value of -3,29, differing from its previous 7,35 of the first design, it could indicate that the optimum value could have been passed with the 5% step from the first design to the second. Knowing from previous undisclosed experiments that the assay 7 is also the limit of precipitation for this PEG/NaPA system, it was settled as the highest level for the next statistical design instead of the central point and with the knowledge of the lower need of concentration for CPEG and CNaPA to favor K and nT a lower step of 1,25% was chosen to see if the optimal point of extraction was in the vicinity of the assay 7 point, constituting then the third statistical design showed in Table 6.

In this later design (Table 6), the best result was the assay 4, the one with the same conditions as the assays 7 from the Tables 4 and 5 (MPEG 400 g/mol, CPEG 17,5% and CNaPA 22,5%), exhibiting a K of 19,14 and a η_T of 91,21%. On table 7 one can see that even with a small step such as 1,25%, for K the CPEG optimum was in theory surpassed showing a positive response of 5,59 while CNaPA and its interaction with PEG remained negative for nT (-5,44 and -3,42, respectively). With this latest experimental design, and its results showing large K difference results when varying small percentages in CPEG and CNaPA low as 1,25% and the fact that the assay 4 has already the highest concentrations of CPEG and CNaPA before precipitation of the system, this assay was considered the one with the best optimized variables for the extraction of clavulanic acid using a PEG/NaPA system with the addition of Na_2SO_4 .

TABLE 4. Na₂SO₄ Statistical Design 1 variables MPEG, CPEG and CNaPA and its responses R, [AC]T, [AC]B, K, BM (%), η T (%) and η B (%). Where, MPEG= PEG molar mass, CPEG= PEG concentration, CNaPA= NaPA concentration, R= Volumetric Ratio; [AC] T=Clavulanic Acid Concentration in the Top Phase (μ g/mL); [AC] B= Clavulanic Acid Concentration in the Bottom Phase (μ g/mL); K= Partition Coefficient; MB= Material Balance; η T=Top phase yield; η B=Bottom phase yield.

Assays	MPEG	CPEG (%)	CNaPA (%)	R	[AC] T	[AC] B	K	BM (%)	η T (%)	η B (%)
1	2000	5	10	0,19	42,21	12,34	3,42	85,01	33,67	51,34
2	8000	5	10	0,16	42,72	13,53	3,16	57,77	29,21	28,56
3	2000	15	10	0,59	37,95	4,37	8,68	82,66	69,2	13,46
4	8000	15	10	0,56	40,27	5,35	7,52	87,9	71,13	16,77
5	2000	5	20	0,12	89,19	9,24	9,65	84,72	45,74	38,98
6	8000	5	20	0,09	91,07	10,01	9,1	79,1	36,32	42,78
7	2000	15	20	0,4	60,74	2,82	21,53	88,77	79,6	9,17
8	8000	15	20	0,37	53,18	2,31	23,07	74,41	66,66	7,75
9	4000	10	15	0,31	55,71	5,1	10,91	82,4	63,49	18,91
10	4000	10	15	0,3	53,31	4,83	11,05	78,9	60,75	18,15
11	4000	10	15	0,3	54,2	4,52	11,98	78,78	61,77	17,01
12	4000	10	15	0,34	54,5	4,34	12,55	78,18	62,1	16,08

TABLE 5. Na₂SO₄ Statistical Design 2 variables MPEG, CPEG and CNaPA and its responses R, [AC]T, [AC]B, K, BM (%), η T (%) and η B (%). Where, MPEG= PEG molar mass, CPEG= PEG concentration, CNaPA= NaPA concentration, R= Volumetric Ratio; [AC] T=Clavulanic Acid Concentration in the Top Phase (μ g/mL); [AC] B= Clavulanic Acid Concentration in the Bottom Phase (μ g/mL); K= Partition Coefficient; MB= Material Balance; η T=Top phase yield; η B=Bottom phase yield.

Assays	MPEG	CPEG (%)	CNaPA (%)	R	[AC] T	[AC] B	K	BM (%)	η T (%)	η B (%)
1	400	12,5	17,5	0,46	54,79	3,76	14,57	98,86	85,92	12,94
2	4000	12,5	17,5	0,33	57,16	4,9	11,66	92,73	73,76	18,97
3	400	17,5	17,5	0,61	48,82	3,42	14,29	101,78	91,28	10,5
4	4000	17,5	17,5	0,57	51,4	2,73	18,81	103,66	94,76	8,9
5	400	12,5	22,5	0,33	66,45	3,93	16,89	98,26	83,23	15,03
6	4000	12,5	22,5	0,27	69,91	4,79	14,59	93,63	74,43	19,2
7	400	17,5	22,5	0,5	53,55	2,7	19,86	97,8	88,85	8,95
8	4000	17,5	22,5	0,38	40,55	4,22	9,61	71,18	55,87	15,31
9	2000	15	20	0,42	54,5	4,2	12,98	95,08	80,38	14,7
10	2000	15	20	0,41	59,2	3,93	15,05	99,46	85,7	13,76
11	2000	15	20	0,41	60,44	4,04	14,95	101,63	87,49	14,14
12	2000	15	20	0,39	58,54	4,13	14,19	99,57	84,33	15,24

TABLE 6. Na₂SO₄ Statistical Design 3 variables CPEG and CNaPA and its responses R, [AC]T, [AC]B, K, BM (%), η T (%) and η B (%). Where CPEG= PEG concentration, CNaPA= NaPA concentration, R= Volumetric Ratio; [AC] T=Clavulanic Acid Concentration in the Top Phase (μ g/mL); [AC] B= Clavulanic Acid Concentration in the Bottom Phase (μ g/mL); K= Partition Coefficient; MB= Material Balance; η T=Top phase yield; η B=Bottom phase yield.

Assays	CPEG (%)	CNaPA (%)	R	[AC] T	[AC] B	K	BM (%)	η T (%)	η B (%)
1	15	20	0,49	41,92	4,15	10,1	100,69	83,79	16,89
2	15	22,5	0,46	45,87	3,24	14,16	101,71	88,28	13,43
3	17,5	20	0,55	37,69	2,92	12,9	92,38	80,91	11,47
4	17,5	22,5	0,45	49,28	2,57	19,14	101,69	91,21	10,48
5	16,25	21,25	0,51	44,65	3,78	11,81	104,08	89,25	14,84
6	16,25	21,25	0,48	45,01	3,43	13,11	100,36	86,63	13,73
7	16,25	21,25	0,51	45,08	4,05	11,14	105,99	90,11	15,88
8	16,25	21,25	0,54	45,33	4,08	11,12	109,65	93,95	15,7

Table 7. Statistical effects for the responses K (partition coefficient) and η T (top phase yield) according with the NaCl statistical designs 1 and 2. Where, * = no significance.

	Design Na ₂ SO ₄ 1		Design Na ₂ SO ₄ 2		Design Na ₂ SO ₄ 3	
Variables	K	η T	K	η T	K	η T
MPEG (1)	*	-9,84	-3,96	-6,01	*	*
CPEG (2)	16,07	44,25	*	*	5,59	*
CNaPA (3)	18,38	7,84	*	-5,07	*	-5,44
1*2	*	*	*	*	*	*
1*3	*	-6,19	-5,25	-3,87	*	*
2*3	7,35	*	-3,29	-4,59	*	-3,42
1*2*3	*	*	-5,7	-4,66	*	*

Figure 2. Response Surface Plot for the response K obtained through the interaction of the variables CNaPA and CPEG on the Na₂SO₄ Statistical Design 3.

Conclusions

From both studies one can assume that the clavulanic acid can be successfully extracted by PEG/NaPA NaCl systems and shows a preference towards the top phase when partitioned. This top phase preference might be explained by an electrostatic charge difference between both phases, caused by the presence of the NaCl salt, K^+ from the commercial used potassium clavulanate and the Na^+ ion present in the sodium polyacrilate (NaPA polymer) in the liquid system solution and the resultant negatively charged clavulanic acid when in solution. By its nature the PEG/NaPA systems are eletroneutral (Johansson *et al.*, 2008) but the addition of NaCl may cause a common ion effect, displacing Na^+ from the polymer towards the top phase as its solubility decreases with the increase of other ions coming from the NaCl and the potassium clavulanate itself, favoring a super positive charge in the top phase and reinforcing the pre-existing repulsion of polyacrilate and positive molecules due to its COO^- groups and the incoming Cl^- . With this, the top phase would result being positively charged and the bottom phase negatively charged, to which the now negative clavulanic acid in solution would move to a more accommodating electrical region, being the top phase.

Volume exclusion effect might also be in action as the molar mass of the NaPA polymer (8000 g/mol) surpasses that of the the PEG (1500), but as in the first statistical design, assays 7 and 8 had the same results under the same variables except MPEG which varied from 1500 to 8000 g/mol and the latest matched the NaPA molar mass, stands to reason that if such force is in action its effect is negligible when compared to the electrical ionic phase differences.

The best result, namely $K=11.96$ and a $\eta T=80.04\%$, is in accordance to other results throughout literature as in order of magnitude. Saranavan *et al.*, 2008 obtained a $K=15,77$ for mioglobin and 5,51 for ovoalbumin and respective yields of 95,4% and 87,4% using the PEG/NaPA NaCl systems, while Silva *et al.*, 2009 extracted clavulanic acid with a $K=18,1$ and a yield of 88% utilizing MPEG 400 and phosphate salt under pH 6.4.

References

- ALBERTSSON, P.A. **Partition of cell particles and macromolecules**: separation and purification of biomolecules, cell organelles, membranes, and cells in aqueous polymer two phase systems and their use in biochemical analysis and biotechnology. 3.ed. New York: Wiley-Interscience, 1986. 346p.
- AZEVEDO, A.M.; ROSA, P.A.J.; FERREIRA, I.F.; DE VRIES, J.; VISSER, T.J.; AIRES-BARROS, M.R. Downstream processing of human antibodies integrating an extraction capture step and cation exchange chromatography. **J. Chromatogr. B.** v.877, 2009, p.50-58.
- BARBOZA, M.; ALMEIDA, R. M.R.G.; HOKKA, C. O. Influence of temperature on the kinetics of adsorption and desorption of clavulanic acid by ionic exchange. **Biochemical Engineering Journal**, v. 14, p. 19–26, 2003.
- BENÍCIO DE BARROS NETO, IEDA SPACINO SCARMINO E ROY EDWARD BRUNS. **Como fazer experimentos**. 3ed. Campinas-SP: Editora da Unicamp, 2007, p173-174.
- BERSANETTI, P.A.; ALMEIDA, R.M.R.G.; BARBOZA, M.; ARAUJO, M.L.G.C.; HOKKA, C.O. Kinetic studies on clavulanic acid degradation. **Biochemical Engineering Journal**, v.23, p.31-36, 2005.
- BIRD, A.E.; BELLIS, J.M.; GASSON, B.C. Spectrophotometric assay of clavulanic acid by reaction with imidazole. **Analyst**, v.107, p.1241-1245, 1982.
- BROWN, A. G.; BUTTERWORTH, D.; COLE, M.; HANSCOMB, G.; HOOD, J.D.;READING, C.; ROINSON, G. N. Naturally occurring β -lactamase inhibitors without antibacterial activity, **The Journal of Antibiotics**, v.29, n.6, p.668-669, 1976.
- DIAMOND, A.D.; HSU J.T. Protein partitioning in PEG/dextran aqueous two-phase systems. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.** v.36, p.1017–24, 1990.
- ELANDER, R.P. Industrial production of β -lactam antibiotics, **Applied Microbiology and Biotechnology**. 61, 385–392, 2003.
- JOHANSSON, H. O., MAGALDI, F.M., FEITOSA, E., PESSOA JUNIOR, A. Protein partitioning in poly(ethylene glycol) sodium polyacrylate aqueous two-phase systems. **Journal of Cromatography A**, v. 1178, p. 145-153, 2008.
- KORNMANN, H.; BAER G. Process for the purification of IL-18 binding protein. **US Patent** 7,439,336, 2008.
- MARANESI, G.L.; BAPTISTA NETO, A.; HOKKA, C.O.; BADINO, A.C. Utilisation of vegetable oil in the production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.21, n.4, p.509-514, 2005.
- ORTIZ, S.C.A.; HOKKA, C.O.; BADINO Jr., A.C. Utilization of soybean derivatives on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p.1071-1079, 2007.
- ROSA, P.A.J.; FERREIRA, I.F.; AZEVEDO, A.M.; AIRES-BARROS, M.R. Aqueous two-phase systems: A viable platform in the manufacturing of biopharmaceuticals. **Journal of Chromatography A**. v.1217, p.2296–2305, 2010.
- SARAVANAN, S.; RAO, J.R.; NAIR, B.U.; RAMASAMI, T. Aqueous two-phase poly(ethylene glycol)–poly(acrylic acid) system for protein partitioning: Influence of molecular weight, pH and temperature. **Process Biochemistry**. v.43 905–911, 2008.
- SAUDAGAR, P.S.; SURVASE, S.A.; SINGHAL, R.S. Clavulanic acid: A review. **Biotechnology Advances**. v. 26, p.335–351, 2008.
- SILVA, C.S., BOVAROTTI E., RODRIGUES M.I., HOKKA C.O., BARBOZA M. Evaluation of the effects

of the parameters involved in the purification of clavulanic acid from fermentation broth by aqueous two-phase systems. **Bioprocess Biosyst Eng.** v. 32(5), p.625-632. 2009.

SINGH GS. Beta-lactams in the new millennium. Part-II: cepheids, oxacepheids, penams and sulbactam. **Mini Rev Med Chem.** v.4(1), p.93–109, 2004.

10.2.2.

BIOMOLECULES AND BIOPARTICLES PURIFICATION PROCESSES: AN OVERVIEW

João Vitor Dutra Molino¹, Valter Araujo Feitosa¹, Letícia Célia de Lencastre Novaes¹, Bruno Ubertino Rosso¹, Valéria de Carvalho Santos-Ebinuma¹, André Moreni Lopes¹, Angela Faustino Jozala¹, Daniela de Araújo Viana Marques², Luciana Pellegrini Malpiedi^{1,3} and Adalberto Pessoa Júnior^{*1}

¹Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo – USP, Brazil

²Department of Animal Morphology and Physiology, Uniry Sede Dois Irmãos, Federal Rural University of Pernambuco– UFRPE, Brazil

³Department of Chemical-Physic, School of Biochemical and Pharmaceutical Sciences, University of Rosario – UNR, Argentina

Abstract

Biotechnology industry demands fast and economic downstream processes for biomolecules partitioning and purification, as well as separation methodologies that result in higher product yield and purity. In this review, several downstream processing methodologies are presented, and the importances of some standard, simple and robust techniques are highlighted. The purity of most biomolecules and bioparticles increases when two, three or more combined purification techniques are used. Chromatographic methods still remain as the most efficient high resolution purification processes; however, by using different support types. Aqueous two-phase systems (ATPS), aqueous two-phase micellar systems (ATPMS), extractive fermentation with ATPS and high-performance tangential flow filtration are also relevant, due to time-saving. We can conclude that ATPS is an attractive technique to be used as the initial separation steps of biomolecules and bioparticles since it usually presents high recovery yields (around 70-200%) and adequate purification factors (nearly 1.5 to 5.0), which could be improved with subsequent high resolution steps. All data presented herein are considered to be a relevant contribution to facilitate the establishment of some purification process at commercial scale.

Keywords:

Precipitation; Chromatography; Liquid-liquid Extraction; Downstream Processing, Biochemical Engineering; Bioprocess

Resumen

La industria biotecnológica exige procesos rápidos y económicos para el reparto y lapurificación de biomoléculas, así como también, metodologías separativas que ofrezcan un alto rendimiento y una alta pureza del producto final. En este trabajo se presentarán diferentes metodologías de separación y purificación de moléculas, destacando la importancia de algunas de las técnicas convencionales, simples y robustas. La pureza de la mayoría de las biomoléculas y partículas es mayor cuando se utiliza dos, tres o más técnicas de purificación combinadas. Los métodos cromatográficos siguen siendo los procesos de purificación más eficiente, sin embargo, con diferentes tipos de soportes. Otros métodos de extracción, como

sistemas bifásicos acuosos (SBAs); sistemas micelares de dos fases acuosas (SMDFA); fermentación extractiva con SBAs y filtración de flujo tangencial de alto rendimiento también son relevantes debido a su bajo consumo de tiempo. Podemos concluir que SBAs es una técnica atractiva para ser utilizada en las etapas iniciales de separación de biomoléculas y biopartículas ya que por lo general presenta altos rendimientos de recuperación (alrededor de 70-200%) y factores de purificación adecuados (casi 1,5 a 5,0), los cuales podrían ser mejorados con pasos subsiguientes de alta resolución. Todos los datos presentados en esta revisión se considera que son una contribución relevante para facilitar el establecimiento de algún proceso de purificación a escala comercial.

Palabras clave:

Precipitación, Cromatografía, Extracción Líquido-líquido, Processes de Downstream, Ingeniería Bioquímica, Bioprocesos

Highlights:

1. In this review, we shall compare various downstream processing methodologies for the purification of different bioproducts;
2. The development of techniques for the purification of biomolecules has been important for advances in the biotechnology industry;
3. Before applying a method to purify a molecule, it is vital to analyze the benefits and disadvantages of each one;
4. Aqueous two-phase system is an attractive technique to be used as the initial separation steps of biomolecules;
5. For most biomolecules and particles, the separation purity increases when two or more purification techniques are applied.

Corresponding Author:

Adalberto Pessoa-Jr - e-mail: peessoajr@usp.br
 Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
 Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP
 Av. Prof. Lineu Prestes, 580, B16
 Cidade Universitária - 05508-000 - São Paulo/SP, Brazil
 Phone: 55-11-3091-3862 - Fax: 55-11-3815-6386

1. Introduction

Downstream processing, also known as bioseparation, refers to the wide variety and combinations of production processes that are employed to purify biomolecules from different biological sources (Shukla *et al.*, 2007). As it comprises a key point for the commercial development of biotechnological products (Kelley 2009), bioseparation protocols should be designed in order to reach the best cost/benefit ratio. A conventional downstream process protocol includes an initial clarification step (removal of cells and enrichment of the target molecule), intermediary purification (first capture of the molecule of interest) and polishing (final product with high degree of purity) (Shukla *et al.*, 2007). Each step may even comprise several unit operations

depending on the biological source complexity and/or the final purity degree required. Unfortunately, the use of a multi-step procedure generally leads to low recovery yields, thus impacting in the final product costs (Low *et al.*, 2007; Kurasawa *et al.*, 2013). For large-scale purification, the drawbacks of using many purification steps is even more significant due to the large space, and buffer volumes required for downstream operations (Aldington and Bonnerjea 2007). As a result, alternative methodologies that allow the integration of several purification steps, offering simple procedures, are being evaluated (Low *et al.*, 2007). Important candidates include precipitation, aqueous two-phase systems (ATPS) and expanded bed chromatography. These techniques present the advantage of integrating clarification and intermediary purification, avoiding the use of multi-step protocols (Lan *et al.*, 2011; Rosa *et al.*, 2013). On the other hand, liquid-liquid extraction and expanded bed adsorption can even integrate upstream and downstream processes. These last methodologies are currently known as extractive bioconversion.

In this review, we shall compare various downstream processing methodologies and offer our point of view on which one of them is the most suitable for the purification of different biotechnological products. It should be noticed that most of the examples cited in this paper will be based on previous works developed by our research group

2. Precipitation process

The precipitation assay is one of the most commonly applied techniques in laboratory and industrial scale for bioproduct purification. The precipitation process has been performed since the 18th century, and until the beginning of the 20th century, practically the only separation technologies available (A Pessoa Jr and B. Kilikian 2005). Since the advent of modern liquid chromatography, it is uncommon for any of these early techniques, such as precipitation, to be used alone. A combination of techniques is normally used to assure the quantity, quality, and desired purity of the protein target, and protein precipitation is useful for purification and enrichment of a target protein from an extract (A Pessoa Jr and B. Kilikian 2005). It is important to point out that biomolecules/bioparticles are affected by temperature, pH and sample concentration. These parameters must be controlled to ensure stability and reproducible results (Idiris *et al.* 2010; Aldington and Bonnerjea 2007).

2.1 Precipitation by Salts

A common first step in protein purification is the precipitation technique through salting out. This is the oldest type of precipitation, and it is still used regularly on a laboratory scale. Precipitation carried out with high salt level concentrations remove water associated with protein. An advantage of this method is that it can be performed inexpensively in very large volumes. The most commonly used salts are ammonium sulfate and sodium sulfate. Ammonium sulfate, although widely used, presents waste disposal problems because of the nitrogen content and corrosive properties. Sodium sulfate is an alternative to salt precipitation, since it constitutes a simple mean of recycling by reducing temperature and separating salt crystals. Precipitation using salts occurs through the neutralization of protein superficial charges and reduced hydration layer, promoting the aggregation of hydrophobic residues (E. V. Cortez et al. 1998; A Pessoa Jr and B. Kilikian 2005).

Cortez *et al.*, carried out precipitation assays of xylanase and total protein precipitation by using sodium sulfate. In the precipitations performed with sodium sulfate, the maximal xylanase recovery (71.8%) was attained at 25% concentration. At higher salt concentrations, the enzyme dissolved once more in the supernatant and the recovery yield decreased. The total protein precipitation curve showed a different behavior, in comparison to the xylanase. The highest recovery level (68%) was observed at 40% salt concentration.

2.2 Organic solvents precipitation

Organic solvents, such as acetone and ethanol, have similar effects to high concentration of salts when added to protein solutions, lowering protein solubility. Proteins are easily denatured in organic solvents at temperatures above 10°C, so special care must been taken (Bollag *et al.*, 1996).

Ethanol is by far the most important of the solvents due to its good physical and chemical properties, such as complete miscibility with water, good freezing-point depression, no explosive mixtures, high volatility, chemical inertness, low toxicity, and low cost (especially in Brazil) (Cortez *et al.*, 1998). Cortez and Pessoa (1999) carried out fractionated ethanol precipitations to selectively separate β -xylosidase from the total proteins present in the xylanolytic complex (fermented medium). Results showed adequate selective separation of the xylanolytic enzymes. Some differences in solubility between total xylanase and β -xylosidase can be observed. The highest β -

xylosidase recovery yield and the highest total xylanase yield were achieved with ethanol concentrations of 60 and 80%, respectively. Ethanol precipitation of total xylanase and β -xylosidase were independent of the pH value for ethanol concentrations below 40%. At 60% ethanol concentration, a slight decrease in the xylanase solubility was observed, and at 80% ethanol concentration, almost 100% of the total xylanase was precipitated. At pH 4.6 and 7.0, about 85% of the total xylanase was recovered, whereas at pH 5.9 and 6.3, about 95% of the total xylanase was recovered. The results obtained in this study (74% of β -xylosidase and 80% of total xylanase recovery) revealed that ethanol fractional precipitation is an appropriate technique for the purification of enzymes produced by *Penicillium janthinellum* from sugar cane bagasse. This technique does not affect the kinetic characteristic of the enzyme and provides a solution with low ionic strength, which is desirable for further purification steps. In addition, Soares and co-workers (2012) studied bromelain purification through ethanol precipitation methodology. Through a two step precipitation, 30-70% (v/v) ethanol, it was possible to purify bromelain with a purification factor of 2.28 with a 99.2% recovery yield.

3. Chromatographic Processes

Chromatography is a separation process where the sample is distributed between a static phase named chromatographic bed (column), and a mobile phase (eluent) (Brugger *et al.*, 1988). In order to be separated by this method, substances must have different relative affinities for one of the aforementioned phases, resulting in different migration velocities of the components, and ultimately leading to their separation (Jonsson and Lovkvist 1987).

Chromatographic processes are usually classified into two branches: Gas Chromatography, in which the mobile phase is a gas, and Liquid Chromatography, where the mobile phase is a liquid (Bryant *et al.*, 1994). Regarding the later, the most commonly used methods are: (i) adsorption or normal-phase, where the stationary phase is polar and the mobile phase is non-polar, e.g., hydrophobic interaction, ion-exchange and affinity chromatographies; (ii) reversed-phase, with reversed polarity in comparison to the adsorption method; and (iii) size-exclusion. The separation process can also be classified according to the physical properties of proteins, for instance: (i) charge (ion-exchange chromatography), hydrophobicity (hydrophobic

interaction chromatography), size (size exclusion chromatography), specific interactions (affinity) (Kallberg *et al.*, 2012).

Despite the high cost and time spent, chromatographic techniques are still used to purify biomolecules and bioparticles. Currently, other methods or other support types are being tested together with these techniques to enhance purification procedures (Forcic *et al.*, 2011). New purification processes have been studied to surpass simple chromatographic efficiency and to achieve the requirements for human therapeutic biomolecules; a product free from contaminating microbial components, with cost-effective yield and compliant to regulatory guidelines process (Ebrahimpour *et al.*, 2010).

3.1 Hydrophobic Interaction Chromatography

Hydrophobic Interaction Chromatography (HIC) is an important separation mode by adsorption for biomolecules purification. The method is based in the protein's hydrophobicity and subsequent interaction with hydrophobic ligands groups. While linear and step-gradient are the most widely used elution modes, displacement chromatography can offer several advantages over these traditional modes. These advantages include: (i) high effective separation factors, leading to enhanced selectivity; (ii) control over the purified product concentration; and (iii) high loadings, leading to enhanced production rates (Sunasara *et al.*, 2003)

Our research group has demonstrated that recombinant Green Fluorescent Protein (rGFP) can be purified in these systems. After three-phase partition (TPP) the cell extract with rGFP from *E. coli* was eluted through four HiTrap FF HIC columns: methyl, butyl, octyl, phenyl Sepharose. The recovery index varied from 72.67 to 107.13%, and the methyl support showed a very high efficiency in rGFP recovery. After elution through the methyl HIC columns, rGFP recovery and enrichment in the eluted samples showed very high indexes, about $90.10 \pm 4.11\%$ of rGFP recovery and 8.03 ± 2.07 -fold enrichment of rGFP related to the specific mass. Therefore, the HIC procedure did improve the effectiveness of TPP extraction on GFPuv purification (Thereza Christina Vessoni Penna *et al.*, 2004).

3.2. Ion-Exchange Chromatography in Expanded Bed

Ion-Exchange Chromatography (IEC) is one of the most common procedures for protein purification. It is based on the interactions (cationic or anionic) between the

charged groups on the proteins and the immobilized groups on the resin. This interaction is usually described as an equilibrium model; however, it seldom provides single-step purification due to a lack of specific affinity (Chern *et al.*, 2009).

Expanded-bed adsorption of proteins using Streamline™ is a method developed by Pharmacia (Uppsala, Sweden) for continuous purification. This operation process enables the proteins recovery without previous cell removal from the cultivated media, and efficiently replaces unitary operations, such as centrifugation, filtration, concentration and extraction (Pessoa Jr and Vitolo 1998).

Using the anion-exchange expanded bed chromatography technique with diethylaminoethanol (DEAE), our group recovered the enzyme inulinase directly from the cultivated medium by *Candida kefyr*. The highest enrichment factor obtained was 4.3, 2.8 concentration factor and 93.1% enzyme recovery. The selectivity and specificity of the chromatographic technique were higher than those of the other techniques tested for this enzyme. However, in comparison to the cross-flow filtration, expanded-bed adsorption presented low capacity of enzyme concentration (Pessoa Jr and M Vitolo 1998).

Kalil and co-workers (2005) also purified inulinase from *Kluyveromyces marxianus* using ion-exchange expanded-bed chromatography; the overall yield of inulinase activity was between 78 and 74%, with a 10.4 purification factor. The same group, in 2010, used cation-exchange chromatography to purify inulinase produced by *K. marxianus*, and obtained results lower than in 2005: ~67.5% recovery with a ~6.6-fold purification factor (Kalil *et al.*, 2010). Using a two-step approach based on precipitation, with ethanol followed by ultrafiltration, Golunski and coworkers (2011) obtained a 5.5-fold purification of the crude extract from *K. marxianus* NRRL Y-7571, with 86.1% yield .

3.3. Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography

Affinity chromatography (AC) is a type of liquid chromatography that makes use of chemical or biological-like interactions for the separation and specific analysis of sample components. It uses a binding agent, known as “affinity ligand” that selectively interacts with the desired analyte and is placed onto a solid support within the chromatography column (Hage 1999). The ligands can be divided into several subcategories, for instance: lectin-affinity, immunoaffinity, enzyme or substrate-affinity, dye ligand and immobilized ion affinity chromatography (IMAC) (Hage 1998;

Hermanson *et al.*, 1992). The later uses a metal ion (Cu^{++} , Zn^{++} , Ni^{++} , Co^{++} , or Fe^{+++}) complexed with an immobilized chelating agent, commonly iminodiacetic acid (IDA) (Hage *et al.*, 2012). IMAC separates proteins and peptides based on the interactions of certain amino acid residues with the aforementioned immobilized metal chelate (Winzerling *et al.*, 1992; Porath 1992; Lopatin and Varlamov 1995) and it is considered a quite selective method of purification, reproducible on large scale (Hage *et al.*, 2012).

Our group applied IMAC with Ca^{++} +IDA to remove most of the lipopolysaccharides (LPS) contaminants (higher than 90%) from the end product (rGFP), with a substantial advantage in time, effort, and production costs. The highest adsorption capacity obtained was 2,677,061 EU/mL. Factors such as pH and ionic strength were essential to reach an effective LPS removal for contaminant levels; this technique is recommended for the removal of contaminating LPS present in different steps of a purification process at concentrations between values lower than 100 EU/mL and 100,000 EU/mL (Lopes *et al.*, 2012).

4. Liquid-liquid extraction

Partitioning in aqueous two phase systems (ATPSs) has been proving to be a valuable technique for separating and purifying biomolecules, organelles, membranes, as well as whole cells, from complex media. In comparison to other separation techniques, aqueous two-phase extraction offers many advantages, such as a short processing time, low energy consumption, biocompatibility with the environment and the relative ease of its scale-up (Liu *et al.*, 2011). On the other hand, extractive bioconversion using aqueous two-phase systems (ATPS) seems to be a very attractive method for the integration of fermentation and downstream processing of extracellular proteins (Pandey and Banik 2011).

Several ATPS formats could be employed, such as: aqueous polymeric systems, which can be formed with two polymeric solution or a polymeric solution and a salt solution; and aqueous micellar two-phase systems (AMTPS), prepared with micelle-forming surfactants in aqueous or organic solvents (in the last case, reverse micelles will be formed). The next sections will summarize some successful purification results employing different ATPS.

4.1 Liquid-liquid extraction in polymeric aqueous two phase systems

As it was mentioned in the previous section, different biomolecules and cellular components have been purified by employing liquid-liquid extraction. Regarding biomolecules, several hydrolytic and non-hydrolytic enzymes have been successfully purified. For instance, bromelain purification with ATPS formed by poly(ethylene oxide) (PEO)–poly(propylene oxide) (PPO)–poly(ethylene oxide) (PEO) block copolymers was studied by Rabelo and co-workers (2004). The best results showed 79.5% enzyme activity recovery, 1.25 top phase purification factor and 1.4 enzyme activity partition coefficient. Moreover, Coelho and co-workers (2013) purified bromelain through an unconventional ATPS, which integrates fractional precipitation by ammonium sulfate. With this new technique, they obtained an 11.80 purification factor with 66.38% activity yield. Collagenase from *Penicillium aurantiogriseum* URM4622 was purified by Rosso and co-workers using ATPS of PEG/fosphate. They obtained a 376.8% yield in the top phase, with 14.7 purification factor (Rosso *et al.*, 2012). Lysozyme is another example of enzyme that is widely employed to ATPS extraction assays. Lu and colleagues (2013) assessed lysozyme purification from crude hen egg using PEG 4000/potassium citrate aqueous two-phase system (ATPS). They observed that lysozyme recovery increased with higher salts concentration. Furthermore, the purification factor and specific activity were increased to higher PEG4000 concentrations. Dembczyński *et al.*, (2012) studied an optimization methodology in order to identify the system composition for the most efficient separation of lysozyme from hen egg white in the aqueous two-phase system EO50PO50/potassium phosphates. The influence of phosphate, copolymers of ethylene oxide and propylene oxide (EO50PO50), NaCl concentration and pH on the partition coefficient and extraction yield of lysozyme were evaluated. The best results in lysozyme partitions were found when NaCl was present. The partition behavior of *P. janthinellum* xylanase has also been studied in aqueous two-phase systems. Costa and collaborators (1998) studied the effects of PEG molecular weight and concentration, pH, and salts (phosphate and NaCl) concentration on partition coefficient (K) of xylanase. The %PEG, %NaCl, and pH were the most important factor.

An example of non-hydrolytic enzyme purification is the one obtained by Oliveira *et al.*, (2003) who extracted hexokinase from *S. cerevisiae* with a 1.6 purification factor using aqueous two-phase (PEG/citrate) system. Also, by applying aqueous

two-phase system (PEG/citrate) in a continuous process with perforated rotating disc, ascorbate oxidase was extracted from *Cucurbita maxima* with 3.35 partition coefficient, 54,98% separation efficiency and a purification factor equal to 1.46 (Porto *et al.*, 2010). On the other hand, a system composed of PEG/phosphate was able to recover G6PD from yeast cell homogenate with 97,7% yield and 2.28 purification factor (Ribeiro *et al.*, 2007).

Other bimolecules, such as antibiotics, natural dyes or colorants were purified employing different ATPS. The first attempt regarding clavulanic acid (CA) extraction employing aqueous two-phase systems was performed by Videira *et al.*, (1994). The authors studied the aqueous two-phase system composed of polyethylene glycol (PEG) and potassium phosphate to extract commercial potassium clavulanate. The results revealed that this molecule showed high affinity with the PEG-rich phase with partition coefficients ranging from 1.5 to 114 and high recoveries (75%). By increasing the tie-line length and pH, it raised the potassium clavulanate partition coefficient and 99% of the clavulanate was recovered in the PEG phase. A similar system used by Videira and Aires-Barros (1994), namely phosphate and polyethylene glycol, was studied by Silva *et al.*, (2009) to purify CA from fermented broth of *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064. To this purpose, the authors investigated the effects of different factors on the yield and purification through an experimental design. The preliminary results showed that the PEG molecular mass, tie-line length and phase volume ratio exerted the strongest effect on the yield and distribution coefficient in the range studied. In addition, the authors used response surface methodology to optimize the distribution coefficient, yield, and purification factor. The optimal extraction conditions found were PEG 400, pH 6.4, 42 tie line length and 1.3 phase volume ratio. Such extraction conditions provided 100% recovery yield and a 1.5-fold purification factor. Silva *et al.*, (2012) studied the separation of clavulanic acid from fermented broth of amino acids using aqueous two-phase systems composed of polyethylene glycol and potassium phosphate followed by an ion-exchange adsorption. The objective of the authors was to remove small impurities, specifically amino acids from the fermented broth employing aqueous two-phase systems since they migrate to the bottom phase while CA partition to top, PEG rich phase, and later recovery of the drug using the second method. The best condition was achieved with the systems composed of 17% PEG 600 and 15% of potassium phosphate. Viana-

Marques *et al.*, (2011) studied the extractive fermentation of CA by *Streptomyces* DAUFPE using aqueous two-phase systems composed of poly(ethylene glycol) (PEG) and phosphate salts. In that work, the CA extraction in stirred flasks was evaluated by means of a 2^{4-1} fractional factorial design followed by a 2^2 central composite design. The variables investigated were PEG molar mass, concentrations of PEG and phosphate salts and agitation intensity. The results revealed that agitation intensity and PEG molar mass were the most significant variables to the process. So, the authors optimized the process and the best results were showed in terms of partition coefficient ($K = 8.2$), CA yield in the PEG-rich phase ($\eta = 93\%$) and productivity ($P=5.3\text{mg/L.h}$). Furthermore, studies in the optimized condition to scale-up the process, e.g. bench-scale fermenter, were carried out and revealed better results than the ones obtained in stirred flask. As an alternative to the aqueous two-phase systems based on polymers/salts, a novel inexpensive and stable aqueous two-phase system (ATPS) composed of poly(ethylene glycol) (PEG) and sodium polyacrylate (NaPA) supplemented with NaCl and Na_2SO_4 was investigated by Pereira *et al.*, (2012) to extract CA from fermented broth. The authors evaluated the influence of PEG-molecular size and polymer concentrations on commercial CA partitioning at 25°C . The data showed that commercial CA was preferentially partitioned for the PEG-rich phase with a partition coefficient (K) varying from 1 to 12 depending on the system composition. The partition to the PEG phase was increased in the systems with high polymer concentrations. Moreover, the salt Na_2SO_4 caused higher CA preference for the PEG-phase than NaCl. The systems with a 10 wt% of PEG4000, 20 wt% of NaPA8000 and 6 wt% of Na_2SO_4 composition were selected as the optimal ones in terms of recovery of CA from fermented broth of *S. clavuligerus*. The partitioning results ($K = 9.15 \pm 1.06$) were competitive with commercial extraction methods of CA ($K = 11.91 \pm 2.08$). Other antibiotics, tetracyclines, were extracted from the fermented broth of *S. aureofaciens* by Pereira and co-authors (2013) using aqueous two-phase systems (ATPS). The authors compared the conventional PEG/ Na_2SO_4 and $[\text{Ch}]\text{Cl}/\text{K}_3\text{PO}_4$ ATPS with the aqueous two-phase systems composed of polyethylene glycol (PEG) and cholinium-based salts, e.g. liquid ionics, which are very recent systems (Freire *et al.*, 2012). Both systems were efficient to extract tetracycline from the fermented broth. However, the latter promoted extraction efficiencies higher than 80%. The authors have observed

that not only the nature of liquid ionic but also the pH of the medium had a significant influence to the partition of tetracycline, and the phase that the target biomolecule was recovered relied on the cholinium-based salt used. According to the authors, these systems are applicable to extract tetracyclines from complex medium and can be envisaged as valuable platforms to be applied at industrial level by pharmaceutical companies. The primary recovery of the natural colorant β -phycoerythrin from *P. cruentum* of fermented broth employing aqueous two-phase systems (ATPS) was first evaluated by Benavides and Rito-Palomares (2004). In this first study, the authors evaluated poly(ethylene glycol) (PEG) molar mass, concentration of PEG and salt, system pH and volume ratio parameters. The best result was achieved in the condition with PEG 1450-phosphate since the colorant concentrated to the top phase whilst the protein contaminants and cell debris concentrated in the bottom phase. A 2.9 purity and 77.0% yield was achieved in the following experimental condition: volume ratio (Vr) equal to 1.0, PEG 1450 24.9% (w/w), 12.6% phosphate (w/w) and system pH 8.0. As a sequence of the work above, Benavides and Rito-Palomares (2006) studied the recovery of β -phycoerythrin from *P. cruentum* in two-stage: first applying sonication to disrupt the cell, followed by a primary recovery employing aqueous two-phase partition. Cell disruption by sonication showed to be a suitable method before applying ATPS. To the latter, the best results (90% recovery of β -phycoerythrin at the top PEG-rich phase) were achieved in a system composed of 29% (w/w) polyethylene glycol (PEG) 1000, 9% (w/w) potassium phosphate, 45% tie-line length (TLL) (w/w), 4.5 volume ratio, pH 7.0 and 40% (w/w) crude extract. The purity of β -phycoerythrin increased up to 4.0 times after the two-stage method. Recently, the same authors (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2013) have studied the scale-up of β -phycoerythrin purification process from *P. cruentum*. To this purpose, the authors implemented an 850 fold scale-up factor. The following scale-up process was developed: cell disruption with a pilot-scale bead mill, isoelectric precipitation, aqueous two-phase fractionation and ultrafiltration. In the end of the process a 4.1 purity and a 54% global yield of β -phycoerythrin were achieved. Esmanhoto and Kilikian (2004) studied the extraction of the red colorants, rubropunctamin and monascorubramin, red colorants produced from submerged culture of *Monascus purpureus* using ATPS composed of PEG and phosphate. Different conditions, such as PEG type, PEG percentage, pH and phosphate concentration, were studied. The

highest partition coefficient values were obtained in the condition with PEG 6000 at 20%, 15% phosphate and pH varying from 7.0 to 9.0. The natural dye carmine partitioning was studied by Mageste *et al.*, (2009) employing aqueous two-phase systems prepared by mixing aqueous solutions of polymer (Poly(ethylene oxide) – PEO) or copolymer (L35) with aqueous salt solutions (Na_2SO_4 and Li_2SO_4). The experiments were carried out as a function of polymer molar mass, pH, hydrophobicity, system tie-line length and nature of the electrolyte. The authors observed that the partition of carmine dye was dependent not only on the electrolyte nature but also on the pH of the system; and it was achieved a partition coefficient of 300 in the best conditions, which is significantly high, demonstrating the potential of this technique to recover carmine dyes. The results of partition with the salt Li_2SO_4 was better than the ones achieved with Na_2SO_4 . Carmine molecules were concentrated in the polymer-rich phase. The authors used statistical tools to optimize the process; the variables analyzed were concentration of Li_2SO_4 and PEO 1500 and pH under the response partition coefficient of carmine. The maximum partition coefficient of carmine was obtained with PEO and sulfate concentrations equal to 28.16% and 11.57%, respectively, and the parameter that had the highest influence on the carmine partition to the top phase was the PEO concentration. Ventura *et al.*, (2013) evaluated the recovery of red natural colorants from the fermented broth of *Penicillium purpurogenum* employing aqueous two-phase systems based on ionic liquid, specifically imidazolium and quaternary ammonium using a potassium citrate buffer, as the salt component. In order to achieve optimum conditions, the authors used different pH, chemical structure and concentrations of liquid ionics and salt. The systems $[\text{N2,2,2,2}]\text{Br}$ -based ATPS promoted a higher capacity of isolating the colorants from the proteins. Moreover, it was observed that the red colorants partitioning is favored using short tie-lines and higher pH. The authors achieved 24.4 ± 2.3 partition coefficients, $60.7 \pm 2.8\%$ protein removal, leading to selectivity in terms of protein ($S_{\text{red}}/\text{prot}$) equal to 10.05.

Some viruses were also extracted through phase separations with polyethylene glycol (PEG) (Aboud *et al.*, 1982; Lewis and Metcalf 1988; Smith *et al.*, 2008; Tsoka *et al.*, 2000), ammonium sulfate (Maranga *et al.*, 2002) or calcium phosphate (Vicente *et al.*, 2011; Morling and Russell 1995). Guo *et al.*, (2012) used aqueous two-phase method (ATPs) with the ability to extract AAV serotype 8 from lysed cells

as a single process, providing a partial purified AAV. This method involved four steps: PEG8000 precipitation, chloroform treatment, PEG/(NH₄)₂SO₄ aqueous two phase extraction and final dialysis. The best condition for ATPs to purify the AAV8 was 10% PEG8000–13.2% (NH₄)₂SO₄ at pH 8.0; it yielded a 97.8% purity, being even higher than conventional CsCl gradient, and showed no toxicity in mouse embryos during infection *in vivo*. The recovery of B19 virus-like particles using ATPS was studied by Luechau *et al.*, (2011). Firstly, a process was designed to recover B19 particles from the bottom phase of a PEG 1000-magnesium sulfate system, while removing cell debris and 31% of total protein in the top, interface and sediment phases. With regard to the analysis of VP1 and VP2 capsid proteins after extraction, the yield of B19 particles in the bottom phase was 92.8% or 85.7%, respectively. In an alternative process, B19 particles were recovered from a clarified cell disruptate by interfacial partition. Concerning VP1 and VP2 proteins, 95.3% or 33.2%, respectively, were recovered in the interface of a PEG 1000-magnesium sulfate system.

pDNA as well as RNA recovery was also studied by using ATPS. Rahimpour *et al.*, (2006) presented two different aqueous two-phase systems to be optimal for plasmid yield recovery (100% pDNA and 32% RNA) and one for RNA depletion (78% pDNA and 23% RNA), both using PEG 400-citrate ATPS systems. However, a better separation of pDNA and RNA (83%) was achieved by Wiendahl *et al.*, (2012) using PEG-PO₄ system and genetic algorithms.

4.2. Liquid-Liquid Extraction in Micelle Systems

ATPMS, formed by surfactants at certain conditions, have been proposed as an attractive option to be used in bioseparations (Kamei *et al.*, 1998). In these systems, an aqueous surfactant solution, under the appropriate solution conditions, spontaneously separates into two predominantly aqueous, yet immiscible, liquid phases, one of which has a greater concentration of micelles than the other (Liu *et al.*, 1996). The difference between the physicochemical environments in the micelle-rich phase and in the micelle-poor phase forms the basis of an effective separation, and makes aqueous two-phase micellar systems a convenient and potentially useful method for the separation, purification, and concentration of biomaterials (Liu *et al.*, 1996; Lopes *et al.*, 2008). Compared to other separation techniques, ATPMS shows advantages when handling labile substances or when distillation is impossible for economic reasons or product properties (Dreyer and Kragl 2008).

The ATPMS has been widely and successfully used in the extraction and purification of biomolecules, such as proteins, viruses, antibiotics; as target protein extraction from unclarified microorganism culture; large-scale separation of proteins; DNA and nucleic acids; optimized membrane solubilization and partitioning of tagged and genetically engineered proteins and enzymes (Lam *et al.*, 2005; Dias *et al.*, 2000; Everberg *et al.*, 2006; Selber *et al.*, 2002; Mazzola *et al.*, 2006; Lopes *et al.*, 2011; Jozala *et al.*, 2012; Lopes *et al.*, 2008).

The partitioning of a biomolecule can also be made more selectively by utilizing mixed micelles consisting of charged surfactants, or of surfactant-type affinity ligands, mixed with nonionic surfactants. The extraction experiments in aqueous two-phase systems formed by oppositely charged surfactant aqueous mixtures indicate that the hydrophobic characteristic and charge interaction between a molecule partitioned and the micelles from the system are the predominant factors governing the extraction (Lee and Su 1999; Saitoh and Hinze 1995; Sivars and Tjerneld 2000; Nan *et al.* 2006). Kamei *et al.*, 2002 demonstrated that electrostatic interactions between charged proteins and oppositely charged mixed micelles can be exploited to enhance the yield and selectivity of two-phase aqueous mixed (nonionic/anionic) micellar systems (Kamei *et al.*, 2002; Kamei *et al.*, 2002).

Rangel-Yagui *et al.*, (2003) demonstrated that the use of a two-phase aqueous mixed micellar system composed of the nonionic surfactant C10E4 *n*-decyl tetra(ethylene oxide) and the cationic surfactant CnTAB (alkyltrimethylammonium bromide, $n = 8, 10, \text{ or } 12$) can improve significantly the partitioning behavior of the net-negatively charged enzyme G6PD relative to the one obtained in the two phase aqueous C10E4 micellar system. Overall, the two-phase aqueous mixed (C10E4/C10TAB) micellar system yielded the highest G6PD partition coefficient (7.7), with a 71% G6PD yield in the top phase, providing the optimal balance between the denaturing effect and the electrostatic attractions for the three cationic surfactants examined. There is a possibility to remove endotoxins present in protein solutions using ATPMS. The authors have observed that above the CMC of surfactants, endotoxins were accommodated in the micellar structure by non-polar interactions of alkyl chains of lipid A and the surfactant tail groups, and are consequently separated from the water phase (micelle-poor phase).

Research has demonstrated that the Triton X-114 phase separation was also

applied in endotoxin lipopolysaccharide removal from other recombinant protein preparations. By performing Triton X-114 phase separation, endotoxin levels in all recombinant proteins derived from *E. coli* were reduced by as much as 99% of the original amount (Aida and Pabst 1990; Magalhães *et al.*, 2007).

The partitioning behavior of nisin in ATPMS was also investigated, and the results showed an effective separation of the biomolecule from other compounds present in the fermentation broth. The separation was attained using an ATPMS formed of Triton X-114, and the separation method was capable of extracting nisin into the micelle-rich phase, while removing the majority of the impurities to the micelle-poor phase (Jozala *et al.*, 2008).

4.3. Liquid-Liquid Extraction by Reversed Micellar Systems

The liquid–liquid extraction process by reversed micelles (RM) can be performed in one or two stages. The one-stage procedure consists only of the extraction step, by which contaminants are transferred from an aqueous solution to a reverse micellar organic phase, thus leading to purification of the target biomolecules. The two-stage procedure is comprised of a preliminary extraction step (forward extraction), by which the target protein is transferred from an aqueous solution to a reverse micellar phase, and a subsequent re-extraction step (backward extraction), by which the biomolecules are released from the reversed micelles and recovered in a fresh aqueous phase. In the former case, the purification is simpler and cheaper, and the back-extraction of the target biomolecule becomes unnecessary (Pessoa Jr and Vitolo 1998). Although the application of reversed micellar systems in biotechnological extraction/purification processes is relatively recent, its success is well documented in the literature. One of the first works describes the extraction of concanavalin A with the anionic surfactant AOT and a biological surfactant as the affinity cosurfactant (Li *et al.*, 2006). The authors' research group has been working on reversed micellar extraction for over a decade and some interesting results were obtained, especially regarding enzyme purification. In one of the first investigations, it was demonstrated the extraction of the enzyme inulinase from *K. marxianus* into a reversed micelle phase of the cationic surfactant BDBAC in isooctane/hexanol with an 87% recovery yield of and a 2.8 purification factor (Pessoa Jr and Vitolo 1998). Rodrigues and collaborators (1999) described the transfer of an extracellular xylanase from *P. janthinellum* by using reversed micellar phase of the anionic surfactant AOT and the

influence of the following factors: pH, temperature, surfactant concentration and buffer concentration. The extraction and recovery of xylanase enzymic protein were investigated with particular interest to the yield of the extraction process and to the recovery of enzymatic activity. For xylanase recovery by AOT-reversed micelles, extraction is necessary at low ionic strength of the medium. The highest enzyme recovery was around 10% which provided a 0.4 enrichment factor. The optimized conditions were: pH 6.3, 46.8°C temperature and 0.57 M AOT concentration. The experiments performed showed the enzyme recovery obtained was only around 10%, suggesting that for xylanase extraction by reversed micelles, another type of surfactant, perhaps cationic, could be more appropriate (Rodrigues *et al.*, 1999). Therefore, xylanase recovery by reversed micelles using BDBAC was evaluated under different experimental conditions and it attained a 27% recovery (Rodrigues *et al.*, 1999).

A study evaluated the effectiveness of liquid–liquid extraction by CTAB reversed micelles in purifying xylitol dehydrogenase and xylose reductase in two different phases of the micellar system, with recovery yields around 100% for both enzymes, and 1.8 and 5.6 enrichment factors, respectively (Vieira *et al.*, 2004). Xylitol dehydrogenase was also extracted from crude extracts of *C. guilliermondii* in BDBAC-reversed micelles in isooctane, by a two-step procedure, with recovery yield around 121% and 2.3 enrichment factor (Cortez *et al.*, 2004). Glucose oxidase extraction by CTAB reversed micelles from raw and centrifuged cell homogenates of *A. niger* enriched with commercial enzyme was also studied. According to this work, the highest recovery yield obtained from centrifuged homogenate (92.7%) was compared with the one obtained from raw homogenate (94.3%), thus demonstrating that cell debris removal is not necessary to obtain satisfactory extraction performances (Ferreira *et al.*, 2005).

5. Discussion

As it was shown above, there are several techniques and methods for separation and purification of biomolecules, so it is important to choose one method, or combined ones, in which the overall process cost is low and the recovery of the target biomolecule is as high as possible. In this part of the article, a comparison between the results of different biomolecule purification techniques is presented.

Regarding bromelain, it was partitioned through the use of aqueous two-phase polymeric systems, composed of poly(ethylene oxide) (PEO)–poly(propylene oxide) (PPO)– poly(ethylene oxide) (PEO) block copolymers (Rabelo *et al.*, 2004), which achieved 79.5% of enzyme activity recovery, top phase purification factor of 1.25 and enzyme activity partition coefficient of 1.4. However, the use of reverse micellar extraction (RME), Hebbar and co-workers (2008), led to slightly higher results. The activity recovery was 132% at pH 9.0, with a purification factor of 1.7-fold. At pH 8.0, the activity recovery was 106%, but the purification factor was higher: 5.2-fold, with 45% forward extraction efficiency. Even in the worst condition, at pH 10.0, the extraction was fairly better than the one found by Rabelo *et al.*, (2004) (81% activity recovery and purification factor 1.2-fold) (Hebbar *et al.*, 2008). In the same year, Babu *et al.*, attained a better result using PEG/phosphate buffer, with a bromelain activity recovery of 228% and a purification factor of 4.0 (Babu *et al.*, 2008). In another study, cation exchange chromatography promoted a purification factor of 10, with an 84.5% enzyme activity recovery (Devakate *et al.*, 2009). More traditional methods, such as ethanol precipitation in two steps, promoted a lower purification factor (1.18-2.28), but a 99.2% activity yield (Soares *et al.*, 2012). The use of combined techniques is a way of achieving better results. Coelho and co-workers (2013) purified bromelain through an unconventional ATPS which integrates fractional precipitation by ammonium sulfate. With this new technique, they obtained a purification factor of 11.80, the highest at the moment, with a 66.38% activity yield, in a system with a PEG concentration of 10.86 and 36.21% ammonium sulfate saturation.

Other example of an enzyme purified by different methods is collagenase, which is an enzyme traditionally produced by microorganisms. In this way, it takes one step to separate the target biomolecule from the cells and other steps to purify it from other contaminants presented in the fermented broth. Wu and co-workers (2010) employed the strategy of three-step procedure (ammonium sulfate precipitation, and two gel filtrations) and achieved a 31.53-fold purity with a 7.00% yield from crude extract . Liu and co-worker (2010), using a combination of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation, ion exchange chromatography and gel filtration, obtained a lower result to purification factor (20.4-fold) but a higher yield (25.2 %), when compared with the values obtained by Wu *et al.*, (2010). On the other hand, higher values to both parameters,

namely yield (67.21%) and purification factor (30.34), were obtained by Jain and Jain (2010), who used only ammonium sulphate precipitation as a purification method. Later, Baehaki and co-workers (2012), tried to combine ammonium sulphate precipitation and ion exchange chromatography in order to improve the collagenase purification, but lower results were achieved, e.g. purification factor of 26.3-fold, with a 2.6% yield from the crude extract. Moreover, liquid-liquid extraction with use of polymer (ATPS) achieved interesting results, since it is a simple and easy methodology to work with. In the best conditions, Rosso and co-workers obtained a 376.8% yield in the top-PEG phase, with a purification factor of 14.7 (Rosso *et al.*, 2012).

In regard to inulinase purification, different methods of reaching this objective can be found in the Literature, such as expanded bed of Streamline DEAE (Pessoa Jr *et al.*, 1996), liquid-liquid extraction by reversed micelles (Pessoa Jr and Vitolo 1998), ion exchange expanded bed chromatography (Kalil *et al.*, 2005), cation exchange chromatography (Kalil *et al.*, 2010), two-step approach based on precipitation with ethanol followed by ultra-filtration (Golunski *et al.*, 2011) and use of four steps: ultrafiltration, DEAE Sepharose fast flow anion exchange column chromatography (Liu *et al.*, 2012). A comparison between the results obtained in all cited methods showed that liquid-liquid extraction promoted the worst results (20.4 % enzyme activity recovery). All the other methods promoted enzyme activity recovery between 67.5 and 93%, and the ion exchange expanded bed chromatography achieved the highest purification factor, 10.4.

Xylanase is another enzyme that has been widely studied, regarding at its purification process. Cortez and Pessoa (1999) performed experiments using fractional ethanol precipitation in order to separate β -xylosidase from the xylanolytic complex and from the total protein present in the fermented medium. The results attained in such study provided 74% of β -xylosidase and 80% of total xylanase recovery. Extractive bioconversion using aqueous two-phase systems (ATPS) was studied by Costa and collaborators (1998), achieving partition coefficient (K) of 2.21. Subsequently to this study, Costa and collaborators evaluated aqueous two-phase systems (ATPS), composed of either polymer–polymer–water or polymer–salt–water, and achieved higher values. Liquid–liquid extraction based on reversed micelles (AOT surfactant) promoted a xylanase recovery around 10%, with an enrichment

factor of 0.4. Therefore, among the studies presented, ethanol precipitation showed itself to be the most suitable methodology.

Regarding other enzymes, Misset and Oppendoes were successful at obtaining pure Hexokinase from *Trypanosoma brucei* (Misset and Oppendoes 1984), while Panagiotou *et al.*, extracted xylitol dehydrogenase from *Fusarium oxysporum* with 1.6% percentage yields and a purity increase of 15-fold (Panagiotou *et al.*, 2002). Both studies have employed multi-step strategies which included salt precipitation and successive chromatography steps. Simpson and co-workers (2007) purified Glucose oxidase from *Penicillium* sp. using many steps (precipitations, ultrafiltration, anion exchange/size-exclusion chromatographics and ultrafiltration) with 10.3% yields and purification of 8.6-fold. Xylose reductase was obtained from *Cryptococcus flavus* with 29% yield and purification of 19-fold by salt precipitation, concentrations, buffer exchange and chromatographics step (Mayr *et al.*, 2003). G6PD industrial purification has been carried out through multiple-step processes based on chromatography technology (Chang *et al.*, 1995). These techniques provided recovery 98% yields and a purification factor of 12 in expanded bed ion exchange chromatography (Chang *et al.*, 1995).

Cortez and co-workers (2004a; 2004b) extracted xylitol dehydrogenase from *Candida guilliermondii* by employing aqueous micellar two-phases system with percentage yields superior to 80% and a purity increase of 2.3-fold. Oliveira *et al.*, (2003) extracted Hexokinase from *S. cerevisiae* with a purification factor of 1.6 using aqueous two-phase (PEG/citrate) systems. By improving liquid-liquid cationic reversed micelles extraction, it was possible to achieve a recovery to glucose oxidase from *Aspergillus niger* with high yield above 90% (Ferreira *et al.*, 2005) and Xylose reductase from *C. guilliermondii* with 89-130% total recovery and purity increased around 4.8-5.6-fold (Cortez *et al.*, 2004; Feitosa *et al.*, 2008). Applying aqueous two-phase system (PEG/citrate) by continuous process in perforated rotating disc Ascorbate oxidase from *Cucurbita maxima* was pre-purified with partition coefficient (3.35), separation efficiency (54.98%) and purification factor (1.46). This could be increased to 2.49 (Porto *et al.*, 2010). A system composed of PEG/phosphate, was able to recover 97.7% from yeast cell homogenate and partially purified G6PD, increasing purity by 2.28-fold (Ribeiro *et al.*, 2007). Another system, composed of reverse micelles, was able to recover 148.21% of G6PD activity

(indicating interferences removal) and presented a purification factor of 5.28.

Clavulanic acid is an antibiotic traditionally recovered by chromatography methods, which result in loss of the biomolecule during the process. Aqueous two-phase system was first used by Videira and Aires-Barros (1994) to extract clavulanic acid. In this study, the authors used a system composed of PEG/potassium phosphate and achieved partition coefficients ranging from 1.5 to 114 and 75% recoveries. Silva *et al.*, (2009) evaluated a similar system used by Videira and Aires-Barros (1994), attaining a 100% yield and a 1.5-fold purification factor. Later on, the same authors, Silva *et al.*, (2012), studied the strategy of combined methods: firstly, ATPS composed of PEG/potassium phosphate followed by an ion-exchange adsorption. As a result, a concentration factor of 2 and 100% of purification in relation to the amino acids lysine, proline, histidine and tyrosine was achieved. Using extractive fermentation, Viana-Marques *et al.*, (2009) obtained a partition coefficient (K) of 8.2, 93% of CA yield in the PEG-rich phase (η) and 5.3 mg/L.h of productivity (P) in shaken flasks, as well as better results in bench-scale fermenter, specifically, $K = 12.8$, $\eta = 95\%$, $P = 9.6$ mg/L.h. Comparing extractive fermentation with aqueous two-phase system (ATPS) composed of PEG/NaPA, similar results were obtained, since Pereira *et al.*, (2012) obtained $K = 11.91 \pm 2.08$ with the second methodology.

However, liquid-liquid extraction by micellar systems (ATPMS) did not promote similar results to the ATPS ones. Santos *et al.*, (2011) employed mixed micellar systems composed of Triton X-114 and AOT, achieving $K = 1.48$ and 86.3 recovery in the micelle-rich phase. Andrade *et al.*, (2011) employed the surfactants $C_{10}E_4$ and DDAO, with a 52% recovery and removal of 70% of the contaminant proteins. Further investigation was led by Haga *et al.*, (2013), who used $C_{10}E_4$ with the addition of CTAB or AOT surfactants. In these systems, a decrease in the partition coefficient (K) value was achieved: 0.87 ± 0.03 , for the mixed micellar systems. $K = 1.44 \pm 0.02$ was obtained with CTAB/ $C_{10}E_4$, while $K = 0.78 \pm 0.30$ was observed with AOT/ $C_{10}E_4$. The second results are in accordance with the ones achieved by Santos *et al.*, (2011).

Another antibiotic studied by different methods is tetracycline. Pereira and co-authors (2013) compared the conventional PEG/ Na_2SO_4 and $[Ch]Cl/K_3PO_4$ ATPS with ATPS composed of PEG/cholinium-based salts, e.g. liquid ionics. Both systems were efficient in extracting tetracycline from the fermented broth; however, the

second one promoted extraction efficiencies higher than 80%. The authors observed that not only the nature of liquid is ionic, but also the pH of the medium had a significant influence to the partition of tetracycline and the phase in which the target biomolecule was recovered due to the cholinium-based salt used.

The process of colorants purification, such as B-phycoerythrin, was also evaluated using different methods. The primary recovery of phycoerythrin from *P. cruentum* fermented broth employing ATPS was first evaluated by Benavides and Rito-Palomares (2004). In this first work, the authors obtained a purity of 2.9 and 77.0% yield. As a sequence to the study mentioned, Benavides and Rito-Palomares (2004) studied the recovery of B-phycoerythrin in two steps: application of sonication to disrupt the cell followed by a primary recovery employing ATPS. The purity of B-phycoerythrin increased up to 4.0 times after the two-step method. Recently, Ruiz-Ruiz *et al.*, (2013) developed the following scale-up process: cell disruption with a pilot-scale bead mill, isoelectric precipitation, aqueous two-phase fractionation and ultrafiltration. In the end of the process, a purity of 4.1 and 54% global yield B-phycoerythrin were achieved.

The purification of other colorants has been studied in the Literature. Esmanhoto *et al.*, (2004) studied the extraction of red colorants rubropunctamin and monascorubramin produced from submerged culture of *Monascus purpureus* using ATPS composed of PEG/phosphate, attaining $K = 113$. The natural dye carmine partitioning was studied by Mageste *et al.*, (2009) with the use of ATPS prepared through the mixture of aqueous solutions of polymer PEO or copolymer (L35) with aqueous salt solutions (Na_2SO_4 and Li_2SO_4). A partition coefficient of 300 was achieved, which is significantly high to demonstrate the potential of this technique to the recovery of carmine dyes. Ventura *et al.*, (2013) evaluated the recovery of red natural colorants from the fermented broth of *Penicillium purpurogenum* employing ATPS based on ionic liquid, specifically imidazolium and quaternary ammonium, using a potassium citrate buffer, as the salt component. The systems $[\text{N2,2,2,2}]\text{Br}$ -based ATPS promoted a higher capacity to isolate the colorants from the proteins. The authors achieved partition coefficients of 24.4 ± 2.3 , protein removal of $60.7 \pm 2.8 \%$, leading to a selectivity in terms of protein ($S_{\text{red}}/\text{prot}$) of $= 10.05$.

In this case of addition of inorganic salts in ATPMS, Lopes *et al.*, (Data not published) studied G6PD partitioning in the system without salt, at 19.7°C , which

resulted in $K_{G6PD} = 0.25$. However, the addition of NaCl and Li_2SO_4 promoted an increase in K_{G6PD} , which means that the enzyme partitioned comparatively less than in the dilute phase (micelle-poor phase). The experiments with 0.5 M NaCl and 0.2 M Li_2SO_4 at 13.85°C showed similar results with $K_{G6PD} \sim 0.46$. The lowest partition coefficient was obtained in the presence of 0.5 M KI at 23.40°C ($K_{G6PD} = 0.12$), with major recovery of the enzyme in one of the phases (micelle-diluted, %Recovery = 90%). Initially, we were expecting similar K_{G6PD} results in the presence of 0.5 M KI, 0.5 M NaCl and 0.2 M Li_2SO_4 , since both excluded-volume parameter and initial surfactant concentration were similar in all cases. The significant difference observed for KI might be related to an error in cloud point values for the higher concentrations of $C_{10}E_4$ in the presence of KI. If we overestimated a little T_{CLOUD} in the presence of KI, the excluded-volume of the experimental partitioning condition would be much higher, and R would be lower, as observed. Nonetheless, the addition of salts may be useful to attain desired partitioning conditions at more extreme temperatures, while keeping excluded-volume effect constant.

Jozala *et al.*, (2012) studied the addition of salts in Triton X-114 ATPMS in order to investigate nisin partitioning behavior. In the presence of only buffer, partition coefficient (K) values were around 3. In the presence of $MgSO_4$ and $(NH_4)_2SO_4$, nisin showed K values of 5.6 and 5.4, respectively. Thus, the addition of salts in aqueous solutions containing $C_{10}E_4$ seems to influence only the coexistence curve of the system, with no major change in G6PD partitioning behavior. For a less hydrophilic and/or smaller protein, perhaps more significant changes in partition coefficient could be observed. Nonetheless, the addition of salts can be an interesting artifact when purifying proteins in ATPMS, since it allows us to vary the temperature while keeping excluded-volume effect constant. This might be important for very thermo-sensitive and very thermo-resistant target proteins. In the first case, a chaotropic ion should be employed, in order to lower T_{CLOUD} and favor the target protein stability. In the second and perhaps more interesting case, a kosmotropic ion might be used to increase T_{CLOUD} and, consequently, the chances of denaturing contaminant proteins that would, then, be removed in the micelle-rich phase.

On the other hand, in order to remove contaminants, such as LPS, several purification methods have been developed, such as ultrafiltration (Yamamoto and Kim 1996; Jang *et al.* 2009), anion exchange chromatography (Chen *et al.*, 2009),

cation exchange chromatography (Kunioka and Choi 1995; Morimoto *et al.* 1995), affinity resins (Lowe *et al.*, 2011), histidine (Matsumae *et al.*, 1990), two phase micellar extraction (Liu *et al.*, 1996; Nikas *et al.*, 1992), and Polymyxin B (Birger Anspach *et al.*, 1995; Karplus *et al.*, 1987). Ion exchange chromatography uses the ability of charge titration to separate LPS from the protein of interest. Histidine and other affinity resins can also nonspecifically bind the LPS. Ultrafiltration does not scale well, due to relatively low flow rates, and often leads to large product loss. Polymyxin B is also not suitable for products destined for intravenous use, because the antibiotic is physiologically active in humans (Damais *et al.*, 1987). Every protein presents different problems during purification and endotoxin removal, but Lowe *et al.*, (2012) developed a general method that worked well in endotoxin reduction for several 6x-His-tagged proteins, even using the C41DE3 *E. coli* strain, which has an unusually thick cell wall and LPS layer (Chen 2009). The authors found that pretreatment with deoxycholic acid and Triton-114, prior to loading onto the first affinity column, greatly reduce the endotoxin load of the protein preparation. Additionally, using a similar wash while the protein is bound to an immobilized metal affinity chromatography (IMAC) column eliminates most of the endotoxin, and levels can be reduced to below the limit of detection on an anion exchange chromatography (AXC) column.

Recent developments in the field of pDNA vaccine research include an improved method for pDNA purification through the use of a pre-column removal of impurities by selective metal cation-induced precipitation (Ongkudon and Danquah 2011). It has been found that addition of CaCl_2 into the bacterial cell lysate can be used to selectively precipitate RNA from plasmid DNA but, at a reasonably high concentration, thus making it economically unattractive (Eon-Duval *et al.*, 2003). Furthermore, an additional purification stage, such as chromatographic removal, needs to be integrated to remove a small proportion of unprecipitated RNA (Eon-Duval *et al.*, 2003). Endotoxins also demonstrate better interaction with free metal ions than pDNA, suggesting that there is a huge potential for selective removal of endotoxins using metal ions to be integrated into a commercial pDNA production line (Ongkudon and Danquah 2011). One of the major concerns on cation-induced pDNA purification is the binding of cations on pDNA molecules, which could affect its yield as well as its biological functionality. A study, however, has found that treatment with

EDTA could potentially resolubilise pDNA back into its native form, hence leading to high yield and enhancing further downstream processes (Tan *et al.*, 2007).

The study led by Ongkudon and Danquah (2011) concluded that selective endotoxin removal can conveniently be carried out at a pH condition similar to that of alkaline-lysed cell lysate and at a low ZnSO₄ concentration. It was also reported that this method provided ease of subsequent plasmid DNA purification. Due to protein-endotoxin interactions, endotoxin removal from protein solutions requires techniques that result in strong interactions with endotoxin, such as affinity chromatography, which has proven to be one of the most effective methods (Sakata *et al.*, 2011; Anspach 2001; Li *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2007); however, this method is not highly reproducible and may be followed by a significant loss of the product being purified. In addition, the adsorption capacity of adsorbents is generally low (Lee *et al.*, 2003). Ion-exchange chromatography has also been widely used because of its low running cost, when compared to affinity chromatography, in addition to being easy to scale-up; however, significant ionic interactions may be present between the protein and the resin, or the endotoxin and the protein.

In addition, previous studies regarding large-scale purification have shown that Triton X-114 phase separation can also be applied for removal of higher concentrations of LPS from large-scale protein purification (Lopes *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 1997; Aida and Pabst 1990; Reichelt *et al.*, 2006; Cotten *et al.*, 1994; Adam *et al.*, 1995; Jensen *et al.*, 2008; Rozkov *et al.*, 2008; Lopes *et al.*, 2011; Lopes *et al.*, 2010). However, the low concentration obtained and the thermal sensitivity of target proteins brings difficulties to the industrial purification of biomolecules, which usually involves high cost techniques. Lopes *et al.*, (2011) employed ATPMS to remove LPS from preparations, which contained recombinant proteins of pharmaceutical interest. The mass balance results were of approximately 100%. The recovery of the target protein for the dilute phase ended in approximately 100%. In the condition with 4.0% (wt/wt) TX-114/buffer to 60.0°C, the partition coefficient for pure GFPuv (KGFPuv=13.85) was lower than for cell homogenate (KGFPuv=15.00). A purification factor (FP) of 10 times the target biomolecule was obtained. The removal of LPS in a single purification step to safe levels is extremely difficult, due to the complex chemical composition of these molecules.

Mercaldi *et al.*, (2008) successfully employed ATPMS containing Triton X-114 for

LPS removal and hydrophobic proteins. Results showed a reduction of more than 90% of LPS, with final LPS concentration of 44.00 EU/mL in the product. Cheng *et al.*, (2008) showed that removing LPS by adding 1% Triton X-114 to the SP-Sepharose column washing buffer could reduce the final LPS level of purified hG31P protein (human G31P) from 13,500 EU/mg to 54.00 EU/mg. Rozkov *et al.*, (2008) also reported the use of Triton X-114 to remove LPS from preparations containing plasmids expressed in cell cultures; these authors achieved 95% of LPS removal with two cycles and 99% with three extraction cycles. According to Schädlich *et al.*, (2009), LPS concentration per mg/L could be reduced by additional 99% to 15.00 EU (and 8.00 EU after two extraction cycles). In addition, 86% of L1ΔN10 protein (vaccine against HPV infection) was recovered after one extraction using TX-114 and 83% of the protein in the second one. In order to reduce LPS molecules to a tolerable limit, the ATPMS should be integrated, for instance, by using an affinity chromatography process. This process could ensure high-resolution removal of reminisce.

Regarding the purification of other bioparticles, virus particles can be purified using current chromatography types also available for large-scale purification (e.g. γ -retrovirus, lentivirus, adenovirus, adeno-associated virus, herpes simplex virus, baculovirus and poxvirus vectors) and the old CsCl gradient method. Meanwhile, there are some techniques of interest to the field, used in partitioning of bioparticles: ATPS and high-performance tangential flow filtration. Most fractionation procedures begin with differential centrifugation at increasingly higher speeds, also called differential-velocity centrifugation. Differential centrifugation does not yield totally pure organelle fractions. One method for further purifying fractions is equilibrium density-gradient centrifugation, which separates cellular components according to their density (Lodish *et al.*, 2000) .

Koplove (1994) developed a purification process for the removal of Factor VIII of all cell-culture residues. First, the cells are separated by filtration through physical characteristics. Second, the author used chromatography techniques (immunoaffinity and ion-exchange) only for the purification of protein. Some works found in literature also studied the isolation of cells by the enzyme combination (pronase-chymopapain, collagenase-elastase) method. The yield value was around 10%. When these techniques are used together with chromatography techniques, the yield increases to

70%. (Schulman *et al.*, 1982).

Basically, cells may be purified from culture medium by filtration and centrifugation processes. Nevertheless, a process suitable for large-scale extraction of β -galactosidase from a suspension of disintegrated *E. coli* cells has been observed by Veide *et al.*, (1983). In ATPS composed of PEG 6000 and potassium phosphate, all cell debris and the major part of the proteins and nucleic acids were partitioned to salt phase and the β -galactosidase was recovered in the PEG rich phase.

In general, several kinds of viruses are purified by conventional techniques, i.e., by performing one round of centrifugation through CsCl gradient. This is enough, although it is a time consuming procedure that requires approximately 36 h (Volpers and Kochanek 2004; Duffy *et al.*, 2005; Tollefson *et al.*, 2007; Peng *et al.*, 2006). Armendáriz-Borunda *et al.*, (2011) studied the purification of Adenovirus (AAV) through the techniques described above, observing that a total time of 10 h was required to purify 100 adenovirus culture plates. There are, also, commercially available adenovirus purification kits (usually for AAV serotype 2), such as AdenoXTMM Maxi (Clontech), AdEasy™ Virus Purification Kit (Stratagene), Adenopure® (Puresyn, Inc., Malvern, PA, USA), which, in general, improve the purification time to 2–4 h, obtaining 10^{12} virus from 10 culture plates. However, sometimes, it is more advantageous to use CsCl gradient integrated with ultracentrifugation method which will use the same amount of time of 10 commercial kits (20 to 40h). This means, in some cases, the standard procedures result in saving time and resources.

According to Guo *et al.*, (2012), commercial purification kits are available only for AAV serotype 2, while chromatography purification methods are not indicated for a variety of AAV serotypes and ultracentrifugation is time consuming and requires high-cost equipment. Some viruses can be extracted through phase separations with polyethylene glycol (PEG) (Aboud *et al.*, 1982; Tsoka *et al.*, 2000), ammonium sulfate (Maranga *et al.*, 2002) or calcium phosphate (Morling and Russell 1995; T. Vicente *et al.*, 2011).

For this reason, Guo *et al.*, (2012) used ATPS to extract AAV serotype 8 from lysed cells as a single process, providing a partial purified AAV. Multiple steps to purify AAV were: PEG8000 precipitation, chloroform treatment, PEG/(NH₄)₂SO₄ aqueous two-phase extraction and final dialysis. The best condition yielded a purity of

97.8 %, which is even higher than the one obtained through conventional CsCl gradient.

In the AAV9 purification, polyethylene glycol was also used. The resin AAV9 binding capacity increased more than 5-fold when PEG was included in the chromatography buffers. PEG-modulated chromatography is provided to be used in purification processes for other AAV serotypes, once it significantly reduces the cost for purification of the large amounts of vectors required for clinical product development. (Zhou *et al.*, 2011).

Rubella virus concentration and purification using ion-exchange chromatography (IEC) with monolithic support was applied by Forcic (2011). Viral yield was between 77–100% and concentration factors were in a range of 10 and 20. Samples that contained the highest viral concentrations, free from host cell protein and DNA, showed yields and concentration factors of 95% and 36x and 98% and 38x in the maximum load volumes applied: 410 and 530 mL, respectively. Equivalent results were also obtained in studies on tomato mosaic virus and rotaviruses (Kramberger *et al.*, 2007; Gutiérrez-Aguirre *et al.*, 2009).

In addition, a cellulose sulfate column was utilized in affinity chromatography for the effective purification and concentration of VLPs and live vaccine antigens of West Nile Virus (WNV). The best result indicates that 196 µg of the viral antigens were recovered from 60mL with high yields between 93 and 96%. (Ohtaki *et al.*, 2011).

Compared to systems composed by two viral particles with different physical and chemical characteristics, the technique of high-performance tangential flow filtration (HPTFF) is interesting. The rational method carried out by van Reis *et al.*, (1997) can be used as a requirement for HPTFF of viruses or VLPs. High-performance tangential flow filtration (HPTFF) employs charged ultrafiltration membranes that promote selectivity for protein–protein separations, and consequently of particles with different properties. Lentivirus from baculovirus transduction (Lesch *et al.*, 2008) and AAVs produced in insect cells by baculovirus infection (Merten *et al.*, 2005) are some kinds of virus particles in which the application of this approach might outperform the current purification procedures (Vicente *et al.*, 2010).

Purification of VLPs is currently performed with a wide variety of purification techniques, such as centrifugation (Kuiper *et al.*, 2002; Tsoka *et al.*, 2000), extraction without dissolution (Andrews *et al.*, 1995; Kitano *et al.*, 1987), and chromatography

(Kuiper *et al.*, 2002; Tsoka *et al.*, 2000) that are used in a large range of separation operations. Direct VLP isolation by particle–particle separation would reduce the number of process steps and might thus lower the downstream processing costs (Hee *et al.*, 2006).

Huhti *et al.*, (2010), studied Noroviruses virus-like particles (NoV VLPs) purification by conventional concentration methods and compared each one in terms of yield, purity, morphological integrity, antigenicity and functionality. It was verified that there are limitations in Noroviruses (NoV VLP) production in terms of inadequate yield and quality of the VLPs (Ausar *et al.*, 2006; Belliot *et al.*, 2001; X Jiang *et al.*, 1992; M. Tan *et al.*, 2004), even though studies on rotavirus-like particles demonstrated a low yield and impurities resulting from CsCl gradient purification (Peixoto *et al.*, 2007). The results showed that NoV VLPs purified twice by sucrose density gradient centrifugation followed by ultrafiltration maintain their structure and their capacity to bind to antigens. Moreover, a yield of up to 2–3 mg of VLPs obtained in the present work is remarkably high when compared to other reports [3–400 µg, 4–0.6 mg] (Huhti *et al.*, 2010).

Three methods of NoV VLPs purification were compared by Koho *et al.*, 2012: PEG precipitation, CsCl gradient ultracentrifugation method and anion exchange chromatography. Higher VLP concentrations were obtained using the CsCl gradient ultracentrifugation method, as compared with anion exchange chromatography. The best result was observed using a two-step purification method based on PEG precipitation and a subsequent anion exchange chromatography step with high purity (>95%); a yield of 10 mg of VP1 protein and the purification protocol can easily be performed within one working day (Koho *et al.*, 2012).

CsCl purification method causes several impurities at the end of the process and aggregation of VLPs during storage (Burova and Ioffe 2005). In sum, residual PEG, which exceeds the dialysis membrane, might interfere with further applications of the VLPs (Russell *et al.*, 2007). Due to these problems, traditional concentration techniques (CsCl and sucrose gradients) and PEG precipitation shall be used together with other improved purification methods. This integration of purification techniques led to concentration of VLPs in the COS-1 cells supernatant at 50–500 times by PEG precipitation, ultracentrifugation, Stirred Cell, and Pellicon 2 ultrafiltration systems (it is a pressurized tangential flow filtration system) (Russell *et*

al., 2007; Huhti *et al.*, 2010).

The recovery of B19 virus-like particles using ATPS was studied by Luechau *et al.*, (2011), where the yield of B19 particles in the bottom phase was 92.8% or 85.7%, respectively. In an alternative process, B19 particles were recovered from a clarified cell disruptate by interfacial partition. Concerning VP1 and VP2 proteins, 95.3% or 33.2%, respectively, were recovered in the interface of a PEG 1000-magnesium sulfate system (Luechau *et al.*, 2011).

Ebrahimpour *et al.*, (2010), used a chromatographic process of stable expanded beds which enables (Anspach *et al.*, 1999) plasmid DNA isoforms such as supercoiled (sc) or open circular (oc) to be recovered directly from lysate with cell debris and key impurities such as chromosomal DNA, RNA, proteins and endotoxins, without the need for prior removal of suspended solids. He achieved 73.1% sc and 15.4% oc recoveries. The growth to full potential of applications for expanded bed technology in bioproduct recovery may be considered to be currently limited by the availability of suitable adsorbents and columns in terms of efficiency and cost (Oelmeier *et al.*, 2011).

It was shown that a good separation of gDNA and proteins can be achieved using a combination of alkaline lysis and ATPS for the extraction of pDNA. The most challenging separation task seems to be the separation of pDNA from RNA (Frerix *et al.*, 2005). Although Rahimpour *et al.*, (2006), presented two different phase systems to be optimal for plasmid yield recovery (100% pDNA and 32% RNA) and one for RNA depletion (78% pDNA and 23% RNA), both using PEG 400-citrate ATPS systems, the best phase yield differences between pDNA and RNA were of 83%, achieved by Wiendahl *et al.*, (2012), using PEG-PO₄ system and the genetic algorithms.

In contrast to labor and time consuming chromatographic techniques, particulate adsorbents are a very promising alternative for rapid isolation of plasmid DNA from bacteria (Paril *et al.*, 2009). To date, cationic micro- and nanoparticle-based adsorbents with high binding capacity towards plasmid DNA have been developed (Chiang *et al.*, 2005; Paril *et al.*, 2009). However, such cationic adsorbents are intrinsically low-selective and readily adsorb other forms of nucleic acids along with plasmid DNA. Shakhmaeva *et al.*, (2011), proposed an effective method of purifying supercoiled plasmid DNA from contaminating nucleic acids using water suspension of

nanosized, negatively charged multi-layered CNTs (carbon nanotubes). The method is suitable for fine purification of supercoiled plasmid DNA preparations after chromatographic or particle-based isolation.

One of the promising applications of interactions between CNTs and nucleic acids is the separation of nucleic acids based on their conformations. This biotechnological problem particularly covers large-scale isolation of plasmid DNA for gene therapy and vaccination (Ferreira *et al.*, 2005). Plasmid DNA produced by bacteria and some eukaryotes has compact supercoiled structure which considerably differs from that of other forms of nucleic acids, e.g. chromosomal DNA and RNAs. These latter forms are immunogenic and therefore their removal is a prerequisite step in preparing pharmacologically pure plasmid DNA for clinical applications (Ferreira *et al.*, 2005; Stadler *et al.*, 2004).

All the results showed that there are several ways to purify different molecules. Most of the multi-step processes demonstrated an almost pure final product but with low recovery. Chromatography was the technique that presented the best recovery and purity relationship, however, this process requires expensive equipment and consumables (chromatography resin) which may impose an economic barrier to its application. On the other hand, the methodologies based in liquid-liquid extraction can result in high yield and purification factors. Thus, before choosing a method to purify a molecule it is vital to analyze the benefits and disadvantages of each one.

6. Conclusion

The potential of purification processes has been studied during a long time and each one has its value. The mechanism of partitioning is complex and relates on knowledge of some physicochemical characteristics of both the purification system and the product/particle of interest. In this review, the importance of some standard, simple and robust techniques of separation for recovery of biological products and particles was highlighted. As it could be noticed, for the majority of biomolecules and particles the separation purity increases when two, three or more combined purification techniques are used. Chromatographic methods still remain the most efficient, however, with different support types. New extraction methods, as aqueous two-phase systems (ATPS) of polyethylene glycol (PEG)-based salts and cholinium, i.e., liquid ionics; micellar aqueous two-phase systems (ATPMS) using solvents and

surfactants; extractive fermentation with ATPS are relevant for both their cost-effectiveness and time-saving of the purification process. We can conclude that aqueous two-phase system (ATPS) is an attractive technique to be used as the initial separation step of biomolecules and bioparticles, for it has presented high recovery yields (around 70-200%) and even adequate purification factors (nearly 1.5 to 5.0), which could be improved with subsequent high resolution steps. For this reason, all data presented in this work is considered to be a relevant contribution to facilitate the establishment of some purification process at commercial scale.

7. Acknowledgements

This work was supported by FAPESP (São Paulo State Research Foundation, Brazil), CAPES (National Council for the Improvement of Higher Education, Brazil) and CNPq (National Council for Scientific and Technological Development, Brazil). We would like to acknowledge the English revision of Flavius Chitto in our manuscript.

8. References

- Aboud, M., Marina Wolfson, Yehudith Hassan, and M. Huleihel (1982). Rapid Purification of Extracellular and Intraeellular Moloney Murine Leukemia Virus. *Archives of virology*, 195, 185–195.
- Adam, O, A Vercellone, F Paul, PF Monsan, and G Puzo (1995). A Nondegradative Route for the Removal of Endotoxin from Exopolysaccharides. *Analytical biochemistry*, 225, 321–327.
- Aida, Y. and Pabst, M.J. (1990). Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114. *Journal of immunological methods*, 132(2), 191–5.
- Aldington, S. and Bonnerjea, J. (2007). Scale-up of monoclonal antibody purification processes. *Journal of Chromatography B*, 848(1), 64–78.
- Andrade, E. G., Silva, M.S.C., Haga, R.B., Santos, V.C., Pessoa Jr, A. and Rangel-Yagui, C.O. (2011). Extraction of clavulanic acid using aqueous two-phase micellar system. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 58(2), 103–108.
- Andrews, B., Huang, R. and Asenjo, J., (1995). Purification of virus like particles from yeast cells using aqueous two-phase systems. *Bioseparation*, 5(2), 105–12.
- Anspach, F.B., (2001). Endotoxin removal by affinity sorbents. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 49(1-3), 665–81.
- Anspach, F.B., Curbelo D., Hartmann R., Garke G., and Deckwer W.D., (1999). Expanded-bed chromatography in primary protein purification. *Journal of chromatography. A*, 865(1-2), 129–44.
- Armendáriz-Borunda, J., Bastidas-Ramírez, B.E., Sandoval-Rodríguez A., González-Cuevas, J, Gómez-Meda, B., and García-Bañuelos, J., (2011). Production of first generation adenoviral vectors for preclinical protocols: amplification, purification

- and functional titration. *Journal of bioscience and bioengineering*, 112(5), 415–21.
- Ausar, S.F., Foubert T.R., Hudson M.H., Vedvick T.S., and Middaugh C.R., (2006). Conformational stability and disassembly of Norwalk virus-like particles. Effect of pH and temperature. *Journal of Biological Chemistry*, 281(28), 19478–88.
- Babu, B.R., Rastogi, N.K. and Raghavarao, K.S.M.S., (2008). Liquid–liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase system. *Chemical engineering and processing*, 47, 83–89.
- Baehaki, A., Suhartono, M.T., Syah, D., Sitanggang, A.B., Setyahadi, S. and Meinhardt F., (2012). Purification and characterization of collagenase from *Bacillus licheniformis* F11.4. *African journal of microbiology research*, 6(10), 2373–2379.
- Belliot, L, Jacqueline S.N, Jin-fen, L., Seto, Y., Humphrey, C.D., Ando, T., Glass, R.I. and Monroe, S.S., (2001). Characterization of Capsid Genes , Expressed in the Baculovirus System , of Three New Genetically Distinct Strains of Norwalk-Like Viruses. *Journal of clinical microbiology*, 39(12), 4288–4295.
- Benavides, J. and Rito-Palomares, M., (2004). Bioprocess intensification: a potential aqueous two-phase process for the primary recovery of B-phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*. *Journal of Chromatography B*, 807(1), 33–8.
- Benavides, J. and Rito-Palomares, M., (2006). Simplified two-stage method to B-phycoerythrin recovery from *Porphyridium cruentum*. *Journal of Chromatography B*, 844(1), 39–44.
- Anspach, B.F., Spille, H. and Rinas, U., (1995). Purification of recombinant human basic fibroblast growth factor: stability of selective sorbents under cleaning in place conditions. *Journal of Chromatography A*, 711(1), 129–139.
- Bollag, D., Rozycki, M. and Edelstein, S. eds., (1996). *Protein Methods* 2^o ed., John Wiley and Sons.
- Brugger, R.R., Marti, A.R., Meyer, V.R and Arm, H., (1988). Optical resolution of samples with weak interactions on chiral “brush-type” liquid chromatographic stationary phases. *Journal of Chromatography*, 440, 191–201.
- Bryant, C.H., A.E. Adam, D.R. Taylor, and Rowe, R.C., (1994). A Review of Expert Systems for Chromatography. *Analytica chimica acta*, 297(3), 317–347.
- Burova, E. and Ioffe, E., (2005). Chromatographic purification of recombinant adenoviral and adeno-associated viral vectors: methods and implications. *Gene therapy*, 12, 5–17.
- Chang, Y.K., McCreath, G.E. and Chaset, H. A, (1995). Development of an expanded bed technique for an affinity purification of G6PDH from unclarified yeast cell homogenates. *Biotechnology and bioengineering*, 48(4), 355–66.
- Chen, R., (2009). *Increasing Inclusion Body Extractability And Recoverability By Altering Fermentation Conditions In High Cell Density Escherichia Coli Cultures*. Cornell University.
- Chen, R.H., Chung-Jr, H., Newton, B.S. Ritter, G., Old, L.J., and Batt, C.A., (2009). Factors affecting endotoxin removal from recombinant therapeutic proteins by anion exchange chromatography. *Protein expression and purification*, 64(1), 76–81.
- Cheng, H.T., Huang, K.C., Yu, H.Y., Gao, K.J., Zhao, X., Li, F., Town, J. Gordon, J.R., and Cheng, J.W., (2008). A new protocol for high-yield purification of recombinant human CXCL8((3-72))K11R/G31P expressed in *Escherichia coli*. *Protein expression and purification*, 61(1), 65–72.

- Chern, M.K., Shiah, W.J., Chen, J.J., Tsai, T.Y., Lin, H.Y., and Liu, C.W., (2009). Single-step protein purification by back flush in ion exchange chromatography. *Analytical biochemistry*, 392(2), 174–6.
- Chiang, C.L., Sung, C.S., Wu, T.F., Chen, C.Y., and Hsu, C.Y., (2005). Application of superparamagnetic nanoparticles in purification of plasmid DNA from bacterial cells. *Journal of Chromatography B*, 822(1-2), 54–60.
- Coelho, D.F., Silveira, E., Pessoa Jr, A. and Tambourgi, E.B., (2013). Bromelain purification through unconventional aqueous two-phase system (PEG/ammonium sulphate). *Bioprocess and biosystems engineering*, 36(2), 185–92.
- Cortez, E.V., and Pessoa Jr, A., (1999). Xylanase and b-xylosidase separation by fractional precipitation. *Process Biochemistry*, 35, 277–283.
- Cortez, E.V., Pessoa Jr, A., Felipe, M.G.A., Roberto, I.C. and Vitolo, M., (2004). Liquid – liquid extraction of xylitol dehydrogenase from *Candida guilliermondii* homogenate by reversed micelles. *Journal of Chromatography B*, 807, 55–60.
- Cortez, E.V., Pessoa Jr, A., Felipe, M.G.A., Roberto, I.C., Vitolo, M., (2004). Optimized extraction by cetyl trimethyl ammonium bromide reversed micelles of xylose reductase and xylitol dehydrogenase from *Candida guilliermondii* homogenate. *Journal of Chromatography B*, 807, 47–54.
- Cortez, E.V., Pessoa Jr, A. and Assis, A.N., (1998). Xylanase Recovery by Ethanol and Na₂S₀₄ Precipitation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 70, 661–666.
- Costa, S.A., Pessoa Jr, A. and Roberto, I.C., (1998). Xylanase Recovery Two-Phase . System Using Experimental Design. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 70, 629–639.
- Cotten, M., Baker, A., Saltik, M., Wagner, E. and Buschle, M., (1994). Lipopolysaccharide is a frequent contaminant of plasmid DNA preparations and can be toxic to primary human cells in the presence of adenovirus. *Gene therapy*, 1, 239–246.
- Damais, C., Jupin, C., Parant, M. and Chedid L., (1987). Induction of human interleukin-1 production by polymyxin B. *Journal of immunological methods*, 101(1), 51–6.
- Dembczynski, R., Białas, W. and Jankowski, T., (2012). Partitioning of lysozyme in aqueous two-phase systems containing ethylene oxide-propylene oxide copolymer and. *Food and Bioprocess Processing*, 91, 292–302.
- Devakate, R.V., Patil, V.V., Waje, S.S. and Thorat, B.N., (2009). Purification and drying of bromelain. *Separation and purification technology*, 64(3), 259–264.
- Dias, R., Mel'nikov, S., Lindman, B. and Miguel. M.G., (2000). DNA Phase Behavior in the Presence of Oppositely Charged Surfactants. *Langmuir*, 16, 9577–9583.
- Dreyer, S. and Kragl, U., (2008). Ionic liquids for aqueous two-phase extraction and stabilization of enzymes. *Biotechnology and bioengineering*, 99(6), 1416–24.
- Duffy, A.M., O'Doherty, A.M., O'Brien, T., and Strappe P.M., (2005). Purification of adenovirus and adeno-associated virus: comparison of novel membrane-based technology to conventional techniques. *Gene therapy*, 12, S62–S72.
- Ebrahimpour, M., Jahanshahi, M. and Hosenian, A.H., (2010). Adsorption Strategy of Plasmid DNA Nanoparticulate: Preparative Purification by a Simple Custom Expanded Bed Column. *Chromatographia*, 72, 383–391.
- Eon-Duval, A., Gumbs, K. and Ellett, C., (2003). Precipitation of RNA impurities with high salt in a plasmid DNA purification process: use of experimental design to determine reaction conditions. *Biotechnology and bioengineering*, 83(5), 544–53.

- Esmanhoto, E. and Kilikian, B.V., (2004). ATPS applied to extraction of small molecules - polycetides - and simultaneous clarification of culture media with filamentous microorganisms. *Journal of Chromatography B*, 807(1), 139–43.
- Everberg, H., Leiding, T., Schi, A., Tjerneld, F., Gustavsson, N. and Schiöth, A., (2006). Efficient and non-denaturing membrane solubilization combined with enrichment of membrane protein complexes by detergent/polymer aqueous two-phase partitioning for proteome analysis. *Journal of chromatography. A*, 1122(1-2), 35–46.
- Feitosa, E., Catelam, K.T., Hasmann, F.A., Johansson, H.O., Roberto, I.C. and Pessoa Jr, A., (2008). Phase diagrams of a CTAB/organic solvent/buffer system applied to extraction of enzymes by reverse micelles. *Journal of Chromatography B*, 862(1-2), 58–63.
- Ferreira, L.F., Peffi, M.E.T., Vitolo, M. and Pessoa Jr, A., (2005). Purification of Glucose Oxidase from *Aspergillus niger* by Liquid-Liquid Cationic Reversed Micelles Extraction. *Biotechnology progress*, 21(3), 868–874.
- Forcic, D., Brgles, M., Ivancic-Jelecki, J., Santak, M., Halassy, B., Barut, M., Jug, R., Markušić, M. and Strancar, A., (2011). Concentration and purification of rubella virus using monolithic chromatographic support. *Journal of Chromatography B*, 879(13-14), 981–6.
- Freire, M.G., Pereira, J.F.B., Francisco, M., Rodríguez, H., Rebelo, L.P.N., Rogers, R.D. and Coutinho, J.A.P., (2012). Insight into the interactions that control the phase behaviour of new aqueous biphasic systems composed of polyethylene glycol polymers and ionic liquids. *Chemistry - A European Journal*, 18(6), 1831–9.
- Frerix, A, Müller, M., Kula, M.R. and Hubbuch J., (2005). Scalable recovery of plasmid DNA based on aqueous two-phase separation. *Biotechnology and applied biochemistry*, 42, 57–66.
- Golunski, S, Astolfi, S., Carniel, N., Oliveira, D., Di Luccio, M., Mazutti, M.A. and Treichel, H., (2011). Ethanol precipitation and ultrafiltration of inulinases from *Kluyveromyces marxianus*. *Separation and purification technology*, 78(3), 261–265.
- Guo, P, El-Gohary, Y., Prasad, K., Shiota, C., Xiao, X., Wiersch, J., Paredes, J., Tulachan, S. and Gittes, G.K., (2012). Rapid and simplified purification of recombinant adeno-associated virus. *Journal of virological methods*, 183, 139–146.
- Gutiérrez-Aguirre, I, Banjac, M., Steyer, A., Poljsak-Prijatelj, M., Peterka, M., Strancar, A. and Ravnikar, M. (2009). Concentrating rotaviruses from water samples using monolithic chromatographic supports. *Journal of Chromatography A*, 1216, 2700–4.
- Haga, R.B., Santos-Ebinuma, V.C., Silva, M.S.C., Pessoa Jr, A., and Rangel-Yagui, C.O., (2013). Clavulanic acid partitioning in charged aqueous two-phase micellar systems. *Separation and purification technology*, 103, 273–278.
- Hage, D S, (1999). Affinity chromatography: a review of clinical applications. *Clinical chemistry*, 45(5), 593–615. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10222345>.
- Hage, D., (1998). Affinity chromatography. In E. Katz et al., eds. *Handbook of HPLC*. New York: Marcel Dekker, 483–98.
- Hage, D., Jeanethe, S., Anguizola, A., Bi, C., Li, R., Matsuda, R., Papastavros, E., Pfau Miller, E., Vargas, J. and Zheng, X., (2012). Pharmaceutical and

- biomedical applications of affinity chromatography: recent trends and developments. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 69, 93–105.
- Hebbar, H.U., Sumana, B. and Raghavarao, K.S.M.S., (2008). Use of reverse micellar systems for the extraction and purification of bromelain from pineapple wastes. *Bioresource technology*, 99(11), 4896–902.
- Hee, P.V., Hoeben, M.A., Van Der Lans, R.G.J.M. and Van Der Wielen, L.A.M., (2006). Strategy for Selection of Methods for Separation of Bioparticles From Particle Mixtures. *Biotechnology and bioengineering*, 94(4), 681–709.
- Hermanson, G.T., Mallia, A.K. and Smith, P.K. eds., 1992. *Immobilized affinity ligand techniques* 2^o ed., Academic Press.
- Huhti, H.L., Blazevic, V., Nurminen, K., Koho, T., Hytönen, V.P. and Vesikari, T., (2010). A comparison of methods for purification and concentration of norovirus GII-4 capsid virus-like particles. *Archives of virology*, 155(11), 1855–8.
- Idiris, A, Tohda, H., Kumagai, H. and Takegawa K., (2010). Engineering of protein secretion in yeast: strategies and impact on protein production. *Applied microbiology and biotechnology*, 86(2), 403–17.
- Jain, R. and Jain, P., (2010). Production and partial characterization of collagenase of *Streptomyces exfoliatus* CFS 1068 using poultry feather. *Indian journal of experimental biology*, 48(2), 174–8.
- Jang, H., Kim, H.S., Moon, S.C., Lee, Y.R., Yu, K.Y., Lee, B.K., Youn, H.Z., (2009). Effects of protein concentration and detergent on endotoxin reduction by ultrafiltration. *BMB reports*, 42(7), 462–6.
- Jensen, L.B., Torp, A.M., Andersen, S.B., Skov, P.S., Poulsen, L.K., Knol, E.F. and van Hoffen, E., (2008). The biological activity of a recombinantly expressed (His)(6)-tagged peanut allergen (rAra h 1) is unaffected by endotoxin removal. *Journal of immunological methods*, 335(1-2), 116–20.
- Jiang, X, Wang, M., Graham, D.Y. and Estes M.K., (1992). Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *Journal of Virology*, 66(11), 6527–32.
- Jonsson, J.A. and Lovkvist, P., (1987). Determination of adsorption isotherms from chromatographic measurements, using the peak maxima method. *Journal of Chromatography*, 408, 1–7.
- Jozala, AF, Lopes, A.M., Mazzola, P.G., Magalhães, P.O., Penna, T.C.V. and Pessoa Jr, A., (2008). Liquid–liquid extraction of commercial and biosynthesized nisin by aqueous two-phase micellar systems. *Enzyme Microb Technol*, 42(2), 107–112.
- Jozala, A.F., Lopes, A.M., Novaes, L.C.L., Mazzola, P.G., Penna, T.C.V. and Pessoa Jr, A., (2012). Aqueous Two-Phase Micellar System for Nisin Extraction in the Presence of Electrolytes. *Food and Bioprocess Technology*, 1–6.
- Kalil, S.J., Silveira, S.T., Maugeri-Filho, F. and Rodrigues, M.I., (2010). Evaluation of Different Parameters for the Purification of Inulinase Using an Ion Exchange Fixed Bed. *Biotechnology and bioprocess engineering*, 15, 676–679.
- Kalil, S.J., Maugeri-Filho, F. and Rodrigues, M.I., (2005). Ion exchange expanded bed chromatography for the purification of an extracellular inulinase from *Kluyveromyces marxianus*. *Process Biochemistry*, 40(2), 581–586.
- Kallberg, K., Johansson, H.-O. and Bulow, L., (2012). Multimodal chromatography: an efficient tool in downstream processing of proteins. *Biotechnology Journal*, 7(12), 1485–95.

- Kamei, D.T., King, J.A., Wang, D.I.C. and Blankschtein, D., (2002). Separating Lysozyme From Bacteriophage P22 in Two-Phase Aqueous Micellar Systems. *Biotechnology and bioengineering*, 80(2), 233–236.
- Kamei, D.T., Liu, C.L., Haase-pettingell, C., King, J.A., Wang, D.I.C and Blankschtein, D., (2002). Understanding Viral Partitioning in Two-Phase Aqueous Nonionic Micellar Systems : 1 . Role of Attractive Interactions Between Viruses and Micelles. *Biotechnology and bioengineering*, 78(2), 190–202.
- Karplus, T.E., Ulevitch, R.J. and Wilson, C.B., (1987). A new method for reduction of endotoxin contamination from protein solutions. *Journal of immunological methods*, 105(2), 211–20..
- Kelley, B., (2009). Industrialization of mAb production technology: the bioprocessing industry at a crossroads. *mAbs*, 1(5), 443–52.
- Kitano, K., Nakao, M., Itoh, Y. and Fujisawa, Y., (1987). Recombinant Hepatitis B Virus Surface Antigen P31 Accumulates as Particles in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Nature Biotechnology*, 5, 281–283.
- Koho, T., Mäntylä, T., Laurinmäki, T., Huhti, L., Butcher, S.J., Vesikari, T., Kulomaa, M.S. and Hytönen, V.P., (2012). Purification of norovirus-like particles (VLPs) by ion exchange chromatography. *Journal of virological methods*, 181(1), 6–11.
- Koplove, H.M., (1994). Cell culture and purification process--purity and safety testing. *Annals of hematology*, 68, S15–20.
- Kramberger, P, Peterka, M., Boben, J., Ravnkar, M. and Strancar, A., (2007). Short monolithic columns--a breakthrough in purification and fast quantification of tomato mosaic virus. *Journal of Chromatography A*, 1144, 143–9.
- Kuiper, M., Sanches, R.M., Walford, J.A. and Slater, N.K.H., (2002). Purification of a functional gene therapy vector derived from Moloney murine leukaemia virus using membrane filtration and ceramic hydroxyapatite chromatography. *Biotechnology and bioengineering*, 80(4), 445–53.
- Kunioka, M. and Choi, H.J., (1995). Properties of Biodegradable Hydrogels Prepared by γ Irradiation of Microbial Poly (ϵ -lysine) Aqueous Solutions. *Journal of applied polymer science*, 58(4), 801–806.
- Kurasawa, J.H., Shestopal, S.A., Jha, N.K., Ovanesov, M.V., Lee, T.K. and Sarafanov, A.G., (2013). Insect cell-based expression and characterization of a single-chain variable antibody fragment directed against blood coagulation factor VIII. *Protein expression and purification*, 88(2), 201–6.
- Lam, H., Kavoosi, M., Haynes, C.A., Wang, D.I.C. and Blankschtein, D., (2005). Affinity-enhanced protein partitioning in decyl beta-D-glucopyranoside two-phase aqueous micellar systems. *Biotechnology and bioengineering*, 89(4), 381–92.
- Lan, J.C.W., Chuan Ling, T., O'Sullivan, D.A. and Lyddiatt, A., (2011). Integrated fluidized bed affinity recovery of an anti-MUC1 mucin recombinant diabody from *Escherichia coli* lysates. *Separation and purification technology*, 83, 204–207.
- Lee, C.-K. and Su, W.-D., (1999). Nonionic Surfactant-Mediated Affinity Cloud-Point Extraction of Vancomycin. *Separation Science and Technology*, 34(16), 3267–3277.
- Lee, S.H., Kim, Jung- and Kim, C.-W., (2003). Optimization of buffer conditions for the removal of endotoxins using Q-sepharose. *Process Biochemistry*, 38(7), 1091–1098.
- Lesch, H.P., Turpeinen, S., Niskanen, E.A., Mähönen, A.J., Airene, K.J. and Ylä-Herttuala, S., (2008). Generation of lentivirus vectors using recombinant baculoviruses. *Gene therapy*, 15(18), 1280–6.

- Lewis, G.D. and Metcalf, T.G., (1988). Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus, from oyster, water, and sediment samples. *Applied and environmental microbiology*, 54(8), 1983–8.
- Li, J., Shang, G., You, M., Peng, S., Wang, Z., Wu, H. and Chen, G.Q., (2011). Endotoxin removing method based on lipopolysaccharide binding protein and polyhydroxyalkanoate binding protein PhaP. *Biomacromolecules*, 12(3), 602–8.
- Li, J., Zhang, J., Han, B., Gao, Y., Shen, D. and Wu Z., (2006). Effect of ionic liquid on the polarity and size of the reverse micelles in supercritical CO₂. *Colloids and surfaces. A, Physicochemical and engineering aspects*, 279(1-3), 208–212.
- Liu, C., Nikas, Y.J. and Blankschtein, D., (1996). Novel Bioseparations Using Two-Phase Aqueous Micellar Systems. *Biotechnology Bioengin*, 52(2), 185–192.
- Liu, C.L., Kamei, D.T., King, J.A., Wang, D.I. and Blankschtein D., (1998). Separation of proteins and viruses using two-phase aqueous micellar systems. *Journal of Chromatography B*, 711(1-2), 127–38.
- Liu, Lili, Meihu Ma, Zhaoxia Cai, Xieli Yang, and Wentao Wang. (2010). Purification and Properties of a Collagenolytic Protease Produced by *Bacillus cereus* MBL13 Strain. *Food technology and biotechnology*, 48(2), 151–160.
- Liu, S., Tobias, R., McClure, S., Styba, G., Shi, Q. and Jackowski, G., (1997). Removal of endotoxin from recombinant protein preparations. *Clinical Biochemistry*, 30(6), 455–463.
- Liu, Y., Yu, Y.L., Chen, M.Z. and Xiao, X., (2011). Advances in Aqueous Two-Phase Systems and Applications in Protein Separation and Purification. *Canadian Journal on Chemical Engineering & Technology*, 2(2), 1–7.
- Liu, Y., Feng, Y. and Lun, J., (2012). Aqueous two-phase countercurrent distribution for the separation of c-phycocyanin and allophycocyanin from *Spirulina platensis*. *Food and Bioproducts Processing*, 90(2), 111–117.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D. and Darnell, J., (2000). *Molecular Cell Biology* 4, ed., New York: W. H. Freeman.
- Lopatin, S. and Varlamov, V., (1995). A new trend toward using metal chelates in affinity chromatography of proteins. *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiya*, 3, 259–66.
- Lopes, A M, Magalhães, P.O., Mazzola, P.G., Rangel-Yagui, C.O., Carvalho, J.C.M., Penna, T.C.V. and Pessoa Jr, A., (2010). LPS Removal from an *E. Coli* Fermentation Broth Using Aqueous Two-Phase Micellar System. *Biotechnology progress*, 26(6), 1644–1653.
- Lopes, A.M., Silva, D.P., Vicente, A.A., Pessoa-Jr, A. and Teixeira, J.A., (2011). Aqueous two-phase micellar systems in an oscillatory flow micro-reactor: study of perspectives and experimental performance. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 86(9), 1159–1165.
- Lopes, A.M., Magalhães, P.O., Mazzola, P.G., Rangel-Yagui, C.O., Carvalho, J.C.M., Penna, T.C.V. and Pessoa Jr, A., (2011). Green fluorescent protein extraction and LPS removal from *Escherichia coli* fermentation medium using aqueous two-phase micellar system. *Separation and purification technology*, 81(3), 339–346.
- Lopes, A.M., Pessoa Jr, A. and Rangel-Yagui, C.O., (2008). Can affinity interactions influence the partitioning of glucose-6-phosphate dehydrogenase in two-phases?
- Lopes, A.M., Romeu, J.S., Meireles, R.P., Perera, G.M., Morales, R.P., Pessoa Jr, A. and Cárdenas, L.Z., (2012). Adsorption of endotoxins on Ca²⁺-iminodiacetic

- acid by metal ion affinity chromatography. *Chinese journal of chromatography*, 30(11), 1194–202.
- Lopes, A.M., Santos-Ebinuma, V.C., Novaes, L.C.L, Molino, J.V.D., Barbosa, L.R.S., Pessoa Jr, A. and Rangel-Yagui, C.O., (2013). LPS-protein aggregation influences protein partitioning in aqueous two-phase micellar systems. *Applied microbiology and biotechnology*.
- Low, D., O'Leary, R. and Pujar, N.S., (2007). Future of antibody purification. *Journal of Chromatography B*, 848(1), 48–63.
- Lowe, A.J., Bardliving, C.L., Huang, C., Teixeira, L.M., Damasceno, L.M., Anderson, K.A., Ritter, G., Old, L.J. and Batt, C.A., (2011). Expression and purification of cGMP grade NY-ESO-1 for clinical trials. *Biotechnology Progress*, 27(2), 435–41.
- Lowe, A.J., Bardliving, C.L. and Batt, C.A., (2012). Methods for Chromatographic Removal of Endotoxin. In V. Voynov and J. A. Caravella, eds. *Therapeutic Proteins*. Totowa, NJ: Humana Press, 265–275.
- Lu, Y., Lu, W., Wang, W., Guo, Q. and Yang, Y., (2013). The optimization of aqueous two-phase extraction of lysozyme from crude hen egg white using response surface methodology. *Journal of chemical technology and biotechnology*, 88(3), 415–421.
- Luechau, F., Ling, T.C. and Lyddiatt, A., (2011). Recovery of B19 virus-like particles by aqueous two-phase systems. *Food and Bioproducts Processing*, 89(4), 322–327.
- Magalhães, P.O., Lopes, A.M., Mazzola, P.G., Rangel-Yagui, C.O., Penna, T.C.V. and Pessoa Jr, A., (2007). Methods of endotoxin removal from biological preparations: a review. *Journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, 10(3), 388–404.
- Mageste, A.B, Lemos, L.R., Ferreira, G.M.D., Silva, M.C.H., Silva, L.H.M., Bonomo, R.C.F. and Minim, L.A., (2009). Aqueous two-phase systems: an efficient, environmentally safe and economically viable method for purification of natural dye carmine. *Journal of Chromatography A*, 1216(45), 7623–9.
- Maranga, L., Rueda, P., Antonis, A.F.G., Vela, C., Langeveld, J.P.M., Casal, J.I. and Carrondo, M.J.T., (2002). Large scale production and downstream processing of a recombinant porcine parvovirus vaccine. *Applied microbiology and biotechnology*, 59(1), 45–50.
- Matsumae, H., Minobe, S., Kindan, K., Watanabe, T., Sato, T. and Tosa, T., (1990). Specific removal of endotoxin from protein solutions by immobilized histidine. *Biotechnology and applied biochemistry*, 12(2), 129–140.
- Mayr, P., Petschcher, B. and Nidetzky, B., (2003). Xylose Reductase from the Basidiomycete Fungus *Cryptococcus flavus*: Purification, Steady-State Kinetic Characterization, and Detailed Analysis of the Substrate Binding Pocket Using Structure-Activity Relationships. *Journal of Biochemistry*, 133(4), 553–562.
- Mazzola, P.G., Lam, H., Kavoosi, M., Haynes, C.A., Pessoa Jr, A., Penna, T.C.V., Wang, D.I.C. and Blankschtein, D., (2006). Affinity-Tagged Green Fluorescent Protein (GFP) Extraction From a Clarified E . coli Cell Lysate Using a Two-Phase Aqueous Micellar System. *Biotechnology and bioengineering*, 93(5), 998–1004.
- Mercaldi, M.P., Dams-Kozłowska, H., Panilaitis, B., Joyce, A.P. and Kaplan, D.L., (2008). Discovery of the dual polysaccharide composition of emulsan and the isolation of the emulsion stabilizing component. *Biomacromolecules*, 9(7), 1988–96.

- Merten, O.-W., Gény-Fiamma, C. and Douar, A.M., (2005). Current issues in adeno-associated viral vector production. *Gene therapy*, 12, S51–61.
- Misset, O. and Oppendoes, F.R., (1984). Simultaneous purification of hexokinase, class-I fructose-bisphosphate aldolase, triosephosphate isomerase and phosphoglycerate kinase from *Trypanosoma brucei*. *Eur Journal of Biochemistry*, 144(3), 475–83.
- Morimoto, S., Sakata, M., Iwata, T., Esaki, A. and Hirayama, C., (1995). Preparations and Applications of Polyethyleneimine-Immobilized Cellulose Fibers for Endotoxin Removal. *Polymers J*, 27, 831–839.
- Morling, F. and Russell, S., (1995). Enhanced transduction efficiency of retroviral vectors coprecipitated with calcium phosphate. *Gene therapy*, 2(7), 505–8.
- Nan, Y., Hao, L., Liu, H. and Hu, Y., (2006). The Influence of Sodium Phosphate on Extraction Phenomena of Aqueous Two-Phase Cationic/Anionic Surfactant Systems. *Journal of dispersion science and technology*, 27(3), 419–425.
- Nikas, J., Liu, C.L., Srivastava, T., Abbot, N.L. and Blankschtein, D., (1992). Protein Partitioning in Two-Phase Aqueous Nonionic Micellar Solutions. *Macromolecules*, 25, 4797–4806.
- Oelmeier, S.A., Dismer, F. and Hubbuch, J., (2011). Application of an aqueous two-phase systems high-throughput screening method to evaluate mAb HCP separation. *Biotechnology and bioengineering*, 108(1), 69–81.
- Ohtaki, N., Takahashi, H., Kaneko, K., Gomi, Y., Ishikawa, T., Higashi, Y., Todokoro, M., Kurata, T., Sata, T. and Kojima, A., (2011). Purification and concentration of non-infectious West Nile virus-like particles and infectious virions using a pseudo-affinity Cellufine Sulfate column. *Journal of virological methods*, 174(1-2), 131–5.
- Oliveira, G.G.G., Silva, D.P., Roberto, I.C., Vitolo, M., and Pessoa Jr, A., (2003). Partition behavior and partial purification of hexokinase in aqueous two-phase polyethylene glycol/citrate systems. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 105 -108, 787–97.
- Ongkudon, C.M. and Danquah, M.K., (2011). Analysis of Selective Metal-Salt-Induced Endotoxin Precipitation in Plasmid DNA Purification Using Improved *Limulus* Amoebocyte Lysate Assay and Central Composite Design. *Analytical chemistry*, 83(1), 391–397.
- Panagiotou, G., Kekos, D., Macris, B.J., and Christakopoulos, P., (2002). Purification and characterisation of NAD⁺-dependent xylitol dehydrogenase from *Fusarium oxysporum*. *Biotechnology letters*, 24, 2089–2092.
- Pandey, S.K. and Banik, R.M., (2011). Extractive fermentation for enhanced production of alkaline phosphatase from *Bacillus licheniformis* MTCC 1483 using aqueous two-phase systems. *Bioresource technology*, 102(5), 4226–31.
- Paril, C., Horner, D., Ganja, R. and Jungbauer, A., (2009). Adsorption of pDNA on microparticulate charged surface. *Journal of Biotechnology*, 141(1-2), 47–57.
- Peixoto, C., Sousa, M.F.Q., Silva, A.C., Carrondo, M.J.T. and Alves, P.M., (2007). Downstream processing of triple layered rotavirus like particles. *Journal of Biotechnology*, 127(3), 452–61.
- Peng, H.H., Wu, S., Davis, J.J., Wang, L., Roth, J.A. and Marini F.C., (2006). A rapid and efficient method for purification of recombinant adenovirus with RGD-modified fibers. *Analytical biochemistry*, 354(1), 140–147.
- Penna, T.C.V, Ishii, M., Pessoa Jr, A., Nascimento, L.O., Souza, L.C and Cholewa, O., (2004). Evaluation of recombinant green fluorescent protein, under various culture conditions and purification with HiTrap hydrophobic interaction

- chromatography resins. *Applied biochemistry and biotechnology*, 113-116, 453–68.
- Pereira, J.F.B., Santos, V.C., Johansson, H.O., Teixeira, J.A.C. and Pessoa Jr, A., (2012). A stable liquid–liquid extraction system for clavulanic acid using polymer-based aqueous two-phase systems. *Separation and purification technology*, 98, 441–450.
- Pereira, J.F.B., Vicente, F., Santos-Ebinuma, V.C., Araújo, J.M., Pessoa Jr, A., Freire, M.G. and Coutinho, J.P., (2013). Extraction of tetracycline from fermentation broth using aqueous two-phase systems composed of polyethylene glycol and cholinium-based salts. *Process Biochemistry*, 48(4), 716–722.
- Pessoa Jr, A. and Vitolo, M., (1998). Downstream processing of inulinase. Comparison of different techniques. *Applied biochemistry and biotechnology*, 70-72(3), 505–11.
- Pessoa Jr, A., Hartmann, R., Vitolo, M. and Hustedt, H., (1996). Recovery of extracellular inulinase by expanded bed adsorption. *Journal of Biotechnology*, 51, 89–95.
- Pessoa Jr, A and Kilikian, B., (2005). *Purificação de Produtos Biotecnológicos* 1º ed., São Paulo,: Manole.
- Pessoa Jr, Adalberto and Vitolo, Michele, (1998). Recovery of inulinase using BDBAC reversed micelles. *Process Biochemistry*, 33(3), 291–297.
- Porath, J., (1992). Immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein expression and purification*, 3, 263–281. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23494780>.
- Porto, T.S., Marques, P.P., Porto, C.S., Moreira, K.A., Lima-Filho, J.L., Converti, A., Pessoa Jr, A. and Porto, A.L.F., (2010). Extraction of ascorbate oxidase from *Cucurbita maxima* by continuous process in perforated rotating disc contactor using aqueous two-phase systems. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(4), 1057–64.
- Rabelo, A.P.B., Tambourgi, E.B., and Pessoa Jr, A., (2004). Bromelain partitioning in two-phase aqueous systems containing PEO-PPO-PEO block copolymers. *Journal of Chromatography B*, 807(1), 61–8.
- Rahimpour, F., Feyzi, F., Maghsoudi, S. and Hatti-kaul, R., (2006). Purification of Plasmid DNA with Polymer-Salt Aqueous Two-Phase System : Optimization Using Response Surface Methodology. *Biotechnology and bioengineering*, 95, 627–636.
- Rangel-Yagui, C.O., Lam, H., Kamei, D.T., Wang, D.I.C., Pessoa Jr, A. and Blankschtein, D., (2003). Glucose-6-phosphate dehydrogenase partitioning in two-phase aqueous mixed (nonionic/cationic) micellar systems. *Biotechnology and bioengineering*, 82(4), 445–56.
- Reichert, P., Schwarz, C. and Donzeau, M., (2006). Single step protocol to purify recombinant proteins with low endotoxin contents. *Protein expression and purification*, 46(2), 483–8.
- Van Reis, R., Gadam, S., Frautschy, L.N., Orlando, S., Goodrich, E.M., Saksena, S., Kuriyel, R., Simpson, C.M., Pearl, S. and Zydny, A.L., (1997). High performance tangential flow filtration. *Biotechnology and bioengineering*, 56(1), 71–82.
- Ribeiro, M.Z., Silva, D.P., Vitolo, M., Roberto, I.C. and Pessoa-Jr, A., (2007). Partial purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase by aqueous two-phase poly (ethyleneglycol)/ phosphate systems. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(1), 78–83.

- Rodrigues, E.M., Pessoa Jr, A. and Milagres, a M., (1999). Screening of variables in xylanase recovery using BDBAC reversed micelles. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 77-79(12), 779–88.
- Rodrigues, E.M.G., Milagres, A.M.F. and Pessoa Jr, A., (1999). Xylanase recovery : effect of extraction conditions on the AOT-reversed micellar systems using experimental design. *Process Biochemistry*, 34, 121 – 125.
- Rosa, P.A.J., Azevedo, A.M., Sommerfeld, S., Mutter, M., Bäcker, W. and Aires-Barros, M.R., (2013). Continuous purification of antibodies from cell culture supernatant with aqueous two-phase systems: from concept to process. *Biotechnology Journal*, 8(3), 352–62.
- Rosso, B.U., Lima, C.A., Porto, T.S., Nascimento, C.O., Pessoa Jr, A., Converti, A., Carneiro-da-Cunha, M.G. and Porto, A.L.F., (2012). Partitioning and extraction of collagenase from *Penicillium aurantiogriseum* in poly(ethylene glycol)/phosphate aqueous two-phase system. *Fluid Phase Equilib*, 335, 20–25.
- Rozkov, A., Larsson, B., Gillstrom, S., Bjornestedt, R. and Schmidt S.R., (2008). Large-Scale Production of Endotoxin-Free Plasmids for Transient Expression in Mammalian Cell Culture. *Biotechnology and bioengineering*, 99(3), 557–566.
- Ruiz-Ruiz, F., Benavides, J. and Rito-Palomares, M., (2013). Scaling-up of a B-phycoerythrin production and purification bioprocess involving aqueous two-phase systems: Practical experiences. *Process Biochemistry*, 48(4), 738–745.
- Russell, B.J., Velez, J.O., Laven, J.J., Johnson, A.J., Chang, G.J.J. and Johnson, B.W., (2007). A comparison of concentration methods applied to non-infectious flavivirus recombinant antigens for use in diagnostic serological assays. *Journal of virological methods*, 145(1), 62–70.
- Saitoh, T. and Hinze, L.W., (1995). Use of surfactant-mediated phase separation (cloud point extraction) with affinity ligands for the extraction of hydrophilic proteins. *Talanta*, 42(1), 119–127.
- Sakata, M., Yoshimura, K., Sakamoto, I., Todokoro, M. and Kunitake, M., (2011). Selective removal of endotoxin from a DNA solution by cross-linked cyclodextrin beads. *Analytical sciences : the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*, 27(2), 213–6.
- Santos, V.C., Hasmann, F.A., Converti, A. and Pessoa Jr, A., (2011). Liquid–liquid extraction by mixed micellar systems: A new approach for clavulanic acid recovery from fermented broth. *Biochemical Engineering Journal*, 56(1-2), 75–83.
- Schädlich, L., Senger, T., Kirschning, C.J., Müller, M. and Gissmann, L., (2009). Refining HPV 16 L1 purification from *E. coli*: reducing endotoxin contaminations and their impact on immunogenicity. *Vaccine*, 27(10), 1511–22.
- Schulman, E.S., MacGlashan, D.W., Peters, S.P., Schleimer, R.P., Newball, H.H. and Lichtenstein, L.M., (1982). Human lung mast cells: purification and characterization. *Journal of immunology*, 129(6), 2662–7.
- Selber, K., Hyytia, T., Colle, A., Persson, J., Bailey, M., Fagerstro, R., Kula, M.R., Penttilä, M. and Sta, S., (2002). Primary Recovery of a Genetically Engineered *Trichoderma reesei* Endoglucanase I (Cel 7B) Fusion Protein in Cloud Point Extraction Systems. *Biotechnology*, 78(4):385-94.
- Shakhmaeva, I.I., Bulatov, E.R., Bondar, O.V., Saifullina, D.V., Culha, M., Rizvanov, A.A. and Abdullin, T.I., (2011). Binding and purification of plasmid DNA using multi-layered carbon nanotubes. *Journal of Biotechnology*, 152(3), 102–7.
- Shukla, A.A., Etzel, M.R. and Gadam, S. eds., (2007). *Process Scale Bioseparations for the Biopharmaceutical Industry*, Taylor and Francis Group.

- Silva, C.S., Bovarotti, E., Rodrigues, M.I., Hokka, C.O. and Barboza, M., (2009). Evaluation of the effects of the parameters involved in the purification of clavulanic acid from fermentation broth by aqueous two-phase systems. *Bioprocess and biosystems engineering*, 32(5), 625–32.
- Silva, C.S., Cuel, M.F., Barreto, V.O., Kwong, W.H., Hokka, C.O. and Barboza, M., (2012). Separation of clavulanic acid from fermented broth of amino acids by an aqueous two-phase system and ion-exchange adsorption. *Nature Biotechnology*, 29(3), 428–31.
- Simpson, C., Jordaan, J., Gardiner, N.S. and Whiteley, C., (2007). Isolation, purification and characterization of a novel glucose oxidase from *Penicillium* sp. CBS 120262 optimally active at neutral pH. *Protein expression and purification*, 51, 260–6.
- Sivars, U. and Tjerneld, F., (2000). Mechanisms of phase behaviour and protein partitioning in detergent/polymer aqueous two-phase systems for purification of integral membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1474(2), 133–146.
- Smith, R.H., Yang, L. and Kotin, R.M., (2008). Chromatography-Based Purification of Adeno-Associated Virus. In J. Le doux, ed. *Methods in Molecular Biology*. Totowa: Humana Press, 37–54.
- Soares, P.A.G., Vaz, A.F.M, Correia, M.T.S., Pessoa Jr, A. and Carneiro-da-Cunha, M.G., (2012). Purification of bromelain from pineapple wastes by ethanol precipitation. *Separation and purification technology*, 98, 389–395.
- Stadler, J., Lemmens, R. and Nyhammar, T., (2004). Plasmid DNA purification. *The journal of gene medicine*, 6, S54–66.
- Sunasara, K.M., Xia, F., Gronke, R.S. and Cramer S.M., (2003). Application of hydrophobic interaction displacement chromatography for an industrial protein purification. *Biotechnology and bioengineering*, 82(3), 330–9.
- Tan, L., Kim, D.S., Yoo, I.K. and Choe, W.S., (2007). Harnessing metal ion affinity for the purification of plasmid DNA. *Chemical engineering science*, 62(21), 5809–5820.
- Tan, M., Zhong, W., Song, D., Thornton, S. and Jiang, X., (2004). E. coli-expressed recombinant norovirus capsid proteins maintain authentic antigenicity and receptor binding capability. *Journal of medical virology*, 74(4), 641–9.
- Tollefson, A.E., Kuppuswamy, M., Shashkova, E.V., Doronin, K. and Wold, W.S. (2007). Preparation and Titration of CsCl-Banded Adenovirus Stocks. *Methods in molecular medicine*, 130, 223–235.
- Tsoka, S., Ciniawskyj, O.C., Thomas, O.R., Titchener-Hooker, N.J. and Hoare., M., (2000). Selective flocculation and precipitation for the improvement of virus-like particle recovery from yeast homogenate. *Biotechnology Progress*, 16(4), 661–7.
- Veide, A., Smeds, A. and Enfors, S., (1983). A Process for Large-Scale Isolation in an Aqueous Two-Phase System. *Biotechnology and bioengineering*, XXV, 1789–1800.
- Ventura, S.P.M., Santos-Ebinuma, V.C., Pereira, J.F.B., Teixeira, M.F.S., Pessoa Jr, A. and Coutinho, J.A.P., (2013). Isolation of natural red colorants from fermented broth using ionic liquid-based aqueous two-phase systems. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 40(5), 507–16.
- Marques, D.A.V., Pessoa Jr, A., Lima-Filho, J.L., Converti, A., Perego, P. and Porto, A.L.F., (2011). Extractive fermentation of clavulanic acid by *Streptomyces* DAUFPE 3060 using aqueous two-phase system. *Biotechnology Progress*, 27(1), 95–103.

- Marques, D.A.V., Pessoa Jr, A., Lima-Filho, J.L., Converti, A., Perego, P. and Porto, A.L.F (2009). Comparison of oxygen mass transfer coefficient in simple and extractive fermentation systems. *Biochemical engineering journal*, 47(1-3), 122–126.
- Vicente, T, Peixoto, C. Alves, P.M. and Carrondo, M.J.T., (2010). Modeling electrostatic interactions of baculovirus vectors for ion-exchange process development. *Journal of Chromatography A*, 1217, 3754–64.
- Vicente, T, Mota, J.P.B, Peixoto, C., Alves, P.M. and Carrondo, M.J.T., (2011). Rational design and optimization of downstream processes of virus particles for biopharmaceutical applications: current advances. *Biotechnology Advances*, 29(6), 869–78.
- Videira, M. and Aires-barros, M.R., (1994). Liquid-liquid extraction of clavulanic acid using an aqueous two-phase system of polyethylene glycol and potassium phosphate. *Journal of Chromatography A*, 668, 237–240.
- Vieira, E., Pessoa Jr, A. and Almeida, G. De, (2004). Optimized extraction by cetyl trimethyl ammonium bromide reversed micelles of xylose reductase and xylitol dehydrogenase from *Candida guilliermondii* homogenate. , 807, 55–60.
- Volpers, C. and Kochanek, S., (2004). Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. *The journal of gene medicine*, 6, S164–71.
- Wei, Z, Huang, W., Li, J., Hou, G., Fang, J. and Yuan, Z., (2007). Studies on endotoxin removal mechanism of adsorbents with amino acid ligands. *Journal of Chromatography B*, 852(1-2), 288–92.
- Wiendahl, M., Oelmeier, S.A., Dismar, F. and Hubbuch, J., (2012). High-throughput screening-based selection and scale-up of aqueous two-phase systems for pDNA purification. *Journal of Separation Science*, 35(22), 3197–207.
- Winzerling, J.J., Berna, P. and Porath, J., (1992). How to Use Immobilized Affinity Chromatography Metal Ion. *Methods*, 4, 4–13.
- Wu, Q., Li, C., Li, C., Chen, H. and Shuliang, L., (2010). Purification and characterization of a novel collagenase from *Bacillus pumilus* Col-J. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(1), 129–39.
- Yamamoto, C. and Kim, S.T., (1996). Endotoxin rejection by ultrafiltration through high-flux, hollow fiber filters. *Journal of biomedical materials research*, 32(3), 467–71.
- Zhou, J., Yang, X., Wright, J.F., High, Couto, L. and Qu. G., (2011). PEG-modulated column chromatography for purification of recombinant adeno-associated virus serotype 9. *Journal of virological methods*, 173(1), 99–107.