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

Remoção de endotoxina presente em meio fermentado contendo
biomoléculas utilizando sistemas micelares de duas fases aquosas

André Moreni Lopes

Tese para a obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Adalberto Pessoa Júnior

São Paulo
2010

André Moreni Lopes

Remoção de endotoxina presente em meio fermentado contendo biomoléculas utilizando sistemas micelares de duas fases aquosas

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Júnior
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

"Mas teus exercícios pratica-os diariamente com a seriedade de um ritual e com a inflexibilidade e o zelo de um genuíno artista interessado em produzir uma obra genial. A obra genial és tu mesmo, e o artista também"

Mestre Universal Kuut Hume

A vocês, que me deram a vida
e me ensinaram a vivê-la com dignidade,
não bastaria um obrigado.

A vocês, que iluminaram os caminhos
obscuros com afeto e dedicação
para que eu trilhasse sem medo e
cheio de esperanças,
não bastaria um muito obrigado.

A vocês, que se doaram inteiros e renunciaram
aos seus sonhos para que, muitas vezes,
pudessem realizar os meus.

Pela longa espera e compreensão
durante minhas longas viagens,
não bastaria um muitíssimo obrigado.

A vocês, pais por natureza,
por opção e amor, não bastaria dizer
que não tenho palavras para agradecer tudo isso.

Mas é o que acontece agora,
quando procuro arduamente
uma forma verbal de exprimir uma emoção ímpar.

Uma emoção que jamais seria traduzida por palavras.
Amo vocês!

***Dedico este trabalho aos meus
pais, Marisa e Orcélio***

AGRADECIMENTOS

Ao Adalberto agradeço a orientação e amizade. Ao estímulo, ao respeito e à liberdade depositados em mim. Obrigado pelos ensinamentos e por acreditar em meu trabalho!

Agradeço não só os conselhos e discussões sobre o projeto, mas também pela amizade das queridas Professoras, T. Cris, Carlota, Priscila e Pérola. As quais sugeriram e agregaram muitos pontos positivos para andamento do projeto.

Meus sinceros agradecimentos ao Prof. João C. M. de Carvalho pela amizade, incentivo e apoio principalmente com os estudos do planejamento experimental.

Agradeço a Profa Rosangela Itri, e em especial o Leandro, pelo apoio na discussão e interpretação dos resultados de SAXS, realizados no Instituto de Física - USP.

Não posso deixar de agradecer aos funcionários da secretária de Pós-Graduação da FCF - USP, em especial ao Juarez, Miriam, Elza e ao eficiente dueto Elaine e Jorge, que sempre me atenderam da melhor forma possível.

Agradeço a CAPES pela concessão de bolsa de Doutorado Sanduíche em Cuba. E a FAPESP pelo constante apoio financeiro, e também, pela concessão de bolsa de Doutorado no país.

Ao meu irmão Eduardo pelo apoio, incentivo e pelos comentários existenciais, do tipo: “*Mãe, acho que o Dé nunca vai parar de estudar...*”

Aos estimados e inesquecíveis amigos do Laboratório, Jorge Portuga, Lê, Gê, Val e Dani. Sem vocês nada disso teria tanta graça como teve! Obrigado pelo momento lazer que tivémos ao longo deste período.

Meus amigos de infância e que até hoje estão ao meu lado, vocês também foram importantes nesta etapa, obrigado Cínthia, Luquinhas, Mário, Diogo, Caio e Júlio.

Aos meus queridos alunos de Iniciação Científica, Renatinha e Gabriel. E aos demais colegas do Semi-Industrial e Bloco 16.

Aos meus amigos cubanos agradeço todo apoio recebido em Cuba, um agradecimento especial para minha orientadora Lourdes e amigos Rolando, Jorge e Héctor. *Muchas gracias!!!*

Gostaria de agradecer todo carinho e palavras de conforto da Maria.

E finalmente, agradecer os momentos reflexivos com minha querida Mariana. E também, pela ajuda na revisão deste trabalho.

SUMÁRIO

ITENS	<i>páginas</i>
LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	3
CAPÍTULO I - MÉTODOS DE REMOÇÃO DE ENDOTOXINAS DE PREPARAÇÕES BIOLÓGICAS: REVISÃO	4
1.1. INTRODUÇÃO	5
1.1.1. LPS e Suas Propriedades Físico-Químicas	6
1.1.2. Mecanismos de Ação dos LPS	9
1.1.3. Técnicas para Determinação de LPS	12
1.1.3.1. Teste de LPS Através do Lisado de Amebócito de <i>Limulus</i>	13
1.1.3.2. Teste do Lisado de Amebócito de <i>Limulus</i> por <i>Gel Clot</i>	14
1.1.3.3. Teste do Lisado de Amebócito de <i>Limulus</i> – Método Turbidimétrico e Cromogênico	16
1.1.4. Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas	17
1.1.5. Teoria de Partição de Proteínas Hidrofílicas Baseada em Interações por Volume de Exclusão	24
1.1.6. Proteína Verde Fluorescente Recombinante	26

CAPÍTULO II - REMOÇÃO DE LPS DE CALDO FERMENTADO DE <i>E. coli</i> UTILIZANDO O SISTEMA MICELAR DE DUAS FASES AQUOSAS	30
2.1. INTRODUÇÃO	31
2.2. MATERIAIS E MÉTODOS	33
2.2.1. Materiais	33
2.2.2. Estudo da Interferência do Tensoativo Não-lônico Triton X-114 no Método de Quantificação de LPS	34
2.2.3. Preparo dos SMDFA e Construção das Curvas Binodais	34
2.2.4. Cultivo de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 para Obtenção de LPS Puro	36
2.2.5. Determinação da Concentração de LPS	37
2.2.6. Estudo da Partição de LPS Puro em SMDFA	38
2.2.7. Planejamento Experimental	38
2.2.8. Estudos de Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo para as Soluções de Triton X-114 e LPS	39
2.2.9. Metodologia de Análise dos Resultados	40
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
2.3.1. Estudo da Interferência do Tensoativo Não-lônico Triton X-114 no Método de Quantificação de LPS	41
2.3.2. Estudo da Partição de LPS Puro em SMDFA	44
2.3.3. Medidas de Espalhamento de Raios-X a Baixos Ângulos para as Soluções de Triton X-114 e LPS	48
2.4. Conclusões	54
 CAPÍTULO III - OTIMIZAÇÃO DO ESTUDO DA PURIFICAÇÃO DE GFPuv PROVENIENTE DE MEIO FERMENTADO DE <i>E. coli</i> EM SISTEMA MICELAR DE DUAS FASES AQUOSAS	 55
3.1. INTRODUÇÃO	56
3.2. MATERIAIS E MÉTODOS	59
3.2.1. Materiais	59
3.2.2. Determinação da Concentração de Proteínas Totais	60
3.2.3. Cultivo de <i>E. coli</i> DH5- α para a Obtenção de GFPuv	60
3.2.4. Determinação da Concentração de GFPuv	61
3.2.5. Estudo da Partição de GFPuv pura em SMDFA	63
3.2.6. Estudo da Partição do Homogeneizado Celular de <i>E. coli</i> em SMDFA	63
3.2.7. Planejamento Experimental	63
3.2.8. Estudo da Presença de Sais em SMDFA	65
3.2.9. Metodologia de Análise dos Resultados	65
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
3.3.1. Estudos da Partição de GFPuv Pura em SMDFA	67
3.3.2. Resultados do Planejamento Experimental	69
3.3.3. Estudo da Partição do Homogeneizado Celular de <i>E. coli</i> em SMDFA	75
3.3.4. Estudo da Presença de Sais em SMDFA	78
3.4. Conclusões	83

CAPÍTULO IV - ESTUDO DA ADSORÇÃO DE ENDOTOXINAS EM IDA-Ca⁺² EMPREGANDO CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE POR ÍONS METÁLICOS	84
4.1. INTRODUÇÃO	85
4.1.1. Teoria da Adsorção – Isotermas	88
4.1.1.1. Cinética de Adsorção	91
4.2. MATERIAIS E MÉTODOS	92
4.2.1. Materiais	92
4.2.2. Quantificação de Íons Cálcio Imobilizados	93
4.2.3. Protocolo de Preparação para a Determinação da Cinética e Isotermas de Adsorção entre LPS-IDA-Ca ⁺²	93
4.2.4. Planejamento Experimental	96
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	97
4.3.1. Cinética de Adsorção entre LPS-IDA-Ca ⁺²	97
4.3.2. Determinação das Isotermas de Adsorção entre LPS-IDA-Ca ⁺²	99
4.3.2.1. Ajuste da Isoterma por Freundlich	99
4.3.2.2. Ajuste da Isoterma por Langmuir	106
4.4. Conclusões	108
 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES	 109
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 111
 APÊNDICES	 130
APÊNDICE A	130
APÊNDICE B	135
APÊNDICE C	136
APÊNDICE D	137
APÊNDICE E	139
APÊNDICE F	140
 ANEXOS	

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Estrutura química dos LPS de <i>E. coli</i> O111:B4 de acordo com Ohno e Morrison (1989). Abreviações: Hep (L-glicerol-D-mano-heptose); Gal (galactose); Glc (glicose); KDO (ácido 2-ceto-3-deoxioctônico); Nga (N-acetil-galactosamina) e NGc (N-acetil-glicosamina).	7
Figura 02	Membrana interna e externa de <i>E. coli</i> K-12 de acordo com Raetz et al. (1991). Nos LPS os desenhos ovais e retangulares representam resíduos de açúcares, enquanto círculos representam grupos com cabeça polar de vários lipídeos.	8
Figura 03	Mecanismo proposto pelo qual os LPS causam febre. Adaptado de Tortora et al. (2000).	11
Figura 04	Caranguejo Ferradura (<i>Limulus polyphemus</i>). Também conhecido como límulo, são normalmente encontrados no Golfo do México e ao longo das costas do Atlântico Norte.	14
Figura 05	Reação enzimática para a formação do coágulo gelatinoso na presença de LPS.	15
Figura 06	Reação enzimática para a liberação da pNA na presença de LPS.	16
Figura 07	Estrutura do monômero de um tensoativo, na qual pode ser visualizada a porção da cabeça polar de caráter hidrofílico, e a porção da cauda apolar de caráter hidrofóbico.	18
Figura 08	Representação esquemática de um sistema micelar de duas fases aquosas para o tensoativo não-iônico Triton X-114. O sistema exibe uma única fase a baixas temperaturas; com o aumento da temperatura, se separa em uma fase rica em micelas (fase concentrada - F_c) que coexiste com uma fase pobre em micelas (fase diluída - F_d). Adaptado de Nikas et al. (1992).	20
Figura 09	Estrutura molecular da proteína verde fluorescente.	26
Figura 10	Esquema representativo que ilustra a inserção do gene recombinante para a expressão da proteína GFPuv. Adaptado de Douglas Prasher.	27
Figura 11	Procedimento experimental para a preparação do SMDFA. 1 - Adição dos componentes do sistema em tubo graduado – Sistema Monofásico; 2 - Homogeneização das amostras por 1 hora em agitação orbital; 3 - Incubação das amostras em banho termorregulado à temperatura desejada por três horas; 4 - Tubo graduado contendo as duas fases do sistema, coleta das fases com auxílio de seringa e agulha – Sistema Bifásico; 5 - Amostras contendo as fases concentrada (F_c) e diluída (F_d) para análises da concentração dos componentes.	35
Figura 12	Curva binodal para o sistema Triton X-114/tampão, obtida experimentalmente. A curva representa a transição do sistema monofásico para o sistema de duas fases aquosas (bifásico). Os círculos (○) correspondem os ensaios com LPS a 2,0 e 6,0% (p/p) de TX-114/tampão.	41

Figura 13	Frascos de vidro contendo LPS puro liofilizado.	44
Figura 14	Gráfico de superfície de resposta para FR_{LPS} em função da temperatura e concentração de TX-114 (%p/p).	46
Figura 15	Representação esquemática de um sistema micelar do tipo misto, composto por moléculas de TX-114 e LPS. Com a separação das fases, as moléculas de LPS particionam para a fase concentrada interagindo com moléculas de TX-114.	48
Figura 16	Curvas de SAXS em função da intensidade e do fator forma (q) das micelas, para sistemas constituídos por Triton X-114 em diferentes concentrações: 90 (quadrado preto), 180 (círculo vermelho), 270 (triângulo azul) e 450 mM (triângulo topázio).	49
Figura 17	Curvas de SAXS em função da intensidade e do fator forma (q) das micelas, para os sistemas estudados (quadrados pretos), juntamente com os melhores ajustes obtidos.	50
Figura 18	Funções de interferência $S(q)$ em função do fator forma (q) das micelas, estudados em diferentes concentrações de Triton X-114. mM corresponde à mmol/L.	51
Figura 19	Curva de SAXS em função da intensidade e do fator forma (q) das micelas, para a solução contendo LPS puro em água apirogênica (2,0 μ mol/L de LPS), juntamente com o melhor ajuste obtido através do modelo de cilindro com dois níveis de densidade eletrônica diferentes.	52
Figura 20	Representação esquemática dos íons da série de Hofmeister em solução aquosa.	58
Figura 21	Purificação da proteína GFPuv por coluna de interação hidrofóbica. GFPuv ligada à resina por interações hidrofóbicas confrontadas com luz UV.	62
Figura 22	Diagrama para a interpretação dos resultados do planejamento em estrela. X_1 corresponde à variável codificada da concentração de TX-114 (em %p/p), e X_2 à variável codificada de EV. Fonte: Rodrigues e lemma (2005); Barros Neto et al. (2007).	64
Figura 23	Valores de K_{GFPuv} e %REC _{GFPuv} obtidos nos ensaios realizados de acordo com o planejamento experimental em estrela (●). X_1 corresponde à variável codificada da concentração de TX-114 (em parênteses %p/p) e X_2 à variável codificada de EV (em parênteses correspondente a T °C).	71
Figura 24	Separação de fases de um sistema a 4,0% (p/p) de TX-114/tampão, mantido em banho termorregulado a 60,0 °C por 3 horas. Tubo de separação à esquerda visto à olho nu e o mesmo (à direita) visto em câmara com luz UV, na qual nitidamente apresenta maior intensidade fluorescente.	72
Figura 25	Superfície de resposta para o coeficiente de partição da GFPuv (K_{GFPuv}) em função dos valores codificados. X_1 corresponde à variável codificada da concentração de TX-114 (%p/p), e X_2 à variável codificada de EV.	75

Figura 26	Curvas binodais obtidas experimentalmente para o sistema TX-114/tampão com adição de diferentes sais. Cada ponto na curva corresponde aos valores de $T_{NÉVOA}$. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95,0% nos valores obtidos. M corresponde à mol/L.	78
Figura 27	Estrutura proposta de um agente quelante complexado (ácido imidoacético – IDA) com íons metálicos. Adaptado de Porekar e Menart (2001) e Porath e Olin (1983).	87
Figura 28	Isoterma de adsorção. c^* é a concentração de adsorbato na solução e q^* é a capacidade de adsorção do adsorvente. Fonte: Belter et al. (1988).	89
Figura 29	Etapas de transferência de massa do soluto entre a fase móvel (fase líquida - adsorbato) e a fase estacionária (fase sólida - adsorvente).	92
Figura 30	Cinética de adsorção entre LPS-IDA- Ca^{+2} em recipiente agitado em diferentes tempos de reação a 25,0°C. Curvas experimental (•) e ajustada (-).	97
Figura 31	Cinética de adsorção entre LPS-IDA- Ca^{+2} em recipiente agitado em diferentes tempos de reação a 25,0°C ajustada pela equação de Daniel.	97
Figura 32	Variabilidade dos resíduos entre o efeito de $\log(C/C_0)$ em função do tempo (a) e $SQRT(t)$ (b), respectivamente.	98
Figura 33	Isotermas de adsorção entre LPS-IDA- Ca^{+2} em função de q^* , que representa a capacidade de adsorção da matriz, e c^* representando a concentração de LPS em solução, segundo modelo de Freundlich. F.I. corresponde à força iônica investigada (mol/L).	101
Figura 34	Isotermas de adsorção entre LPS-IDA- Ca^{+2} em função de q^* , que representa a capacidade de adsorção da matriz, e c^* a concentração de LPS em solução, segundo modelo de Freundlich, divididas em intervalos de concentração de LPS: a) baixa, b) média e c) alta.	102
Figura 35	Esquematização da estrutura de um agregado micelar, com o interior hidrofóbico e as cabeças polares interagindo entre si.	131
Figura 36	Esquematização do modelo micelar tipo elipsoidal. Os parâmetros de ajuste das curvas de SAXS para este elipsóide são: R_{par} (raio parafínico), vR_{par} (semi-eixo maior do elipsóide), assim como σ_{pol} e ρ_{pol} (espessura e densidade eletrônica da camada polar, respectivamente). $\rho_{água}$, e ρ_{par} , são as densidades eletrônicas da água e da região parafínica, respectivamente, mantidas constantes e iguais a 0.334 e 0.275 e/Å ³ .	131
Figura 37	Função distribuição de densidade eletrônica $\rho_c(r)$ da secção transversal de um cilindro, composta por dois níveis de densidades eletrônicas diferentes, ρ_{par} e ρ_{pol} , em relação ao meio, $\rho_{água}$.	132

Figura 38	Curva de calibração da concentração total de proteínas obtida pelo método de BCA. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95,0% nos valores obtidos.	135
Figura 39	Curva de calibração da proteína GFPuv obtida em fluorímetro nos comprimentos de ondas $\lambda_{exc.}=394$ nm e $\lambda_{emi.}=509$ nm.	135
Figura 40	Tubo tipo Falcon contendo amostra purificada de GFPuv, evidenciada em câmara sem e com luz UV.	136
Figura 41	Interferência do TX-114 durante 1 hora de homogeneização à temperatura ambiente na determinação da intensidade de fluorescência da GFPuv. As barras de erros correspondem a um intervalo de confiança de 95,0% nos valores obtidos (neste caso as barras de erros apresentaram valores muito baixos, impossibilitando sua visualização).	137
Figura 42	Estudo da estabilidade da proteína GFPuv na presença de diferentes concentrações do tensoativo não-iônico TX-114, durante 1 hora, à temperatura ambiente. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95,0% nos valores obtidos.	138
Figura 43	Curva de calibração da concentração de íons cálcio (mg/L) por porcentagem de emissão.	139
Figura 44	Gráfico de $\log(C/C_0)$ do efeito observado para a distribuição dos resíduos para o estudo cinético.	141

LISTA DE TABELAS

TABELA 01	Níveis das variáveis utilizadas no planejamento 2^2 para o estudo da partição de LPS puro adicionado em SMDFA.	39
TABELA 02	Resultados de interferência (UE/mL) no método de quantificação de LPS em diferentes concentrações de TX-114.	42
TABELA 03	Resultados de interferência (UE/mL) no método de quantificação de LPS das fases diluídas na ausência (A) e presença (B) de β -GB. Os erros apresentados correspondem a um intervalo de confiança de 95,0% nos valores obtidos.	43
TABELA 04	Resultados experimentais de partição de LPS puro em sistema TX-114/tampão, em diferentes concentrações e temperaturas. R corresponde à razão volumétrica entre as fases, $\%REM_{LPS}$ e FR_{LPS} correspondem à remoção e ao fator de remoção de LPS para a fase concentrada, respectivamente.	45
TABELA 05	Análise de variância para a variável FR_{LPS} , avaliando o efeito da variável temperatura dependendo do efeito da concentração de TX-114.	46
TABELA 06	Níveis das variáveis utilizadas no planejamento 2^2 em estrela para o estudo da partição da GFPuv pura adicionada em SMDFA.	64
TABELA 07	Matriz completa de ensaios do planejamento experimental 2^2 .	65
TABELA 08	Resultados experimentais da partição da GFPuv pura em sistema TX-114/Tampão. R corresponde à razão volumétrica entre as fases do sistema, K_{GFPuv} ao coeficiente de partição da GFPuv, $\%REC_{GFPuv}$ à recuperação da GFPuv e $\%REM_{LPS}$ à remoção de LPS.	67
TABELA 09	Ensaio de partição da GFPuv pura adicionada em SMDFA em diferentes concentrações de TX-114 e de EV. Para cada temperatura ($T^\circ C$) foram calculados os valores de EV correspondentes. R corresponde à razão volumétrica entre as fases do sistema.	69
TABELA 10	Análise do modelo da regressão multivariável para a variável concentração de TX-114 em função do efeito de volume de exclusão (EV).	73
TABELA 11	Análise da variância do modelo de regressão multivariável para a variável de coeficiente de partição da GFPuv (K_{GFPuv}).	73
TABELA 12	Análise do modelo da regressão multivariável para a variável efeito de volume de exclusão (EV).	74
TABELA 13	Análise da variância do modelo de regressão multivariável para a variável de porcentagem de recuperação de GFPuv ($\%REC_{GFPuv}$).	74

TABELA 14	Resultados experimentais da partição do homogeneizado celular de <i>E. coli</i> em sistema TX-114/Tampão. R corresponde à razão volumétrica entre as fases do sistema, K_{GFPuv} ao coeficiente de partição da GFPuv, $\%REC_{GFPuv}$ à recuperação da GFPuv, $\%REM_{LPS}$ à remoção de LPS e f_p ao fator de purificação da GFPuv.	76
TABELA 15	Resultados experimentais da partição da GFPuv e LPS puros em sistema TX-114/Tampão, na presença de diferentes sais. R corresponde à razão volumétrica entre as fases, K_{GFPuv} ao coeficiente de partição da proteína, $\%REM_{LPS}$ à remoção de LPS e BM_{GFPuv} ao balanço de massa da proteína.	80
TABELA 16	Matriz completa de ensaios do planejamento experimental 3 ² .	96
TABELA 17	Valores obtidos para os parâmetros da equação de Freundlich para a adsorção entre LPS-IDA-Ca ⁺² . K corresponde à constante de equilíbrio da equação e n é o valor do expoente. O valor de n tomará forma linear ($n=1$), convexa ($n>1$) ou côncava ($n<1$).	100
TABELA 18	Análise de variância para a variável $\ln q$, avaliando o efeito da concentração de LPS em solução, e da variável pH, dependendo do efeito da força iônica.	105
TABELA 19	Análise de variância do modelo de regressão múltipla para a variável $\ln(q)$.	105
TABELA 20	Ajuste da isoterma de Freundlich para cada caso separadamente (valores obtidos para a adsorção entre LPS-IDA-Ca ⁺²). K corresponde à constante de equilíbrio da equação e n é o valor do expoente. O valor de n tomará forma linear ($n=1$), convexa ($n>1$) ou côncava ($n<1$).	106
TABELA 21	Valores obtidos para os parâmetros da equação de Langmuir para a adsorção entre LPS-IDA-Ca ⁺² . q_{max} corresponde à capacidade máxima de LPS que pode ser adsorvida na matriz, e K_d é a constante de dissociação de Langmuir.	106
TABELA 22	Estudo da cinética de adsorção de LPS-IDA-Ca ⁺² , em diferentes tempos de reação a 25,0°C.	140

LISTA DE NOMENCLATURA E ABREVIATÖES

BM_{GFPuv}	Porcentagem do balanço de massa da GFPuv
c^*	Concentração de soluto (LPS) em solução – em UE/mL
C_c	Concentração de tensoativo na fase rica em micelas – em % p/p
C_d	Concentração de tensoativo na fase diluída, pobre em micelas – em % p/p
C_i	Concentração da solução estoque inicialmente adicionada no sistema – em µg/mL ou UE/mL
CMC	Concentração micelar crítica – em mM
C/C_0	Concentração de equilíbrio do soluto por concentração inicial de soluto
CSFF	Matriz cromatográfica (<i>Chelating sepharose fast flow</i>)
β-GB	Beta bloqueador de glucanas
EV	Volume de exclusão (<i>excluded volume</i>)
UE	Unidades endotóxicas
F_c	Fase concentrada (rica em micelas)
F_d	Fase diluída (pobre em micelas)
F.I.	Força iônica – em mol/L
FR_{LPS}	Fator de remoção de LPS
g	Velocidade centrífuga
GFPuv	Proteína verde fluorescente (<i>green fluorescent protein</i>)
IDA	Ácido iminodiacético
IMAC	Cromatografia de afinidade por íons metálicos (<i>ion-metal affinity chromatography</i>)
K	Constante de equilíbrio de Freundlich
K_a	Constante de adsorção de Langmuir
K_d	Constante de dessorção de Langmuir
K_{GFPuv}	Coeficiente de partição da GFPuv
K_p	Coeficiente de partição da proteína
LAL	Lisado de amebócito de <i>Limulus</i>
LPS	Lipopolissacarídeo, também conhecido como endotoxinas ou pirogênios
n	Valor do expoente da equação de Freundlich – adimensional
pg	Picograma – corresponde a 10^{-12} g
pI	Ponto isoelétrico
pK	Constante de dissociação ácida
$P(q)$	Fator de forma das micelas
q^*	Capacidade de adsorção – quantidade de soluto (LPS) adsorvido por quantidade de adsorvente – em UE/mL
q_{max}	Capacidade máxima de adsorção – quantidade de soluto (LPS) adsorvido por quantidade de adsorvente – em UE/mL
R	Razão volumétrica entre as fases concentrada e diluída em micelas
%REC_{GFPuv}	Porcentagem de recuperação de GFPuv

%<i>REM</i>_{LPS}	Porcentagem de remoção de LPS
rpm	rotações por minuto
SAXS	Espalhamento de raios-X a baixos ângulos
SDFA	Sistema de duas fases aquosas
SMDFA	Sistema micelar de duas fases aquosas
<i>S(q)</i>	Função de interferência entre as partículas espalhadoras entre as micelas
t	tempo – em horas (h) ou segundos (seg)
T°C	Temperatura – em graus Celcius
T_{NÉVOA}	Ponto de névoa (<i>cloud point</i>)
TX-114	Tensoativo não-iônico polioxietileno p-t-octil fenol (Triton X-114)
UV	Luz ultravioleta (<i>Ultraviolet light</i>) – em nm
V	Volume da solução – em mL
<i>V_c</i>	Volume da fase concentrada (rica em micelas) – em mL
<i>V_d</i>	Volume da fase diluída (pobre em micelas) – em mL
<i>V_i</i>	Volume da solução estoque inicialmente adicionada no sistema – em mL
wt	Massa (<i>weight</i>) – em g

Letras gregas

ϕ_c	Fração volumétrica de tensoativo na fase concentrada – em % (p/p)
ϕ_d	Fração volumétrica de tensoativo na fase diluída – em % (p/p)
λ	Comprimento de onda – em nm ou Å

RESUMO

LOPES, A.M. **Remoção de endotoxina presente em meio fermentado contendo biomoléculas utilizando sistemas micelares de duas fases aquosas.** 2010. 141p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Foi investigada a utilização de Sistema Micelar de Duas Fases Aquosas (SMDFA) para remoção de lipolissacarídeos (LPS) de preparações contendo proteínas recombinantes de interesse farmacêutico, como a proteína verde fluorescente (GFPuv). Os SMDFA são constituídos por soluções de tensoativos contendo micelas e oferecem ambientes hidrofóbico e hidrofílico, que possibilitam seletividade na partição de biomoléculas de acordo com sua hidrofobicidade, permitindo a remoção de LPS contaminante. Neste trabalho, foi realizada a implementação do método para a quantificação de LPS em amostras contaminadas e a obtenção de LPS e GFPuv puros a partir de cultivo de *E. coli* recombinante. Além disso, foi estudada a influência do Triton X-114 na metodologia de quantificação de LPS, e a adição de MgSO_4 , CaCl_2 , KI e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na partição de GFPuv e LPS puros em SMDFA. E ainda, realizou-se um planejamento experimental (2^2) para avaliar os maiores K_{GFPuv} e $\% \text{REC}_{\text{GFPuv}}$. O homogeneizado celular de *E. coli* foi testado nas melhores condições obtidas com o planejamento experimental. E finalmente, o processo por cromatografia de afinidade por íons metálicos (IMAC) foi empregado para investigar a adsorção de LPS em matriz IDA- Ca^{2+} . Conforme os resultados obtidos, o TX-114 causou elevada interferência no método cinético cromogênico, em função da similaridade desta molécula com os LPS. Os LPS apresentaram partição preferencial para a fase concentrada em micelas, com altos valores de remoção, $\% \text{REM}_{\text{LPS}} > 98,0\%$. Ao contrário, a GFPuv foi recuperada preferencialmente na fase diluída, na qual existe maior volume disponível, resultando em valores de $K_{\text{GFPuv}} > 1$. A adição de sais ocasionou diminuição nos valores K_{GFPuv} , provavelmente por causa da carga negativa que GFPuv adquiriu nas condições avaliadas. Os resultados do planejamento experimental mostraram que a melhor condição de partição obtida foi na região do ponto central, 4,0% (p/p) a 60,0°C, com $K_{\text{GFPuv}} > 10$. O processo por IMAC apresentou as maiores capacidades de adsorção de LPS-IDA- Ca^{+2} nas condições de menor pH e maior força iônica 4,0 e 1,0 mol/L, respectivamente. O processo de purificação por SMDFA empregado para a remoção de LPS contaminante presente em meio fermentado contendo GFPuv, demonstrou ser eficiente em recuperar a biomolécula-alvo na fase diluída e separar o principal contaminante na fase rica em micelas. Portanto, pode ser empregado como primeira etapa para a remoção de altas concentrações de LPS na purificação de proteínas hidrofílicas como a GFPuv.

Palavras-chave: Triton X-114, endotoxinas, remoção de LPS, purificação de proteínas e GFPuv.

ABSTRACT

LOPES, A.M. ***Endotoxin removal from fermentation broth containing biomolecules using two-phase micellar system.*** 2010. 141p. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The Aqueous Two-Phase Micellar System (ATPMS) was investigated for endotoxin (LPS) removal from preparations containing recombinant proteins of pharmaceutical interest, such as the green fluorescent protein (GFPuv). These systems usually consist of micellar surfactants solutions and offer both hydrophobic and hydrophilic environments, providing selectivity to the biomolecules partitioning according to its hydrophobicity. In this work, the implementation of the method for LPS quantification in contaminated samples was accomplished, as well as the obtaining of pure LPS and GFPuv from recombinant *E. coli*. Furthermore, the influence of Triton X-114 in the methodology for LPS quantification was studied, as the addition of MgSO_4 , CaCl_2 , KI, and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ into the partition of pure GFPuv and LPS in ATPMS. In addition, a statistical design (2^2) was carried out to evaluate the highest K_{GFPuv} and $\% \text{REC}_{\text{GFPuv}}$. The *E. coli* cell lysate was tested under optimum conditions obtained with the statistical design. And, finally, the process by ion-metal affinity chromatography (IMAC) was used to investigate the adsorption of LPS in IDA- Ca^{2+} matrix. The results showed that the TX-114 caused high interference in the kinetic chromogenic method, according to the similarity of this molecule to LPS. The LPS showed preferential partitioning to the micelle-rich phase, with high values of removal, $\% \text{REM}_{\text{LPS}} > 98.0\%$. In the other hand, the GFPuv was preferentially recovered in the micelle-poor phase, in which there is greater volume available resulting in values of $K_{\text{GFPuv}} > 1$. The addition of salts caused a reduction in the values K_{GFPuv} , probably because of the negative charge that the GFPuv acquired at the conditions evaluated. The results of the statistical design showed that the best partitioning condition obtained was in the central point region, 4.0% (wt/wt) at 60.0 °C, with $K_{\text{GFPuv}} > 10$. The process by IMAC showed the highest adsorption of LPS-IDA- Ca^{+2} capacities at the conditions of lower pH and higher ionic strength 4.0 and 1.0 mol/L, respectively. The purification process for the LPS contaminant removal from *E. coli* fermentation containing GFPuv by ATPMS proved to be efficient in the recovering of target biomolecule in the micelle-poor phase, and separating the main contaminant in the micelle-rich phase. Furthermore, this system can be exploited as the first step for removal of higher LPS concentrations from hydrophilics protein purification.

Keywords: Triton X-114, endotoxins, LPS removal, protein purification and GFPuv.

INTRODUÇÃO

Em indústria biotecnológica o emprego de microrganismos, em especial bactérias, como sistemas hospedeiros para produção de substâncias de interesse clínico-terapêutico permite obter, de forma recombinante, diferentes biomoléculas que em geral são escassas em seu meio natural. Estas biomoléculas, por sua vez, podem ser expressas de forma extracelular solúvel, intracelular solúvel, como constituintes de membrana e corpos de inclusão. Nos três últimos casos faz-se necessário o uso de procedimentos de ruptura celular para recuperação da biomolécula de interesse, o que leva à liberação de grande quantidade de endotoxinas do tipo lipopolissacarídeos (LPS). Os LPS, quando presentes em preparações farmacêuticas injetáveis, podem induzir no paciente uma multiplicidade de respostas biológicas que vão desde febre à migração dos linfócitos, fixação do complemento, liberação de histamina e alterações de permeabilidade capilar, podendo culminar em choque séptico. A quantidade de LPS necessários para uma resposta pirogênica corresponde a doses de 1 a 10 ng/kg (MAGALHÃES et al., 2008; MAGALHÃES; PESSOA-JR, 2010; PRISTA et al., 1996).

Nesse aspecto, a produção em escala industrial de proteínas e outras biomoléculas de interesse comercial e biotecnológico depende estritamente das técnicas adotadas para a separação e/ou purificação. A sensibilidade térmica, a obtenção em baixas concentrações e a presença de contaminantes, entre outros fatores, prejudicam a purificação industrial e levam à utilização de inúmeras etapas e de técnicas de alto custo, tais como cromatografia de afinidade e de troca iônica (CHAMPLUVIER; KULA, 1992; CHANG et al., 1995; CHANG; CHASE, 1996; McCREATH et al., 1995). Com isso, o custo nos processos de purificação eleva-se, o que constitui um obstáculo para o acesso a estes reagentes de grande aplicação nos campos de pesquisa, terapia e diagnóstico. Assim, a pesquisa e o desenvolvimento de técnicas mais econômicas e simplificadas para a purificação de proteínas e remoção de contaminantes apresentam grande interesse (LOPES, 2006).

Dentre as técnicas atualmente estudadas para recuperação e/ou purificação de proteínas, especial ênfase tem sido dada à extração líquido-líquido devido à sua eficiência, versatilidade, baixa viscosidade, baixo custo,

curto tempo para a separação das fases e facilidade de ampliação de escala. O comportamento dinâmico desta técnica tem sido estudado para um melhor controle na ampliação de escala e de possíveis riscos ambientais envolvidos no processo (SIMON; OTTO, 2005).

O Sistema Micelar de Duas Fases Aquosas (SMDFA) é um tipo específico de extração líquido-líquido e pode ser utilizado para purificar proteínas recombinantes de interesse farmacêutico e remover moléculas de LPS contaminante. Nesta linha de pesquisa, estudos anteriores mostraram que a separação de fases por Triton X-114 pode ser aplicada para a remoção de altas concentrações de LPS, presentes em soluções contendo proteínas de interesse, etapa importante que auxiliaria na purificação destas biomoléculas (AIDA; PABST, 1990; ADAM et al. 1995; CHENG et al. 2009; COTTON et al., 1994; JENSEN et al. 2008, LIU et al. 1997; MERCALDI et al. 2008; REICHEL et al. 2006; ROZKOV et al. 2008; SCHÄDLICH et al. 2009).

Particularmente, o SMDFA baseia-se no fato de que certas soluções micelares, sob determinadas condições, são capazes de se separar espontaneamente em duas fases aquosas, ainda que imiscíveis, entre as quais proteínas e outras biomoléculas podem se distribuir desigualmente (LIU et al., 1998). As micelas oferecem simultaneamente ambiente hidrofóbico e hidrofílico, permitindo uma seletividade na partição de acordo com a hidrofobicidade da biomolécula (LIU et al., 1996).

Com base no potencial que esse processo apresenta para a purificação de proteínas e remoção de contaminantes, a pesquisa desta tecnologia faz-se importante e constitui o escopo desta tese de doutorado.

O presente trabalho encontra-se dividido em capítulos redigidos sob a forma de artigos. O Capítulo I consiste em uma revisão bibliográfica, o qual já foi publicado. Consequentemente, determinadas informações que constam no Capítulo I são repetidas no item *introdução* dos capítulos subsequentes. Destes artigos, aquele correspondente ao Capítulo III já foi aceito para publicação, enquanto os demais serão submetidos em periódicos especializados subsequentemente à defesa. Informações complementares aos capítulos estão inseridas sob a forma de Apêndices.

OBJETIVOS

Estudar, de forma teórica e prática, a utilização de sistemas micelares de duas fases aquosas para a remoção de LPS de meio fermentado contendo proteínas. Para que o objetivo proposto seja alcançado, os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

- ⇒ Obter LPS puro de cultivo de *Escherichia coli* DH5- α para utilização nos ensaios de partição;
- ⇒ Estabelecer a metodologia de determinação de concentração de LPS;
- ⇒ Avaliar a interferência do tensoativo Triton X-114 na metodologia de determinação de LPS e na metodologia de determinação da GFPuv;
- ⇒ Estudar o efeito da presença de LPS e da GFPuv na curva binodal do Triton X-114;
- ⇒ Estudar a influência de sais ($MgSO_4$, $CaCl_2$ e KI) na partição de LPS em SMDFA;
- ⇒ Avaliar a partição de LPS na presença da GFPuv oriundo do homogeneizado de *E. coli*, em SMDFA composto pelo tensoativo não-iônico Triton X-114;
- ⇒ Determinar características estruturais e físico-químicas entre as moléculas de Triton X-114 e LPS, através do estudo de espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS).

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

MÉTODOS DE REMOÇÃO DE ENDOTOXINAS DE PREPARAÇÕES BIOLÓGICAS: REVISÃO

METHODS OF ENDOTOXIN REMOVAL FROM BIOLOGICAL PREPARATIONS: A REVIEW

**Pérola O. Magalhães¹, André M. Lopes³, Priscila G. Mazzola³, Carlota
Rangel-Yagui², Thereza C. V. Penna³ e Adalberto Pessoa Jr.³**

¹School of Health Sciences, University of Brasília

²Department of Pharmacy, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo.

³Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo

Publicado no *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* (v.10, p.271-287, 2007) com adaptações.

1.1. INTRODUÇÃO

As endotoxinas são lipopolissacarídeos (LPS) derivados da membrana celular de bactérias Gram-negativas e são responsáveis pela sua organização e estabilidade. Em indústrias farmacêuticas, é possível encontrar endotoxinas durante os processos de produção ou no produto final. Apesar dos LPS estarem ligados à parede celular bacteriana, estes podem ser continuamente liberados ao meio. A liberação não acontece somente com a morte das células, mas também durante o crescimento e divisão celular. Além disso, sabendo que muitas bactérias crescem em meios pobres de nutrientes, como em águas, solução salina e solução tampão, é possível encontrar LPS em quase todos os ambientes.

A presença dos LPS, no entanto, é indesejável devido à sua potente atividade biológica que causa efeitos patofisiológicos no hospedeiro. Em condições de exposição aos LPS, mesmo em concentrações muito baixas (<1,0 UE/mL), uma resposta inflamatória sistêmica pode ocorrer, levando a múltiplos efeitos fisiopatológicos, tais como choque endotóxico, lesão tecidual, e morte (ANSPACH, 2001; ERRIDGE et al., 2002; OGIKUBO et al., 2004). Contudo, os LPS não agem diretamente contra as células ou órgãos, mas através da ativação do sistema imune, especialmente através de monócitos e macrófagos, com a liberação de uma série de mediadores pró-inflamatórios, como o fator de necrose tumoral (TNF) e interleucinas (IL-6 e IL-1). O nível máximo de LPS por aplicação em via intravenosa de produtos farmacêuticos e biológicos é definido como 5,0 UE por kg de peso por hora, preconizado em todas as farmacopéias (DANESHIAN et al., 2006). O termo UE descreve a atividade biológica de uma endotoxina. Por exemplo, 100 pg de uma endotoxina padrão EC-5 e 120 pg de endotoxina proveniente de *E. coli* O111:B4 têm atividade de 1,0 UE (DANESHIAN et al., 2006).

Na indústria biotecnologia, bactérias como *E. coli* são amplamente utilizadas para obter bioprodutos a partir de DNA recombinante, tais como peptídeos e proteínas; conseqüentemente, estes produtos estão contaminados com LPS (HIRAYAMA; SAKATA, 2002). Por esta razão, biomoléculas obtidas a partir de bactérias Gram-negativas devem ser livres de LPS para não induzir nenhum tipo de efeito quando administradas em animais ou seres humanos. No entanto, os LPS são moléculas muito estáveis, resistindo a extremas

variações de temperaturas e de pH em comparação com as proteínas (HIRAYAMA; SAKATA, 2002; PETSCH; ANSPACH, 2000). Diferentes processos têm sido desenvolvidos para a remoção de LPS de proteínas, baseados nas propriedades físico-químicas desta molécula. Estes processos incluem resinas de afinidade por LPS, extrações por duas fases aquosas, ultrafiltração, cromatografia de interação hidrofóbica, cromatografia de troca-iônica, entre outros. Estes procedimentos promovem diferentes graus de sucesso na separação de LPS de proteínas, que são estritamente dependentes das propriedades da biomolécula de interesse (LIN et al., 2005).

O objetivo deste capítulo é discutir aspectos relevantes quanto às principais técnicas de remoção de LPS de preparações biotecnológicas, considerando suas propriedades químicas e biológicas.

1.1.1. LPS e Suas Propriedades Físico-Químicas

As bactérias Gram-negativas apresentam toxinas estáveis que constituem a estrutura da membrana celular, os LPS (também conhecidos como endotoxinas ou pirogênios), os quais participam na interação com o ambiente e com possíveis hospedeiros (PARK et al., 2004). Ainda que ligados às células, os LPS são continuamente liberados no meio (PILUSO; MARTINEZ, 1999).

Em geral, os lipopolissacarídeos apresentam estrutura anfifílica composta de uma cabeça polar heteropolissacarídica e uma cauda apolar (lipídeo), como esquematizado na Figura 01. Na maioria das espécies, estes LPS são constituídos por três regiões distintas: (a) a região O-Antígeno, que é variável e define a sorologia e identidade da bactéria; (b) a Região Interna oligossacarídica, que corresponde a uma estrutura conservada dentre as bactérias sendo que até o momento foram definidos 5 tipos diferentes; e (c) a Região lipídica ou lipídeo A, que é altamente conservada (RAETZ, 1990). A região lipídica mantém a molécula ligada à membrana, enquanto que a região heteropolissacarídica, constituída do interior oligossacarídico e da superfície antigênica, é exposta ao ambiente.

Figura 01. Estrutura química dos LPS de *E. coli* O111:B4 de acordo com Ohno e Morrison (1989). Abreviações: Hep (L-glicerol-D-mano-heptose); Gal (galactose); Glc (glicose); KDO (ácido 2-ceto-3-deoxioctônico); NGa (N-acetil-galactosamina) e NGc (N-acetil-glicosamina).

O lipídeo A é responsável pela maioria das atividades biológicas da molécula; ou seja, corresponde pela ação tóxica da mesma (MAYER; WECKESSER, 1984; PETSCH; ANSPACH, 2000; VAARA; NURMINEM, 1999). É composto de um dissacarídeo de glucosamina, altamente substituído por ácidos graxos de cadeia longa com grupamentos amida e éster. O ácido graxo com ligação amida mais comum, com cadeia de 14 carbonos, é o ácido 3-hidroximirístico. Os ácidos graxos com ésteres ligados são mais variáveis e comumente incluem os ácidos cáprico, láurico, mirístico, palmítico e esteárico (PINTO et al., 2000). Essa parte hidrofóbica da molécula dos LPS organiza-se em uma forma hexagonal, resultando em uma estrutura mais rígida, quando comparada com o restante da molécula. Até o momento, não são conhecidos LPS livres de lipídeo A (LIN et al., 2005; PETSCH; ANSPACH, 2000; RIETSCHHEL et al., 1994).

O oligossacarídeo possui sua estrutura formada por uma região com o ácido 2-ceto-3-deoxioctônico (KDO) ligado a heptoses e outra região ligada a hexoses. O KDO está sempre presente na molécula de LPS e vem sendo utilizado como um indicador na análise de LPS (Figura 02). Em *E. coli* cinco diferentes tipos de sequência de oligossacarídeo são conhecidas. Na espécie *Salmonella* somente uma sequência foi descrita (PINTO et al., 2000). Os oligossacarídeos próximos à região lipídica e o lipídeo A são parcialmente fosforilados ($pK_1=1,3$; $pK_2=8,2$ dos grupos fosfatos no lipídeo), dessa maneira as moléculas de LPS exibem carga negativa em soluções com pH superiores a 2,0 (HOU; ZANIEWSKI, 1990).

Figura 02. Membrana interna e externa de *E. coli* K-12 de acordo com Raetz et al. (1991). Nos LPS os desenhos ovais e retangulares representam resíduos de açúcares, enquanto círculos representam grupos com cabeça polar de vários lipídeos.

A região do O-antígeno é geralmente composta por uma sequência de oligossacarídeos idênticos (3-8 monossacarídeos cada), os quais são específicos para cada espécie de bactéria e determinam a identidade sorológica da respectiva bactéria, permitindo a identificação de mais de 1000 sorotipos de *Salmonella* e mais de 100 de *E. coli* (PETSCH; ANSPACH, 2000).

A massa molecular de um monômero de endotoxina varia entre 2,5 e 70 KDa, devido à variabilidade da cadeia de oligossacarídeo. As massas

moleculares de 2,5 são deficientes em O-Antígeno e de 70 KDa apresentam O-Antígeno muito longo. Estudos demonstraram que os LPS podem formar vários agregados supramoleculares em solução aquosa, pois sua estrutura apresenta caráter anfipático. Provavelmente isso ocorra devido às interações não polares entre cadeias lipídicas, bem como ligações geradas entre os grupos fosfato por cátions divalentes (ANSPACH, 2001).

Os agregados formados vêm sendo estudados por microscopia eletrônica e outras técnicas analíticas, tais como difração de raios-X, espectroscopia FT-IR e RMN (ressonância magnética nuclear). Os resultados têm mostrado que os LPS em soluções aquosas podem agregar-se em diferentes estruturas, formando arranjos invertidos cúbicos e hexagonais, como micelas e vesículas, com diâmetros acima de 0,10 μm e tamanho molecular superior a 1.000 KDa (vesículas), com alta estabilidade, dependendo das características da solução como pH, presença de íons, tensoativos, entre outros (DARKOW, 1999; GORBET; SEFTON, 2006).

Como mencionado anteriormente, estas moléculas são altamente estáveis à temperatura e não são destruídas em processos de esterilização (121,0°C por 30 minutos, calor úmido), sendo necessária uma temperatura de 250,0°C por mais que 30 minutos ou 180,0°C por mais que 3 horas para a inativação da molécula de LPS (GORBET; SEFTON, 2006; RYAN, 2004). Os LPS são destruídos também por determinados agentes oxidantes, como permanganato de potássio, mistura sulfocrômica, água oxigenada, entre outros, dependendo, contudo, do tempo de contato utilizado. Soluções de ácidos e bases devem apresentar concentração maior que 0,10 mol/L para serem capazes de inativar os LPS em equipamentos de laboratório (PRISTA et al., 1996).

1.1.2. Mecanismos de Ação dos LPS

Os LPS exercem seus efeitos quando as bactérias Gram-negativas morrem e a parede celular sofre lise, liberando-os no meio. Os antibióticos usados para tratar doenças causadas por bactérias Gram-negativas podem lisar as células bacterianas; essa reação libera os LPS, e pode levar a uma piora imediata dos sintomas, mas a condição usualmente melhora à medida em que os LPS são degradados. Os principais sintomas do hospedeiro são

calafrios, febre, fraqueza, dores generalizadas e, em alguns casos, choque, podendo até mesmo levar o indivíduo a óbito. Outra consequência da ação dos LPS é a ativação das proteínas da coagulação do sangue, causando a formação de pequenos coágulos. Esses coágulos obstruem os capilares, e o resultante suprimento sanguíneo diminuído induz à morte dos tecidos. Essa condição é referida como coagulação intravascular disseminada (TORTORA et al., 2000).

A ação biológica dos LPS está associada à porção lipídica da molécula. Porém, a porção O-Antígeno dos LPS é responsável, em grande parte, pela antigenicidade específica das bactérias Gram-negativas, que responde por milhares de sorotipos. A perda do O-Antígeno resulta na perda da virulência, e sugere que esta porção é importante durante a interação parasita-hospedeiro. Endotoxinas “mutantes”, livres dessa porção, são mais susceptíveis a serem fagocitadas e eliminadas. Mutantes ausentes da porção lipídica não foram isolados, exceto em condições letais, segundo Beutler e Cerami (1988), os quais acreditam que essa região deva ser essencial para a viabilidade da célula.

No caso de humanos, esses são extremamente sensíveis aos LPS; observa-se que quantidades muito pequenas são suficientes para deflagrar o estado de choque. Frente à infecção por bactérias Gram-negativas, o indivíduo está exposto tanto ao LPS ligado à membrana da bactéria, quanto à endotoxina livre (fragmentos da parede celular), que normalmente é liberada durante a multiplicação bacteriana. Os LPS são capazes de induzir as células mononucleares humanas (MNC) a produzirem interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF), que são duas citocinas integrantes da resposta imune (MICHIE et al., 1988). Dentre os múltiplos efeitos biológicos da IL-1 destaca-se: a febre (ação no hipotálamo), a neutrofilia (ação na medula óssea), a proliferação de colágeno (estímulo de fibroblastos), a liberação de aminoácidos dos músculos, a produção de IL-2 (ação nas células T) e a produção de anticorpos (ação nas células B) (MICHIE et al., 1988). Os LPS interagem com diferentes fases do sistema imunológico. Após penetrarem na circulação, ligam-se a lipoproteínas plasmáticas, que resulta em redução de sua atividade biológica. Mesmo assim, ativam o complemento, induzem a coagulação, afetam a função hepática e o sistema neuro-endócrino. Essa diversidade de

respostas fisiológicas leva à eliminação dos LPS, seus fragmentos, e até mesmo de bactérias Gram-negativas. Porém, devido às altas concentrações ou maior sensibilidade aos LPS, as ações do sistema imunológico tornam-se incontroláveis e insuficientes para o organismo (SANTOS, 2000).

Nos últimos 15-20 anos inúmeros esforços têm sido feitos para desenvolver proteínas terapêuticas, baseadas em anticorpos IgG e IgM, que visam a proteção contra a intoxicação por LPS, um problema comum em hemodiálises e infecções bacterianas agudas. Apesar de mostrarem-se promissoras, as tentativas clínicas não obtiveram sucesso, sendo uma das razões a grande variedade das estruturas químicas dos LPS (BAUMGARTNER; GLAUSER, 1993; DI PADOVA et al., 1993; TENG et al., 1985; ZIEGLER et al., 1991).

Figura 03. Mecanismo proposto pelo qual os LPS causam febre. Adaptado de Tortora et al. (2000).

Em síntese, acredita-se que a febre (resposta pirogênica) causada por LPS ocorra como ilustrado na Figura 03. Quando as bactérias Gram-negativas são ingeridas por células fagocíticas (etapa 1) e degradadas em vacúolos (etapa 2), os LPS da parede celular bacteriana é liberado. Estes LPS induzem

a formação de pequenas moléculas protéicas pelos macrófagos, denominadas interleucinas-1 (IL-1), que são transportadas pelo sangue até o hipotálamo (etapa 3). A IL-1 induz o hipotálamo a liberar lípideos denominados prostaglandinas (etapa 4), que reajustam o termostato do hipotálamo a uma temperatura maior, o resultado dessa sequência de reações é a febre (TORTORA et al., 2000).

O choque séptico (ou choque endotóxico) está relacionado à secreção de uma substância pelos macrófagos. A fagocitose de bactérias Gram-negativas faz com que os fagócitos secretem um polipetídeo denominado fator de necrose tumoral. Este fator liga-se a muitos tecidos no organismo, e um dos seus efeitos é lesar os capilares sanguíneos; sua permeabilidade é aumentada, e eles perdem grandes quantidades de líquido. O resultado é uma queda na pressão arterial que leva ao choque. Essa pressão baixa tem efeitos sérios sobre os rins, pulmões e no trato gastrointestinal. A presença de LPS no organismo não desencadeia a formação de antitoxinas efetivas para conter o efeito de toxicidade (TORTORA et al., 2000).

1.1.3. Técnicas para Determinação de LPS

Devido à heterogeneidade dos produtos de uso farmacêutico com potencial presença de LPS, diferentes técnicas foram desenvolvidas para detectar e quantificar endotoxinas. Assim, a quantificação de LPS em preparações parenterais de vacinas requer um estrito controle de qualidade. Para este caso, dois procedimentos são comumente utilizados para a determinação de LPS: são eles o teste de pirogênio em coelhos e o ensaio de lisado do amebócito *Limulus* (LAL) (PARK et al., 2005). As Farmacopéias Americana e Brasileira, atualmente, especificam estes dois testes como indicados para determinação da presença de endotoxinas em produtos de uso farmacêutico em geral, que seguem as diretrizes do *Food and Drug Administration* - FDA (FDA, 1987) e da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (ANVISA, 2004), respectivamente.

Monócitos, macrófagos e células derivadas de células mononucleares estão sendo utilizadas em teste *in vitro* para detecção de endotoxinas. Porém, o uso de células mononucleares isoladas de humanos ainda está restrito à

pesquisa científica, devido aos problemas práticos e éticos que envolvem o uso dessas células (GAINE DAS et al., 2004).

1.1.3.1. Teste de LPS Através do Lisado de Amebócito de *Limulus*

O princípio biológico do teste do LAL decorre da coagulação do sangue isolado de um caranguejo, denominado *Limulus polyphemus* (Figura 04), quando seu sangue entra em contato com LPS. Em 1885, Howell descreveu esse processo de coagulação sanguínea, porém só na década de 1950 os estudos realizados por Bang (1953) correlacionaram essa coagulação com a presença de bactérias Gram-negativas, no *Marine Biological Laboratory*, em *Massachusetts* (WILLIAMS, 2001). Posteriormente, Levin e Bang (1964) descobriram que a reação é enzimática, que as enzimas estão localizadas nos grânulos dos amebócitos do caranguejo e que a coagulação é iniciada pela presença de LPS. No desenvolvimento de um anticoagulante adequado para o sangue do *Limulus*, esses mesmos autores prepararam um lisado a partir de amebócitos lavados e descobriram um indicador extremamente sensível na presença de LPS (WILLIAMS, 2001).

A primeira aplicação da reação descoberta por Bang e Levin foi realizada por Cooper et al. (1970), que utilizaram um pré-gel para determinar o conteúdo de LPS em um radiofármaco. Em sequência a esses estudos, Young et al. (1972) purificaram e caracterizaram esse indicador, que é a proteína coagulável do LAL, e demonstraram que a reação com LPS era enzimática. Em 1979, Teller e Kelly demonstraram que a ativação do lisado de LPS poderia ser monitorada por fotometria (CAMBREX CATALOG A, and B, 2007). Com o aprimoramento do teste *in vitro* unidades de manufatura de produtos farmacêuticos passaram a incluir no controle de qualidade de seus produtos o teste de LPS utilizando LAL. Os testes começaram a ser realizados não somente no produto acabado, mas também no início, no meio e no final do processo de produção de alguns fármacos.

Figura 04. Caranguejo Ferradura (*Limulus polyphemus*). Também conhecido como límulos, são normalmente encontrados no Golfo do México e ao longo das costas do Atlântico Norte.

Fonte: <http://www.enature.com/fieldguides/detail.asp?recnum=SC0040>

Em dezembro de 1987, o FDA publicou o “Guia de Validação do Teste de Lisado do Amebócito *Limulus* como um Teste de Endotoxina para Produtos Acabados Parenterais, Produtos Biológicos e Dispositivos Médicos de Uso Humano e Animal”, estabelecendo os limites de LPS para dispositivos farmacêuticos e médicos, a validação do uso de LAL como teste de LPS de produto acabado e o desenvolvimento de um protocolo de teste de rotina.

Atualmente três métodos diferentes são descritos na USP24 (Farmacopéia Americana) e aplicados na execução do teste do LAL (USP, 1999). O mais utilizado é o Teste do Coágulo ou Formação de Gel. Os outros métodos, denominados Cinético Turbidimétrico e Cromogênico, são mais sensíveis e sofisticados. No entanto, exigem equipamentos mais complexos, como por exemplo, uma incubadora com leitor de microplacas e um *software* específico acoplado.

1.1.3.2. Teste do Lisado de Amebócito de *Limulus* por Gel Clot

O teste de LAL pela técnica do coágulo é qualitativo para endotoxina bacteriana. Neste teste, o lisado do amebócito *Limulus*, apresentado sob a forma de liofilizado, deve ser reconstituído com água apirogênica e misturado em partes iguais com a solução a ser analisada (CAMBREX CATALOG A, and B, 2007).

Após incubação, e na presença de LPS, ocorre formação do coágulo ou gel. Na ausência de LPS o coágulo não é formado. Esse teste fornece resultados binários, ou seja, positivo ou negativo, conforme a formação de

coágulo ou não. Portanto é um teste objetivo, apesar de não ser quantitativo. A reação no tubo de ensaio é essencialmente a mesma que ocorre na natureza quando um caranguejo *Limulus* é infectado.

A endotoxina de bactérias Gram-negativas catalisa a ativação de uma pró-enzima no lisado do amebócito *Limulus*. A taxa de ativação inicial da pró-enzima é determinada pela concentração de LPS presente e pela presença de cátions divalentes. A enzima ativada (*limulus clotting enzyme*, EC 3.4.21.86) hidrolisa regiões específicas de uma proteína coagulável também presente no lisado do amebócito *Limulus*. Uma vez hidrolisada, a coagulina resultante se auto-associa e forma um coágulo gelatinoso, conforme exemplificado na Figura 05 (WILLIAMS, 2001).

Figura 05. Reação enzimática para a formação do coágulo gelatinoso na presença de LPS.

Essa técnica é padronizada para detectar concentrações de 0,05-0,25 UE/mL de LPS de *E. coli*. A reação do LAL é mediada pela enzima *limulus clotting* e, como tal, possui uma faixa ótima de pH (6,0-8,0) e exigências específicas de salinidade e cátion divalente como Mg^{2+} e Ca^{2+} , por exemplo.

O teste é realizado em tubos de ensaio, onde a reação positiva é caracterizada por um gel firme que permanece, momentaneamente, intacto quando o tubo é invertido. Isto deve ser observado no controle positivo da amostra. A reação negativa é caracterizada pela ausência de uma coagulação sólida após a inversão. Isto deve ser observado no controle negativo. O lisado pode apresentar uma turbidez ou viscosidade aumentada, o que é considerado um resultado negativo. Os resultados positivos e negativos devem ser registrados para cada frasco da amostra de teste. Ocasionalmente as amostras de teste podem alterar estas condições ótimas a tal extensão que o lisado se torna insensível ao LPS. Resultados negativos com amostras que inibem o teste LAL não indicam, necessariamente, a ausência de LPS. Encontra-se descrito na literatura a interferência de glucanas e peptidoglicanas nos testes

de determinação de LPS através do LAL, gerando um resultado falso positivo (DANESHIAN et al., 2006; LIEBERS et al., 2006). A avaliação destes efeitos é efetuada contaminando-se a amostra na diluição em que é testada com quantidades determinadas de LPS bacteriana, de forma a verificar se a amostra interfere (inibe ou potencializa) a reação de formação do gel (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2007). Os resultados obtidos em três lotes diferentes de um produto devem ser adequados para que o método possa ser considerado validado para o produto em questão (LOURENÇO et al., 2005).

1.1.3.3. Teste do Lisado de Amebócito de *Limulus* – Método Turbidimétrico e Cromogênico

Os testes cinéticos turbidimétrico e cromogênico utilizando LAL são quantitativos na determinação da concentração de LPS de bactérias Gram-negativas. Esses dois testes também se baseiam no estudo realizado por Levin e Bang (1964) e por Young et al. (1972). Sendo que, o teste turbidimétrico mede por espectrofotometria a 340 nm o aumento da turvação (densidade ótica) que precede a formação do coágulo gelatinoso quando o LAL encontra-se na presença de LPS. Entretanto, no teste cinético a enzima ativada (*limulus clotting enzyme*) hidrolisa um substrato incolor Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA, liberando a p-nitroanilina (pNA), gerando a formação de cor na solução (Figura 06).

Figura 06. Reação enzimática para a liberação da pNA na presença de LPS.

As concentrações de LPS presentes nas amostras são calculadas nos dois métodos a partir do tempo de reação de cada amostra, por comparação ao tempo de reação de soluções contendo quantidades conhecidas de padrão de LPS, utilizadas na construção da curva padrão de cada método. Devido à larga faixa de concentração em que os valores de LPS podem ser determinados, é possível ajustar a faixa quantitativa de qualquer teste dado através do ajuste da concentração dos padrões de LPS usados para gerar a curva-padrão. Um

mínimo de três padrões é requerido. O ensaio LAL turbidimétrico foi otimizado para ser linear de 0,01-100,0 UE/mL, enquanto o ensaio LAL cinético foi otimizado para ser linear entre 0,005-50,0 UE/mL (USP, 2002).

Como parte de um ensaio de rotina, o usuário do método tem a opção de incluir um controle positivo de produto (PPC) para monitorar o desenvolvimento ou inibição do produto. Um PPC é a amostra contaminada com uma quantidade conhecida de LPS. Calcula-se a quantidade de LPS presente no PPC, possibilitando uma comparação com a quantidade conhecida de LPS contaminado. Em um ensaio de inibição, a solução contaminada (PPC) é testada juntamente com a amostra não contaminada (USP, 2002).

Pode ocorrer inibição do produto por substâncias presentes na amostra, causando interferência na reação com o LAL. Nos ensaios cinéticos de LAL essa inibição resulta em um tempo de reação mais longo, indicando concentração mais baixa de LPS do que realmente podem estar presentes na amostra de teste. A falta de inibição do produto deve ser determinada para cada amostra específica, não diluída ou com uma diluição apropriada.

Algumas amostras podem interferir no método de análise. No entanto, considerando que a leitura inicial de absorbância de cada amostra é usada como seu próprio branco, as amostras que possuírem coloração significativa em si não representam um problema em especial. Amostras que possuem turbidez significativa podem requerer clarificação anterior ao teste turbidimétrico, por centrifugação, filtração ou diluição; porém, podem ser analisadas pelo método cromogênico. Em suma, a sensibilidade e a segurança dos métodos cinéticos têm levado ao crescimento do seu emprego nas indústrias farmacêuticas (PARK et al., 2005; WILLIAMS, 2001).

1.1.4. Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas

O Sistema Micelar de Duas Fases Aquosas (SMDFA) é um tipo específico de extração líquido-líquido que explora o fato de algumas moléculas de tensoativo, sob determinadas condições, serem capazes de se separar espontaneamente em duas fases aquosas, ainda que imiscíveis, sendo que proteínas e outras biomoléculas podem se distribuir de forma desigual entre essas fases (LIU et al., 1998).

Agentes tensoativos são moléculas anfifílicas compostas por uma porção hidrofílica, região da molécula que possui afinidade pela molécula de água e que é denominada de "cabeça polar", ou simplesmente "cabeça", e uma porção hidrofóbica, região da molécula que não possui afinidade pela molécula de água e que é denominada de "cauda apolar", ou simplesmente "cauda" (Figura 07).

Figura 07. Estrutura do monômero de um tensoativo, na qual pode ser visualizada a porção da cabeça polar de caráter hidrofílico, e a porção da cauda apolar de caráter hidrofóbico.

Os tensoativos podem ser classificados em: (a) iônicos, que possuem cabeça positivamente ou negativamente carregada; (b) não-iônicos, possuindo cabeça polar capaz de realizar ligações de hidrogênio com a água; e (c) zwitteriônicos, possuindo cabeça caracterizada por um dipolo. Dodecil sulfato de sódio (SDS), brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), polioxietileno p-t-octil fenol (Triton X-114) e dioctanoilfosfatidilcolina (C8-lecitina) são exemplos de tensoativos aniônico (carregado negativamente), catiônico (carregado positivamente), não-iônico e zwitteriônico, respectivamente (ISRAELACHVILI, 1991).

Em solução aquosa as moléculas tensoativas podem exibir diversos tipos de comportamento, dependendo da concentração e características da solução. Em soluções com concentração de tensoativo abaixo da concentração micelar crítica (CMC), específica para cada tensoativo, as moléculas deste deslocam na interface ar-água, projetando suas caudas apolares em direção à fase ar de forma a minimizar o contato com a água. Esse fenômeno explica a terminologia inglesa *surfactant* (*surface-active agent*). A maioria dos

tensoativos apresenta solubilidade mínima na fase aquosa, devido ao caráter hidrofóbico do grupo apolar. Por outro lado, em soluções com concentrações de tensoativos superiores à CMC, além da adsorção na interface, as moléculas desses formam agregados conhecidos como micelas, nos quais as caudas hidrofóbicas se associam no interior, minimizando o contato com a água, e as cabeças polares permanecem na periferia das micelas, que maximizam seu contato com a água (CHEVALIER; ZEMB, 1990; TANFORD, 1980).

A formação de micelas reflete um balanço complexo de várias forças intermoleculares, que incluem interações de van der Waals, eletrostáticas, estéricas, hidrofóbicas e ligações de hidrogênio (TANFORD, 1980; ISRAELACHVILI, 1991). O efeito hidrofóbico associado às caudas apolares constitui a principal força atrativa. A força repulsiva contrária é resultado das interações estérica (existente entre as cabeças hidratadas de tensoativos não-iônicos) e eletrostática (existente entre as cabeças, possuindo cargas idênticas) associadas às cabeças hidrofílicas. O processo de micelização é resultado do balanço entre essas forças atrativas e repulsivas (KAMEI, 2001).

O efeito hidrofóbico é governado pelo ganho em entropia que ocorre quando o contato entre as caudas apolares e as moléculas de água é minimizado. Apesar de haver perda de entropia translacional das moléculas de tensoativo com a formação de micelas, ocorre aumento significativo da entropia translacional das moléculas de água que rodeiam as caudas hidrofóbicas. Esse aumento de entropia das moléculas de água possui maior efeito, pois as moléculas de água encontram-se em maior quantidade (TANFORD, 1980).

Assim, ocorre a formação de micelas, que são entidades dinâmicas formadas pela agregação não-covalente de monômeros de tensoativos, podendo ser esféricas, cilíndricas ou planas (discos ou bicamadas). A forma e o tamanho das micelas podem ser modificados trocando-se a estrutura química do tensoativo, bem como variando as condições da solução, que incluem temperatura, concentração do tensoativo, composição dos tensoativos (em caso de sistemas mistos), força iônica e pH (RANGEL-YAGUI et al., 2004).

De um modo mais específico, uma solução aquosa de tensoativo não-iônico é capaz de se separar macroscopicamente em duas fases, com o aumento da temperatura, que resulta num ambiente concentrado, rico em micelas e outro diluído, pobre em micelas, como mostra a Figura 08. Como a

concentração do tensoativo em ambas as fases excede a CMC, micelas estão presentes tanto na fase superior quanto na fase inferior (LIU et al., 1996). Ambas as fases contêm micelas cilíndricas ou esféricas, as quais podem ser modeladas como micelas formadas por um corpo cilíndrico terminado em duas micelas esféricas nas extremidades (PUVVADA; BLANKSCHTEIN, 1990; VAN ROOSMALEN et al., 2006; ZOELLER et al., 1997).

Figura 08. Representação esquemática de um sistema micelar de duas fases aquosas para o tensoativo não-iônico Triton X-114. O sistema exibe uma única fase a baixas temperaturas; com o aumento da temperatura, se separa em uma fase rica em micelas (fase concentrada - F_c) que coexiste com uma fase pobre em micelas (fase diluída - F_d). Adaptado de Nikas et al. (1992).

Contudo, as micelas presentes na fase micelar (concentrada em micelas – F_c) são maiores (mais alongadas) e mais numerosas do que as presentes na fase pobre em micelas (fase diluída – F_d). A distinção no ambiente físico-químico das duas fases formadas é a base da utilização dos sistemas que envolvem processos de extração de materiais biológicos (LIU et al., 1996).

O êxito desse sistema depende da habilidade em manipular a composição das fases, influenciando no coeficiente de partição da biomolécula de interesse e na seletividade. Existem muitas possibilidades para manipular a composição do sistema de forma a obter fases com características diferenciadas, como por exemplo: (a) escolha dos agentes tensoativos e de sua concentração; (b) escolha da temperatura de partição do ensaio; (c) escolha do tampão e da força iônica; e (d) modificação química do tensoativo ligado à molécula com afinidade à biomolécula-alvo (XU et al., 2003).

Esse princípio de separação tem sido extensamente utilizado com sucesso na extração e na purificação de inúmeros materiais biológicos, tais como proteínas (LAM et al., 2005; LINDER et al., 2004; VAN ROOSMALEN et al., 2006), vírus (KAMEI et al., 2002a), antibióticos (LEE; SU, 1999), extração de proteína-alvo de cultura não clarificada de microorganismos (DIAS et al., 2000), separação de proteínas em larga escala (MINUTH et al., 1996; SELBER et al., 2004), DNA e ácidos nucleicos (DIAS et al., 2000), solubilização de membrana (EVERBERG et al., 2006), proteínas geneticamente modificadas (SELBER et al., 2004; MAZZOLA et al., 2006; LOPES et al., 2010), enzimas (LOPES et al., 2008; RANGEL-YAGUI et al., 2003), peptídeos (JOZALA et al., 2008), entre outros.

A utilização dos SMDFA para remoção de moléculas contaminantes como os LPS, consiste em uma estratégia interessante já que se acredita que as moléculas de LPS sejam estruturadas em agregados micelares mistos na fase concentrada em micelas. Essas interações possivelmente ocorrem por interações apolares de cadeias alquil do lípideo A e pela cauda apolar dos tensoativos. Assim, com a separação das fases pela elevação da temperatura, moléculas de LPS podem ser removidas na fase concentrada em micelas (F_c). Nesse sentido, o SMDFA composto por Triton X-114 que apresenta um ponto de névoa ($T_{NÉVOA}$) de aproximadamente 25,0°C (1,0% (p/p)), mostra-se vantajoso para a purificação de biomoléculas termosensíveis (AIDA; PABST, 1990; BORDIER, 1981; LIU et al., 1996).

O tema sobre a remoção de LPS tem ocupado muitos pesquisadores e tem sido o motivo de muitas pesquisas científicas. A discussão de aspectos pertinentes no tocante à remoção de LPS de preparações biológicas, bem como uma ampla revisão das pesquisas existentes são obrigatórias para elucidação de estudos futuros.

Afinal de contas, as moléculas de LPS podem ser consideradas estáveis frente à temperatura e pH; conseqüentemente, a remoção dessas substâncias se torna uma das tarefas mais difíceis nos processos de purificação de biomoléculas de interesse produzidas por bactérias Gram-negativas (SHARMA, 1986; REICHEL et al., 2006). A remoção dos LPS se torna mais desafiadora quando associada a biomoléculas sensíveis à temperatura e ao pH, como as proteínas por exemplo (KANG; LUO, 1998). Inúmeros métodos são

tradicionalmente utilizados para reduzir a contaminação por LPS de preparações protéicas, incluindo cromatografia de troca-iônica, adsorção por afinidade, como L-histidina imobilizada, poli-L-lisina, polimixina B, cromatografia de filtração em gel, ultrafiltração, centrifugação de gradiente de sacarose e separação de fases por Triton X-114 (AIDA; PABST, 1990; ANSPACH; HILBECK, 1995; LIU et al., 1997; MATSUMAE et al., 1990; MITZNER et al., 1993; SAKADA et al., 1993; TAKEDA, 1988; WEBER et al., 1995). O ponto fundamental para o sucesso destas técnicas de remoção de LPS dependerá das características físico-químicas da biomolécula-alvo requerida (LIN et al., 2005).

Algumas técnicas geralmente empregadas para remoção de LPS são ultrafiltração e cromatografia de troca-iônica. A ultrafiltração, embora efetiva, remove LPS da água e é um método ineficiente na presença de proteínas que podem ser danificadas por forças físicas (PYO et al., 2001; SHIBATANI et al., 1983; SWEADNER et al., 1977). Para a remoção de LPS de preparações de proteínas recombinantes, a solução de proteína pode atravessar uma coluna que contém polimixina B imobilizada em Sefarose 4B, com o objetivo de que o contaminante seja capturado pela coluna. Similarmente, histidina também imobilizada em Sefarose 4B tem capacidade para capturar LPS de soluções protéicas, já que apresenta afinidade pelos grupos fosfato presentes na estrutura dos LPS, e também pode ser um método empregado na remoção deste contaminante (MATSUMAE et al., 1990).

Outro processo utilizado para a remoção de LPS, a cromatografia de troca-iônica, possui a vantagem em apresentar redes negativamente carregadas e tem sido extensivamente usada para adsorção de moléculas de LPS. Porém, quando proteínas negativamente carregadas necessitam ser purificadas, elas podem co-adsorverem sobre a matriz e causar perda significativa do material biológico de interesse. E ainda, proteínas positivamente carregadas podem formar complexos com os LPS, o que pode causar assim um arraste das proteínas pelos LPS ao longo da coluna, e consequentemente, minimizarem a eficiência do processo de purificação (ANSPACH; HILBECK, 1995).

Alguns trabalhos encontrados na literatura que mostram a utilização do processo por SMDFA como etapa para a remoção de LPS, foram investigados

por Adam et al. (1995). Esses autores, utilizando o tensoativo Triton X-114, mostraram uma redução de LPS de 100 vezes em duas etapas, com uma concentração final de 30 UE/mg e 50,0% de perda de bioatividade. Além disso, redução de aproximadamente 100 vezes de LPS foi relatada por Cotton et al. (1994) de preparações de DNA plasmídico, com uma concentração final de 0,1 UE em 6 µg de DNA. Uma comparação entre o processo de adsorção por afinidade e SMDFA (por Triton X-114) para a purificação de proteínas recombinantes, como mioglobina e isoenzimas de creatina quinase, foi descrito por Liu et al. (1997). Esses autores concluíram que o processo por SMDFA foi o mais efetivo, o qual reduziu a concentração de LPS para 2,5-25 UE/mg, representando uma remoção de aproximadamente 99,0%.

Reichelt et al. (2006) testaram a remoção de LPS através da cromatografia de afinidade por fusão de histidina, com uma etapa de lavagem utilizando Triton X-114. A aplicação de 0,1% de Triton X-114 nas etapas de lavagem foi bem sucedida na redução de LPS durante a purificação de proteínas. Os ensaios realizados com determinadas proteínas continham concentrações de 2.500 até 34.000 UE/mg de LPS; após a purificação com Triton X-114, as concentrações finais de LPS obtidas foram de aproximadamente 4,0 a 0,20 UE/mg.

Aida e Pabst (1990) relataram um método para redução de LPS em soluções protéicas usando Triton X-114, no qual o tensoativo auxilia a dissociação entre LPS e proteínas, enquanto também proporciona uma separação de fases capaz de remover os LPS. De acordo com esses mesmos autores, a separação de fases usando Triton X-114 foi efetiva e reduziu os LPS de soluções de três proteínas diferentes (citocromo c, albumina e catalase). O primeiro ciclo de separação de fases reduziu a concentração de LPS em 10^3 vezes. Ciclos adicionais de separação de fases resultaram em remoção completa de LPS. Os LPS foram encontrados na fase concentrada, rica em micelas, e a biomolécula de interesse foi recuperada na fase diluída do sistema.

Liu et al. (1997) demonstraram que a separação de fases por Triton X-114 foi empregada também em outras preparações de proteínas recombinantes. Os pesquisadores executaram três ciclos de separação com Triton X-114, e a concentração de LPS em todas as proteínas recombinantes

derivadas de *E. coli* foram reduzidas a 99,0% da concentração inicial. Além disso, a imunotividade, a integridade física e a atividade biológica da proteína permaneceram inalteradas depois do processo de separação de fases. A separação de fases pode ser repetida em tempos múltiplos até que as concentrações de LPS na fase diluída alcancem um nível satisfatório.

EPS (exopolissacarídeo, semelhante aos LPS) proveniente de *Klebsiella* sp I-714 também foram removidos depois de duas etapas de extração com 2,0% de Triton X-114, com somente o dobro da diminuição da atividade biológica (ADAM et al., 1995). De acordo com os mesmos autores, a técnica empregada com Triton X-114 é rápida, eficiente, não degradativa e permite um alto grau de descontaminação. Além disso, esse método também foi empregado com sucesso para a remoção de LPS proveniente de *Pseudomonas solanacearum* (bastonete Gram-negativo) (ADAM et al., 1995).

A utilização de tensoativos tem se mostrado bastante eficiente na remoção de moléculas de LPS de preparações biológicas; porém, alguns são relativamente caros, e ainda podem afetar a bioatividade da proteína-alvo (LIN et al., 2005). Levando em consideração as propriedades dos SMDFA para a purificação de biomoléculas, este trabalho de pesquisa tem obtido alguns resultados promissores usando o tensoativo Triton X-114 para a remoção de lipolissacarídeos provenientes da cultura de células de *E. coli* para a produção de biomoléculas de interesse. E é nessa vertente que o presente trabalho abordará esse tema tão abrangente e complexo.

1.1.5. Teoria de Partição de Proteínas Hidrofílicas Baseada em Interações por Volume de Exclusão

O comportamento de uma proteína em um sistema de duas fases aquosas pode ser caracterizado pelo coeficiente de partição da proteína-alvo, K_p (ou K_{GFPuv}), definido a seguir na equação 01:

$$K_p = K_{GFPuv} = \frac{C_d}{C_c} \quad (01)$$

em que C_d e C_c correspondem às concentrações da biomolécula ($\mu\text{g/mL}$) na fase diluída e na fase concentrada em micelas, respectivamente.

Nikas et al. (1992) apresentaram uma formulação teórica para descrever e estimar a partição de proteínas hidrossolúveis em SMDFA contendo micelas

cilíndricas e não carregadas. De acordo com esta teoria, assume-se que a partição de proteínas hidrofílicas é governada primariamente por interações repulsivas estéricas, do tipo volume de exclusão (*excluded volume* - *EV*). O *EV* pode ser calculado, conforme equação 02:

$$EV = \frac{(\phi_c - \phi_d)}{100\%} \quad (02)$$

em que ϕ_c e ϕ_d são as frações volumétricas de tensoativo nas fases concentrada e diluída, respectivamente. O valor de $(\phi_c - \phi_d)$ pode ser obtido a partir da linha de amarração (*tie-line*) da curva binodal do sistema Triton X-114/tampão, uma vez que ambas as fases apresentam massa específica de aproximadamente 1 g/mL e, portanto, as frações de massa podem ser aproximadas como frações volumétricas.

Apesar da diferença de tamanho das micelas e de densidade de micelas entre as duas fases do sistema, o coeficiente de partição micela/água em cada uma das fases do sistema de duas fases é o mesmo, devido ao fato das proteínas hidrofílicas praticamente não interagirem com as micelas de tensoativos não-iônicos não-carregadas.

Para aplicação da teoria, os ensaios de partição são realizados em concentrações diluídas de proteínas. Desta forma, a separação de fases da solução micelar praticamente não sofre alterações pela presença da proteína. Esta observação explica o fato de que, como uma primeira aproximação, o efeito da proteína na forma, tamanho e distribuição de tamanho das micelas, bem como as interações proteína-proteína, é ignorado no cálculo de K_p . Além disso, as proteínas (hidrofílicas) são tratadas como esferas rígidas. As moléculas de tensoativos que constituem as duas fases coexistentes são modeladas sob condições de idealidade com relação ao solvente, no que diz respeito às micelas. Nestas condições, as interações atrativas (tipo van der Waals) e as de volume de exclusão existentes entre as micelas de tensoativo não-iônico cancelam-se entre si. Portanto, as interações atrativas intermicelares são ignoradas e assume-se que as micelas cilíndricas sejam interpenetráveis e polidispersas que interagem somente com proteínas adjacentes, pelo efeito estérico de volume de exclusão. O efeito da existência de uma diferença de potencial eletrostático na interface do sistema (devido à presença dos sais tampão) também não é considerado, pois se acredita que o

efeito de volume de exclusão seja dominante sobre qualquer outro efeito. Considera-se ainda, no modelo, que os monômeros em solução não exerçam nenhum efeito significativo na partição das proteínas, pois estão presentes em baixas concentrações e a concentração é aproximadamente a mesma nas duas fases (BLANKSCHTEIN, 1996; KAMEI et al., 2002a; LUE; NIKAS et al., 1992).

1.1.6. Proteína Verde Fluorescente Recombinante

A proteína verde fluorescente, mais conhecida por GFP (*Green Fluorescent Protein*), é produzida pelo cnidário *Aequorea victoria* que emite fluorescência na zona verde do espectro visível. O gene que codifica esta proteína já foi isolado e é atualmente usado na produção de proteínas de fusão, constituídas por um gene de interesse fundido com o da GFP, de modo a monitorizar, por exemplo, a localização dessa proteína *in vivo* (CHUDAKOV et al., 2005).

A GFPuv é uma proteína globular, compacta e ácida, na forma de um barril que apresenta o cromóforo situado no centro geométrico (Figura 09) (CRANERI et al., 1996; WARD, 1998).

Figura 09. Estrutura molecular da proteína verde fluorescente.
Fonte: <http://mekentosj.com/science/fret/gfp.html>

Esta proteína é expressa em vários organismos e é composta por monômeros de massa molar de 27 KDa. A GFP selvagem mantém a fluorescência entre pH 5,5 e 12; entretanto, esta decresce em valores de pH inferiores a 5,5 e superiores a 12, sendo o pH ótimo igual a 8,0 e ponto isoelétrico (pI) entre pH 4,6-5,1 (BOKMAN; WARD, 1981). Segundo Yang et al. (1996), a estrutura cristalina da GFPuv é o conjunto de dois monômeros

dispostos em 11 fitas formadas por β -folha pregueada externamente em forma de barril ou cilindro, o qual abriga em seu centro geométrico o grupo fluoróforo que permanece ligado ao cilindro por α -hélices. A GFPuv não se apresenta obrigatoriamente na forma de dímero e sua estrutura tridimensional apresenta diâmetro de 24 Å por 42 Å de altura, sendo apontada como responsável pela estabilidade da proteína (ZIMMER, 2002).

A GFPuv emite máxima fluorescência quando excitada por luz ultravioleta (UV) e possui pico de excitação de 394 nm e pico de emissão de 509 nm. Essa forma mutante é expressa pela cepa de *E. coli* DH5- α geneticamente modificada e apresenta fluorescência 18 vezes mais intensa que a GFP, quando excitada por luz UV (CRAMERI et al., 1996).

Essa proteína foi recombinada com auxílio de técnicas de clonagem molecular no cDNA (DNA complementar) da GFP *in vitro*. O resultado foi a substituição de três aminoácidos no cromóforo (fenilalanina⁹⁹ por serina, metionina¹⁵³ por treonina e valina¹⁶³ por alanina) como numeração do sistema TU#58 da GFP, resultando na proteína modificada - GFPuv. Um esquema didático representando a inserção do gene recombinante para expressão da GFPuv é apresentado na Figura 10.

Figura 10. Esquema representativo que ilustra a inserção do gene recombinante para a expressão da proteína GFPuv. Adaptado de Douglas Prasher.

Fonte: <http://www.conncoll.edu/ccacad/zimmer/GFP-ww/GFP-1.htm>

A GFPuv apresenta baixa toxicidade e maior solubilidade no citoplasma das células do que a forma selvagem GFP. Porém, apresenta-se mais suscetível à dimerização (CRAMERI et al., 1996). A forma mutante, GFPuv, é

expressa duas a três vezes mais rápido em células de *E. coli* (WARD, 1998). Apesar da recombinação da proteína aumentar a fluorescência da GFPuv, os picos de excitação e emissão permanecem praticamente inalterados em relação à GFP. Devido à instabilidade da fluorescência em valores de pH inferiores a 5,5 e superiores a 12, a GFPuv é empregada em estudos de citometria como indicadora do pH intracelular em células livres (KNEEN et al., 1998). Esta proteína, em estudos *in vitro*, apresenta estabilidade às temperaturas $\leq 70,0^{\circ}\text{C}$, resistência à desnaturação química por determinados solventes orgânicos, detergentes e a determinadas proteases (BOKMAN; WARD, 1981; CHALFIE et al., 1994; ROBART; WARD, 1990).

Uma enorme variedade de técnicas encontra-se disponível para a construção de proteínas de fusão, com base em proteínas fluorescentes, e para aumentar a sua expressão em animais e plantas. Os veículos de eleição para a introdução desse tipo de genes nos organismos são plasmídeos bacterianos, vetores virais, entre outros. O gene de fusão pode então ser integrado nos cromossomos do organismo em estudo; no entanto, não integrará necessariamente o genoma do hospedeiro, sendo expresso somente durante um curto período de tempo. Essa expressão, quer seja temporária ou permanente, do gene de interesse em fusão com GFP, pode ser facilmente monitorada pela observação da emissão da fluorescência, utilizando um conjunto de filtros compatível com a proteína (CHALFIE et al., 1994).

A GFPuv não requer cofatores, catalisadores ou substratos para sua atividade (CHALFIE et al., 1994), uma vez que pode ser expressa com funcionalidade em diversas espécies bacterianas. Quando inserida com sucesso em bactérias esporuladas, pode continuar a expressão da fluorescência nas células das gerações seguintes. E ainda, pode ser utilizada para diversas finalidades, como por exemplo, diferenciar culturas mistas; monitorar a expressão gênica frente a múltiplos promotores em células, tecidos e organismos; observar a permeabilidade da membrana; localizar e/ou analisar, em tempo real, interação proteína-proteína; visualizar o transporte e a função de organelas intracelulares e, também, a estrutura do citoesqueleto; separar culturas mistas em células que expressam diferentes variantes de GFP utilizando FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*). Além disso, devido à sua resistência a altas temperaturas, essa proteína apresenta grande potencial

de aplicação como indicador biológico nos processos de pasteurização por calor (CHALFIE; KAIN, 1998).

Neste sentido, tal proteína apresenta grande vantagem como indicador biológico em relação ao método de quantificação. A análise quantitativa da fluorescência remanescente nas amostras submetidas aos processos de esterilização pode ser determinada por espectrofluorimetria, o que torna o método rápido, simples e preciso (CHALFIE et al., 1994).

Nesse âmbito, a GFPuv constitui-se uma biomolécula ideal para estudo, já que simularia a produção de uma biomolécula recombinante de interesse clínico-farmacêutico que seria utilizada, por exemplo, em preparações parenterais. Dessa maneira, a GFPuv seria um modelo para purificação por SMDFA. Aliado à sua produção e obtenção, proporcionaria também o estudo da remoção do principal contaminante de bactérias Gram-negativas, os LPS. Por esta razão, cultivamos *E. coli* recombinante para produção e obtenção de GFPuv e LPS, com o intuito de estudar o potencial do SMDFA na purificação da proteína-alvo e, concomitantemente, a remoção de LPS proveniente de meio fermentado.

CAPÍTULO II

REMOÇÃO DE LPS DE CALDO FERMENTADO DE *E. coli* UTILIZANDO O SISTEMA MICELAR DE DUAS FASES AQUOSAS

LPS REMOVAL FROM AN E. coli FERMENTATION BROTH USING AQUEOUS TWO-PHASE MICELLAR SYSTEM

André M. Lopes¹, Pérola O. Magalhães², Priscila G. Mazzola³,
Carlota O. Rangel-Yagui⁴, João C. M. de Carvalho¹,
Thereza C.V. Penna¹ e Adalberto Pessoa-Jr¹

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

²School of Health Sciences, University of Brasília – FS/UnB

³Department of Clinical Pathology, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas – Unicamp

⁴Department of Pharmacy, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo – FCF/USP

Submetido para *Biotechnology Progress* com adaptações.
Aceito para publicação em 13/05/10.

2.1. INTRODUÇÃO

Os avanços na biotecnologia abriram inúmeras possibilidades para a produção em grande escala de muitas biomoléculas, que são importantes para a pesquisa nas áreas farmacêuticas e industriais. O desenvolvimento de técnicas e métodos de separação e purificação de proteínas e outras biomoléculas tem sido de fundamental importância para muitos desses avanços no setor biotecnológico (RODRIGUES et al., 1999a, 1999b). As biomoléculas provenientes de *E. coli* recombinante podem ser expressas de forma solúvel extracelular, solúvel intracelular, constituição de membranas ou corpos de inclusão. Nos três últimos casos, é necessário o uso de processos de ruptura celular para recuperar a biomolécula de interesse, que levam à liberação de grandes quantidades de LPS.

Os lipopolissacarídeos são os principais componentes da membrana externa de bactérias Gram-negativas. Eles são compostos de uma porção de polissacarídeo hidrofílico, que é covalentemente ligada a uma porção lipídica hidrofóbica – lipídeo A (HIRAYAMA; SAKATA, 1993; OGIKUBO et al., 2004; RAETZ et al., 1991). Os LPS da maioria das espécies consistem de três regiões distintas: a região do O-antígeno, um núcleo de oligossacarídeos e a porção do lipídeo A (PETSCH; ANSPACH, 2000).

Os LPS podem ser considerados estáveis em uma ampla faixa de temperatura e pH, tornando a sua remoção uma das tarefas mais difíceis nos processos de purificação de proteínas (REICHELT et al., 2006; SHARMA, 1986). Estas moléculas são as substâncias pirogênicas mais comuns encontradas na produção de peptídeos e proteínas recombinantes provenientes de bactéria Gram-negativas, principalmente *E. coli* (FLETCHER; RAMWELL, 1980; FRAKER et al., 1988). Diversos peptídeos e proteínas recombinantes são produzidas por este microorganismo (KIM et al. 1998, LEE et al. 2000); entretanto, LPS precisam ser removidos do meio antes da sua aplicação terapêutica (PYO et al., 2001). Devido ao seu potencial tóxico, é essencial sua remoção de preparações injetáveis e de outros produtos biológicos e farmacêuticos.

Sua remoção torna-se mais difícil quando está associado a biomoléculas lábeis, tais como proteínas (KANG; LUO, 1998; MAGALHÃES et al., 2007; MAGALHÃES; PESSOA-JR, 2010). Uma variedade de técnicas de remoção de

endotoxinas foram previamente analisadas (WEARY; PEARSON, 1988). Adsorventes, como carvão ativado (NAGAKI et al., 1992) ou resinas de troca-iônica (SHIBATANI, 1983), ocasionam baixa seletividade e baixa recuperação de proteína-alvo. Ultrafiltração (FISCHBACH et al., 1994; SCHINDLER; DINARELLO, 1989) e cromatografia de exclusão exigem que haja uma grande diferença de tamanho entre a proteína-alvo e os LPS, e ainda não são eficazes se este contaminante se liga fortemente à proteína-alvo (ANSPACH; HILLBECK, 1995). Ligantes de afinidade para LPS, como a histamina (MINOBE et al., 1982; 1983), histidina (ANSPACH; HILLBECK, 1995), e polimixina B (ANSPACH; HILLBECK, 1995; ISSEKUTZ, 1983) ou poli aminatos como g-metil L-glutamato (HIRAYAMA et al., 1995) são razoavelmente eficazes para remoção de LPS e com recuperação de proteína relativamente alta. A imobilização por poli-L-lisina-Sepharose e DEAE-Sepharose (ANSPACH; HILLBECK, 1995) também tem se mostrado eficaz para remoção de LPS de soluções de proteínas com taxas de remoção de até 10^4 UE/mL, com uma contaminação inicial de 10^6 UE/mL. Ambos os processos citados só podem ser utilizados se os níveis de contaminação são iguais ou inferiores a 10^6 UE/mL, a fim de se obter níveis toleráveis de contaminação final inferiores a 5,00 UE/mL (ANSPACH; HILLBECK 1995). Altas concentrações iniciais de LPS, variações do pI da proteína e de força iônica podem ocasionar baixa recuperação da proteína-alvo (HIRAYAMA et al., 1995), e baixas taxas de remoção de LPS (ANSPACH; HILLBECK, 1995; MCNEFF et al., 1999).

O sucesso destas técnicas para a remoção de LPS é estritamente dependente das características físico-químicas da proteína-alvo requerida (LIN et al., 2005). No entanto, a baixa concentração obtida, sensibilidade térmica da proteína-alvo e presença de contaminantes como os LPS, podem trazer dificuldades para a purificação de biomoléculas de interesse biotecnológico, e, portanto, envolvendo técnicas de alto custo.

Na busca por métodos alternativos, o processo por extração líquido-líquido realizado em vários tipos de sistemas aquosos tem sido largamente investigados na área de Biosseparação (ALBERTSSON, 1956; BORDIER, 1981; JOHANSSON et al., 1996, 1999; JOZALA et al., 2008; KAMEI et al., 2002a, 2002b; RANGEL-YAGUI et al., 2003; LOPES et al., 2008; 2010;

MAGALHÃES et al., 2007; MAZZOLA et al., 2006, 2008; NIKAS et al., 1992; SIVARS et al., 2000; SIVARS; TJERNELD, 2000).

Estudos prévios mostraram que o uso da separação de fases por Triton X-114 também pode ser aplicado para a remoção de altas concentrações de LPS para a purificação de proteínas em larga escala (ADAM et al., 1995; AIDA; PABST, 1990; CHENG et al., 2009; COTTON, 1994; JENSEN et al., 2008; LIU et al., 1997; MERCALDI et al., 2008; REICHELT et al., 2006; ROZKOV et al., 2008; SCHÄDLICH et al., 2009). Além disso, apresentam baixo custo, fácil manipulação, e oferecem um ambiente ameno para as biomoléculas.

Esse processo proporciona seletividade na partição de proteínas de interesse e dos contaminantes, segundo a hidrofobicidade de cada componente. Desta maneira, o SMDFA pode ser empregado para remover LPS contaminante proveniente da produção de proteínas recombinantes de interesse farmacêutico. Nesse capítulo os objetivos de estudo foram: (i) avaliar a interferência do tensoativo não-iônico Triton X-114 na metodologia cinética cromogênica de quantificação de LPS, e (ii) obter e estudar a partição de LPS puro utilizando o sistema micelar de duas fases aquosas.

2.2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1. Materiais

O tensoativo não-iônico Triton X-114 foi obtido comercialmente da Sigma (St. Louis, MO). As soluções dos SMDFA foram preparadas em tampão McIlvaine pH 7,2, consistindo de 16,4 mM de fosfato de sódio dibásico e 1,82 mM de ácido cítrico. Foi utilizada água deionizada por sistema de purificação de água Millipore tipo Milli-Q (Bedford, MA). Para evitar contaminação com detergentes indesejáveis, toda a vidraria utilizada nos experimentos foi lavada em um banho de hidróxido de sódio 1,0 mol/L em solução hidroalcoólica a 50,0%, seguido de um banho de ácido nítrico 1,0 mol/L, lavada abundantemente com água Milli-Q, e finalmente despirogeneizada em estufa (Spencer Scientific, 400) a 250,0°C durante 1 hora. Todos os meios preparados e toda a vidraria utilizada foram autoclavados a 121,0°C por 30 minutos antes de serem utilizados. Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.2.2. Estudo da Interferência do Tensoativo Não-Iônico Triton X-114 no Método de Quantificação de LPS

Para avaliar a interferência do tensoativo não-iônico Triton X-114 no método cinético cromogênico de quantificação de LPS, foram preparadas soluções de 2,0, 4,0 e 6,0% (p/p) de TX-114/água apirogênica. Em adição, para verificar a presença de contaminantes do tipo β -glucanas, a fase diluída (pobre em micelas) de soluções a 4,0 e 8,0% (p/p) de TX-114/tampão a 33,0 e 41,0°C foram avaliadas. As amostras destas fases foram diluídas e divididas em dois grupos: (A) ensaios na ausência de β -bloqueadores de glucanas (β -GB) e (B) ensaios na presença de β -GB. Todas as soluções foram mantidas em banho de gelo, evitando a separação das fases.

2.2.3. Preparo dos SMDFA e Construção das Curvas Binodais

O procedimento para o preparo dos SMDFA para os ensaios de partição foram realizados conforme a descrição a seguir.

Os SMDFA foram preparados à temperatura ambiente em tubos de vidro de ensaio graduados (de 10 mL), pela adição dos componentes em quantidades pré-estabelecidas. Os componentes do sistema micelar foram adicionados por pesagem. Adicionou-se LPS puro, GFPuv pura, homogeneizado celular de *E. coli* e/ou solução salina (MgSO_4 , CaCl_2 , KI, e/ou $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), contendo tensoativo não-iônico TX-114 em tampão Mcllvaine e/ou água apirogênica. Em seguida, os tubos foram vedados com *parafilm* (Pechiney, Plastic Packaging) e os sistemas homogeneizados em agitador orbital a 8,0 rpm (Fanem, modelo 270-I) por aproximadamente 1 hora, em seguida, resfriados a 4,0°C de modo a exibir uma única fase. Posteriormente, os sistemas foram transferidos para um banho termorregulável (Nova Ética, 521/2DE), com valor de temperatura previamente ajustado ao desejado, e mantido em repouso por três horas para separação de fases e equilíbrio das mesmas.

Importante ressaltar que os sistemas foram preparados de maneira a apresentar massas totais que variaram de 3,0 até 8,0 g, segundo a temperatura de partição estudada. Isso se deve ao efeito da temperatura no SMDFA: com o aumento desta, há uma maior concentração da fase concentrada (F_c), e isso ocasiona um menor volume nesta fase, de tal forma que o volume da fase

diluída (F_d) aumenta, e consequentemente, diminui o valor da razão volumétrica entre as fases (R). Desta forma, para os ensaios em temperaturas mais elevadas, o valor da massa total foi aumentado a fim de obter um volume mínimo seguro para a recuperação das fases.

Após o período de partição (3 horas) no banho termostático, mediram-se os volumes de cada fase (V_c e V_d) e, então, as amostras de cada fase foram coletadas cuidadosamente, utilizando-se seringa e agulha descartáveis e apirrogênicas. Com as amostras coletadas realizaram-se análises de determinação da concentração dos componentes. Os experimentos com LPS puro foram realizados em duplicata, e os respectivos desvios-padrões e intervalos de confiança calculados. A Figura 11 apresenta esquematicamente o procedimento experimental de preparação do SMDFA.

Figura 11. Procedimento experimental para a preparação do SMDFA. 1 - Adição dos componentes do sistema em tubo graduado – Sistema Monofásico; 2 - Homogeneização das amostras por 1 hora em agitação orbital; 3 - Incubação das amostras em banho termostático à temperatura desejada por três horas; 4 - Tubo graduado contendo as duas fases do sistema, coleta das fases com auxílio de seringa e agulha – Sistema Bifásico; 5 - Amostras contendo as fases concentrada (F_c) e diluída (F_d) para análises da concentração dos componentes.

A construção das curvas binodais foi determinada de acordo com o método do ponto de névoa (*cloud point*) descrito por Albertsson (1986) e modificado por Blankschtein et al. (1986). Este método consiste em identificar visualmente a temperatura, $T_{\text{NÉVOA}}$, na qual soluções com concentrações conhecidas de tensoativo tornam-se turvas com a elevação da temperatura. As soluções contendo diferentes concentrações de tensoativo e dos componentes foram estocadas no banho termorregulável. Inicialmente, cada solução foi resfriada a uma temperatura suficientemente baixa para que o sistema apresentasse uma fase, transparente e homogênea. A partir desse ponto, a temperatura foi aumentada lentamente (de 0,1 em 0,1°C) até a turvação da solução. Esse procedimento foi realizado em triplicata para cada valor de concentração e o $T_{\text{NÉVOA}}$ definido como a média dos três valores de temperatura determinados. A curva binodal foi obtida traçando-se os valores de $T_{\text{NÉVOA}}$ em função da concentração do tensoativo.

2.2.4. Cultivo de *Escherichia coli* ATCC 25922 para Obtenção de LPS Puro **Produção**

O processo de fermentação de *E. coli* ATCC 25922 foi realizado em agitador de bancada (New Brunswick Scientific, Edison, N.J., USA), para a obtenção de biomassa celular, e posterior purificação de LPS para os ensaios de partição em SMDFA.

Neste processo de fermentação em Erlenmeyers, o inóculo ocorreu em uma única fase. Assim, em dois Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo LB (Luria-Bertani, Difco) em cada, adicionaram-se cepas de *E. coli* ATCC 25922 estocadas em 50,0% de glicerol, e então foram mantidos em agitação a 100 rpm (Tecnal - 420), a 37,0°C por 24 horas. Após este período, o inóculo foi adicionado ao Erlenmeyer com capacidade de 2,0 L contendo 1,0 L de caldo LB a 5,0%, o qual foi mantido em agitação a 250 rpm (New Brunswick Scientific, Edison, N.J., USA), a 37,0°C por 24 horas.

Decorridas as 24 horas de fermentação, centrifugou-se duas vezes o caldo fermentado a 82.800xg (Damon/IEC Division, Modelo K) por 30 minutos, para garantir que toda biomassa se depositasse no *pellet*. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em água Milli-Q e transferido para tubos de centrífuga de 50 mL, sendo novamente centrifugado a 6.480xg (Jouan BR4i,

França) por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* congelado em *ultrafreezer* a - 60,0°C.

Purificação

A purificação de LPS proveniente das células de *E. coli* foi realizada segundo Westpal e Jann (1965). A partir da fermentação, obteve-se aproximadamente 50 g de biomassa úmida, que foi transferida para um béquer de 500 mL e ressuspensa com 295 mL de água deionizada. A suspensão celular foi aquecida a 70,0°C, e em seguida adicionou-se, sob agitação, 295 mL de fenol saturado.

A mistura foi mantida sob agitação por 15 minutos, resfriada à temperatura ambiente, e então centrifugada a 17.027xg (Himac CR 20B 2) por 30 minutos. Após centrifugação, tomou-se o sobrenadante obtido nos tubos de centrifugação, transferiu-se para um béquer de 500 mL e descartou-se o precipitado. A solução obtida foi, então, transferida para uma membrana de diálise de 12.000-16.000 Da de *cut-off* e dialisada por 12 horas contra água deionizada em um béquer de 5,0 L para retirada do fenol. O procedimento de diálise foi repetido por mais duas vezes (troca de água). A membrana de diálise foi previamente fervida com 20 mM EDTA em água deionizada, e em seguida fervida com água Milli-Q por mais duas vezes. Ao fim do processo de diálise, o conteúdo da membrana foi vertido em tubos de ultracentrífuga e ultracentrifugado a 105.000xg (Sorval ultra Pro 80) a 4,0°C, durante 3 horas.

O sobrenadante obtido foi descartado e o precipitado ressuspenso com água deionizada. A centrifugação foi repetida por mais duas vezes, a fim de remover traços de fenol do precipitado. Finalmente, o precipitado final foi ressuspenso em água Milli-Q para um volume final de 100 mL e liofilizado em frascos de vidro. Após a liofilização, os frascos contendo LPS foram quantificados e estocados em *ultrafreezer* a - 60,0°C.

2.2.5. Determinação da Concentração de LPS

A concentração de LPS nas amostras foi medida através do método cinético cromogênico fornecido pela *Cambrex Bio Science* através do *Kit LAL Kinetic-QCL®*. Todas as diluições da amostra e a adição do lisado à microplaca foram realizadas utilizando pipeta multicanal com pontas apirrogênicas. A

microplaca foi então incubada a 37,0°C em um leitor de ELISA (ELx808cse - BIO-TEK Instruments) e lida por espectrofotometria ($\lambda=405$ nm). O controle positivo foi contaminado com uma concentração igual de 5,00 UE/mL de LPS, e os resultados de todos os testes foram considerados válidos quando o valor de concentração de LPS foi recuperado entre 50,0 e 200,0% deste valor (USP, 2002).

Para a eliminação da interferência na quantificação de LPS devido à presença de TX-114, foram preparados sistemas TX-114/tampão sem adição de nenhum outro componente. Destas amostras, foram coletadas as fases diluídas do sistema (F_d) nas mesmas condições de ensaio na presença dos componentes, e assim, quantificadas seus valores de interferência. Estes valores foram então descontados dos valores obtidos na presença dos componentes, e com isso estimados os valores de remoção de LPS.

2.2.6. Estudo da Partição de LPS Puro em SMDFA

Foi estudada a partição de LPS puro proveniente de *E. coli* ATCC 25922 nas concentrações de 4,0, 6,0 e 8,0% (p/p) de TX-114/tampão, nas temperaturas de 33,0, 37,0 e 41,0°C. Para o preparo destes ensaios foi adicionado ao sistema 1,0 g de solução de LPS puro ($[LPS]_{\text{inicial}}=1,15 \times 10^6$ UE/mL).

2.2.7. Planejamento Experimental

Foi realizado um planejamento experimental estatístico para a remoção de LPS puro adicionado em SMDFA, utilizando metodologia de superfície de resposta (*Response Surface Methodology* - RSM). O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da temperatura na remoção de LPS puro em relação à fase rica em micelas (F_c) em diferentes concentrações de tensoativo não-iônico Triton X-114. Para os experimentos de partição de LPS puro em SMDFA, foi empregado um planejamento estatístico do tipo 2^2 , que consiste em um modelo linear de duas variáveis em dois níveis, com um ponto central, de acordo com Barros Neto et al. (2007) e Rodrigues e Lemma (2005). As repetições no ponto central foram realizadas para obter a variabilidade experimental e com isso avaliar a significância estatística dos efeitos. Duas variáveis respostas foram utilizadas para analisar os resultados estatísticos:

porcentagem de remoção ($\%REM_{LPS}$) e fator de remoção de LPS (FR_{LPS}). Assim, os maiores valores obtidos foram definidos como aqueles que forneceram a melhor combinação destas respostas. Após a realização dos experimentos em condições previamente estabelecidas (Tabela 01), o tratamento estatístico dos resultados foi efetuado com o auxílio do *software Statgraphics Centurion XV* versão (15.2.05).

TABELA 01. Níveis das variáveis utilizadas no planejamento 2^2 para o estudo da partição de LPS puro adicionado em SMDFA.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
[TX-114](%p/p) (X_1)	4,0	6,0	8,0
T °C (X_2)	33,0	37,0	41,0

Em termos estatísticos, os valores foram codificados em X_1 e X_2 , de maneira que X_1 corresponde à concentração de TX-114 (em %p/p) e X_2 à variável temperatura (T °C). Os valores codificados podem ser obtidos a partir da equação 03:

$$V_{cod} = \frac{V_r - P_c}{i} \quad (03)$$

em que V_{cod} corresponde ao valor codificado da variável, V_r ao valor real da variável, P_c ao valor real referente ao ponto central e i ao intervalo (entre o valor real e o ponto central).

2.2.8. Estudos de Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo para as Soluções de Triton X-114 e LPS

Estudos de espalhamento de raios-X a baixo ângulo de soluções micelares foram realizados na linha de SAXS, a $25,0 \pm 1,0$ °C, com comprimento de onda da radiação de $\lambda = 1,608$ Å e distância amostra detector de 600 mm. As amostras foram acondicionadas em pequenas celas de acrílico de 1,0 mm de espessura, seladas, e dispostas perpendicularmente ao feixe incidente de raios-X para leitura de espalhamento durante 15 minutos. Foram estudadas soluções de Triton X-114 em água apirogênica nas concentrações de 90, 180, 270 e 450 mmol/L (ou 5,0, 10,0, 15,0 e 25,0% p/p, respectivamente). A solução

de LPS foi preparada com LPS puro ressuspendido em água apirogênica para uma concentração final de 2,0 $\mu\text{mol/L}$ (10^6 UE/mL).

2.2.9. Metodologia de Análise dos Resultados

Os resultados obtidos foram analisados, inicialmente, em termos de remoção de LPS obtidos na fase diluída em relação à concentração inicial de LPS adicionado ao sistema ($\%REM_{LPS}$), conforme equação 04:

$$\%REM_{LPS} = 100\% - \left(\frac{C_{LPS,d} \times V_d}{C_{LPS,i} \times V_{LPS,i}} \right) \times 100\% \quad (04)$$

em que $C_{LPS,d}$ e $C_{LPS,i}$ referem-se às concentrações de LPS (UE/mL) na fase diluída e na solução estoque inicialmente adicionada ao sistema, respectivamente. V_d e $V_{LPS,i}$ são os volumes da fase diluída e da solução estoque inicialmente adicionadas ao sistema, respectivamente.

A razão volumétrica entre as fases formadas foi calculada segundo a equação 05:

$$R = \frac{V_c}{V_d} \quad (05)$$

em que V_c e V_d são os volumes (mL) da fase concentrada e diluída do sistema micelar.

O fator de remoção de LPS (FR_{LPS}) para a fase concentrada do sistema foi calculado de acordo com a seguinte equação 06:

$$FR_{LPS} = \frac{C_{LPS,i} \times V_{LPS,i}}{C_{LPS,d} \times V_d} \quad (06)$$

em que $C_{LPS,d}$ e $C_{LPS,i}$ referem-se às concentrações de LPS (UE/mL) na fase diluída e na solução estoque inicialmente adicionada ao sistema, respectivamente. V_d e $V_{LPS,i}$ são os volumes da fase diluída e da solução estoque inicialmente adicionada ao sistema.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1. Estudo da Interferência do Tensoativo Não-Iônico Triton X-114 no Método de Quantificação de LPS

Inicialmente, foi estudada a influência da presença de LPS no deslocamento da curva binodal do sistema TX-114/tampão. Foram preparadas soluções a 2,0 e 6,0% (p/p) em sistema TX-114/tampão, com a adição $2,7 \times 10^5$ UE/mL de LPS nos sistemas, e então determinou-se o $T_{NÉVOA}$ destas soluções, conforme Item 2.2.3.

Em ambos os casos, a concentração de LPS adicionada ao sistema não causou efeito na curva binodal do sistema TX-114/tampão, ou seja, os valores de $T_{NÉVOA}$ obtidos na presença de LPS foram semelhantes aos obtidos na ausência desse componente (Figura 12). Cabe ressaltar que a concentração de LPS utilizada corresponde a um número significativo em unidades de LPS, porém o correspondente em quantidade de LPS presente em massa é muito baixo e, portanto, explica a não-alteração do perfil da curva binodal.

Figura 12. Curva binodal para o sistema Triton X-114/tampão, obtida experimentalmente. A curva representa a transição do sistema monofásico para o sistema de duas fases aquosas (bifásico). Os círculos ($\circ$) correspondem os ensaios com LPS a 2,0 e 6,0% (p/p) de TX-114/tampão.

O estudo do efeito da interferência do tensoativo não-iônico TX-114 no método cinético cromogênico foi realizado com o intuito de quantificar a influência das moléculas de tensoativo na reação com LAL. Os ensaios foram

realizados com soluções a 2,0, 4,0, 6,0 e 8,0% (p/p) de TX-114 preparados com água apirogênica. A metodologia cinética cromogênica de LAL é baseada na liberação de p-nitroanilina (pNA) e na formação de cor; portanto, vários fatores podem causar falsos-positivos no teste de LAL, como produtos derivados do sangue, polinucleotídeos e compostos da classe das β -1,3 glucanas (ELIN; WOLFF, 1973). Como pode ser observado na Tabela 02a, os ensaios com as soluções de 2,0-8,0% (p/p) de TX-114/água apirogênica apresentaram aumento nos valores de interferência com o aumento da concentração de TX-114 na solução.

Amostras a 4,0% (p/p) de um sistema TX-114/tampão foram preparadas e estocadas em banho termorregulado a 29,0 e 33,0°C para separação de fases. Cada uma das fases foi coletada e quantificada pelo método. Resultado positivo para LPS foi observado em ambas as fases do sistema (Tabela 02b).

TABELA 02. Resultados de interferência (UE/mL) no método de quantificação de LPS em diferentes concentrações de TX-114.

(a) TX-114/Água apirogênica	
[TX-114] (%p/p)	Resultados (UE/mL)
2,0	55,0
4,0	170,0
6,0	1.000,0
8,0	1.300,0
Água apirogênica	<0,05

(b) TX-114/Tampão			
[TX-114] (%p/p)	Fase do SMDFA	29,0°C	33,0°C
4,0	F _c	3.610,0	3.860,0
	F _d	1.020,0	2.460,0

Os maiores valores de influência no método foram obtidos nas fases concentrada do sistema (F_c). Isto se deve, provavelmente, à maior concentração de micelas nesta fase. É pertinente ressaltar que a elevação da temperatura de 29,0 para 33,0°C ocasionou um aumento na concentração de micelas em F_c. Tal efeito resultou em maior interferência, a qual foi quantificada pelo método.

Similarmente, com o aumento do efeito da temperatura, a fase diluída (F_d) apresentou um aumento de aproximadamente 2,4 vezes no valor de

interferência a 33,0°C. Este aumento observado pode estar associado à presença de mais moléculas de TX-114 nesta fase.

Este fenômeno pode estar baseado pelo que foi observado e reportado por Kamei et al. (2002b). Apesar do aumento do efeito de volume de exclusão (EV), o aumento da concentração de micelas em F_c pode influenciar a partição de alguns agregados micelares para F_d . O estudo destes autores se baseou na partição de partículas virais em SMDFA com o tensoativo não-iônico $C_{10}E_4$. Quando a separação das fases se inicia, domínios da F_c e F_d são formados na solução. Em casos em que a razão volumétrica das fases é $R \ll 1$ (equação 05), o aumento da temperatura de partição pode induzir a formação de domínios de F_c em F_d . Consequentemente, mesmo se houver poucos domínios de F_c em F_d , a concentração total de micelas em F_d será quantificada como sendo maior do que se não houvesse ocorrido tal efeito.

Outra hipótese para a interferência de TX-114 no método estaria relacionada com a presença de contaminantes em solução, tais como resíduos de glucanas provenientes da síntese do tensoativo TX-114. A presença de determinada quantidade de β -1,3 glucanas pode induzir uma resposta na reação com LAL (FERNANDEZ et al., 2004; MORITA et al., 1981; PEARSON et al., 1984).

Com o objetivo de elucidar esta hipótese, foi utilizado um bloqueador de β -glucanas (β -GB), o que permitiu um aumento da especificidade dos testes ao LAL (FDA, 1987). Os ensaios para testar o efeito dos β -GB na presença de prováveis β -glucanas foram realizados nas concentrações de 4,0 e 8,0% (p/p) de TX-114/tampão a temperaturas de 33,0 e 41,0°C. Os ensaios foram agrupados em dois tipos: (A) correspondente à ausência de β -GB, e (B) na presença de β -GB, como pode ser observado na Tabela 03.

TABELA 03. Resultados de interferência (UE/mL) no método de quantificação de LPS das fases diluídas na ausência (A) e presença (B) de β -GB. Os erros apresentados correspondem a um intervalo de confiança de 95,0% nos valores obtidos.

Ensaio	[TX-114] (%p/p)	T°C	(A) (ausência de β -GB)	(B) (presença de β -GB)
1	4,0	33,0	613,0 $\pm$ 20,2	558,0 $\pm$ 52,2
2	4,0	41,0	901,0 $\pm$ 58,3	825,0 $\pm$ 32,9
3	8,0	33,0	666,0 $\pm$ 37,3	670,0 $\pm$ 38,0

Como pode ser observado nos ensaios 1-3, os valores de interferência no método cinético cromogênico são devido à estrutura molecular da TX-114 e não à presença de β -glucanas. Os valores obtidos na ausência (A) e na presença (B) dos β -GB não apresentaram diferença estatística significativa. Por outro lado, se houvesse a presença de β -glucanas em solução, os β -GB teriam apresentado menores valores (em UE/mL) do que os obtidos. No entanto, uma vez que estes valores não podem ser diretamente relacionados à presença de LPS no meio, deve-se considerar o fato de que as estruturas de LPS e TX-114 apresentam similaridades.

2.3.2. Estudo da Partição de LPS Puro em SMDFA

O LPS foi purificado segundo metodologia descrita no Item 2.2.4. (Figura 13). A determinação da concentração do LPS puro apresentou semelhança à potência de outros LPS purificados obtidos a partir de *E. coli*, descritos na literatura (HOFFMANN et al., 2005).

Figura 13. Frascos de vidro contendo LPS puro liofilizado.

Para o estudo da partição de LPS em SMDFA, foi adicionado 1,0 g de LPS purificado ($[LPS]_{\text{inicial}} = 1,15 \times 10^6$ UE/mL), nas concentrações de 4,0, 6,0 e 8,0% (p/p) de TX-114/tampão e testado nas temperaturas de 33,0, 37,0 e 41,0°C, Tabela 04. A eficiência destes sistemas foi avaliada em termos de porcentagem de remoção ($\%REM_{LPS}$) e fator de remoção de LPS (FR_{LPS}). Devido às altas concentrações de moléculas de TX-114 em F_c , os LPS não foram quantificados nesta fase.

Paralelamente foi realizado um estudo de planejamento experimental a fim de se obter os maiores valores para as variáveis $\%REM_{LPS}$ e FR_{LPS} (Item

2.2.7.) O método analisado foi por superfície de resposta, que consiste de um conjunto de técnicas utilizadas para avaliar as relações entre uma ou mais variáveis respostas e um número de variáveis quantitativas independentes que podem ter efeitos importantes sobre as variáveis respostas analisadas (BOX et al., 1978).

TABELA 04. Resultados experimentais de partição de LPS puro em sistema TX-114/tampão, em diferentes concentrações e temperaturas. R corresponde à razão volumétrica entre as fases, $\%REM_{LPS}$ e FR_{LPS} correspondem à remoção e ao fator de remoção de LPS para a fase concentrada, respectivamente.

Ensaio	LPS puro (g)	[TX-114] (%p/p) (X_1)	T °C (X_2)	R (V_c/V_d)	$\%REM_{LPS}$	FR_{LPS}
1	1,0	4,0 / (-1)	33,0 / (-1)	0,41	98,8	79,0
2		4,0 / (-1)	41,0 / (1)	0,26	98,9	495,0
3		6,0 / (0)	37,0 / (0)	0,49	99,7	107,0
4		6,0 / (0)	37,0 / (0)	0,48	99,7	130,0
5		6,0 / (0)	37,0 / (0)	0,49	99,7	125,0
6		6,0 / (0)	37,0 / (0)	0,49	99,7	110,0
7		8,0 / (1)	33,0 / (-1)	0,57	95,7	2.938,0
8		8,0 / (1)	41,0 / (1)	0,59	99,9	12.773,0

X_1 =valores codificados de concentração de TX-114 (%p/p) [$X_1 = ([TX-114](\%p/p) - 6)/2$].
 X_2 =valores codificados de temperatura [$X_2 = (T^{\circ}C - 37)/4$]. As repetições no ponto central foram realizadas para a obtenção da variabilidade experimental (ensaio 4-6).

A porcentagem de remoção de LPS ($\%REM_{LPS}$) foi bastante elevada para todas as condições experimentais avaliadas. A análise de regressão mostrou que não foi afetada pelas variáveis independentes avaliadas, o que caracteriza uma falta de ajuste do modelo, apresentando diferença significativa entre os resultados (R^2 ajustado=0,53). Isto pode ser devido à equação utilizada para calcular $\%REM_{LPS}$ (equação 04), em condições de eficiente remoção, na qual o segundo termo da equação é insignificante quando comparado com o primeiro. Assim, decidimos considerar apenas a variável FR_{LPS} para a análise estatística.

Dos valores experimentais obtidos para a variável FR_{LPS} , através da análise de regressão, obteve-se um modelo teórico matemático para descrever os valores mais elevados para este parâmetro avaliado. A equação 07 descreve o efeito da temperatura e concentração de TX-114 em relação à remoção de moléculas de LPS em SMDFA. Os resultados da análise de variância estão apresentados na Tabela 05, como segue:

$$FR_{LPS} = 35510,5 - 1165,69 \times T\text{ }^{\circ}\text{C} - 9381,98 \times [\text{TX} - 114] + 301,609 \times T\text{ }^{\circ}\text{C} \times [\text{TX} - 114]$$

(07)

TABELA 05. Análise de variância para a variável FR_{LPS} , avaliando o efeito da variável temperatura dependendo do efeito da concentração de TX-114.

Parâmetro	Soma dos Quadrados	GL	Média dos Quadrados	F - Quadrado	Valor - p
A: T $^{\circ}\text{C}$	5,3081x10 ⁷	1	5,3081x10 ⁷	13,82	0,0099
B: [TX-114](%p/p)	1,0111x10 ⁸	1	1,0111x10 ⁸	26,32	0,0022
AB	4,6575x10 ⁷	1	4,6575x10 ⁷	12,13	0,0131
Erro total	2,3046x10 ⁷	6	3,8411x10 ⁶		
Total (corr.)	2,2381x10 ⁸	9			

R² ajustado=0,84; Desvio-padrão=1959,89. GL corresponde aos graus de liberdade.

Os valores mais elevados de FR_{LPS} foram obtidos com a combinação de condições mais elevadas de temperatura e concentração de TX-114. Como pode ser analisada pela superfície de resposta na Figura 14. Para uma temperatura fixa, por exemplo, a temperatura mais alta empregada (41,0 $^{\circ}\text{C}$), e com concentrações crescentes de TX-114, há um incremento da variável FR_{LPS} . De acordo com o modelo, a variável FR_{LPS} aumenta significativamente a 41,0 $^{\circ}\text{C}$, com o aumento da concentração inicial de TX-114; este efeito depende da concentração de LPS presente em F_d .

Figura 14. Gráfico de superfície de resposta para FR_{LPS} em função da temperatura e concentração de TX-114 (%p/p).

Baseado nos valores obtidos para FR_{LPS} , o ensaio a 4,0% (p/p) de TX-114 a 33,0°C apresentou o menor valor (79,0). Inversamente, quando a concentração de moléculas de LPS presente na fase diluída foi menor, especialmente para as condições mais extremas, como a 8,0% (p/p) de TX-114 a 33,0 e 41,0°C, os valores de FR_{LPS} foram bastante elevados (2.938 e 12.773, respectivamente). Isto significa que o aumento da temperatura e concentração de TX-114 resultaram em uma menor concentração de LPS em F_d associado ao menor volume desta fase (V_d) e, portanto, um maior fator de remoção de moléculas de LPS para F_c .

A partição de moléculas de LPS para a fase concentrada do sistema micelar pode estar relacionada com o que foi proposto por Anspach (2001), que observou que estas moléculas podem formar vários agregados supramoleculares em solução aquosa devido às suas características anfipáticas. As interações entre as cadeias apolares lipídicas, assim como as ligações geradas entre os grupos fosfato, é um fenômeno que pode ser favorecido pela presença de tensoativos em solução aquosa.

No que diz respeito à concentração micelar crítica, acima da CMC, moléculas de LPS são acomodadas em estruturas micelares por interações polares entre as cadeias alquila de lipídeos A e as caudas apolares do tensoativo, sendo, conseqüentemente separados da fase diluída. Os tensoativos da série dos Tritons mostram uma determinada miscibilidade em soluções aquosas, acima de uma temperatura crítica, gotículas de agregados micelares apresentam um teor de água reduzido, e tendem a se concentrar em uma nova fase. Assim, após a separação de fases induzida pelo aumento da temperatura, é bastante provável que moléculas de LPS interajam com as de Triton X-114, caracterizando uma fase rica em micelas (AIDA; PABST, 1990; BORDIER, 1981; LIU et al., 1996).

Em outras palavras, a interação entre moléculas de LPS e TX-114 em água pode influenciar a formação de agregados micelares do tipo mistos, como mostra a Figura 15. De um ponto de vista geral, os resultados mostraram o particionamento de altas concentrações de LPS para a fase concentrada, o que demonstra a aplicabilidade do SMDFA como primeira etapa de purificação para remoção deste contaminante.

Figura 15. Representação esquemática de um sistema micelar do tipo misto, composto por moléculas de TX-114 e LPS. Com a separação das fases, as moléculas de LPS particionam para a fase concentrada interagindo com moléculas de TX-114.

2.3.3. Medidas de Espalhamento de Raios-X a Baixos Ângulos para as Soluções de Triton X-114 e LPS

Com o objetivo de melhor estudar os sistemas micelares de duas fases aquosas e as soluções de LPS em meio aquoso, realizaram-se medidas de SAXS para várias concentrações de Triton X-114 e para o LPS purificado. Através deste estudo pode-se estimar o tamanho, forma e o comportamento das estruturas micelares formadas pela molécula do tensoativo não-iônico e do lipolissacarídeo em ambiente aquoso (mais detalhes da teoria de SAXS ver Apêndice A).

A Figura 16 mostra as curvas de SAXS dos sistemas compostos por TX-114 em diferentes concentrações (90, 180, 270 e 450 mmol/L), esta curva apresenta um comportamento característico de sistemas micelares: um mínimo bem definido em $q \sim 0.10 \text{ \AA}^{-1}$ e também a presença de um segundo pico na região de $q \sim 0.17 \text{ \AA}^{-1}$. A posição deste mínimo e do pico na região de médios valores de q estão relacionadas com a forma da micela. Além disso, é interessante notar o comportamento das curvas de SAXS na região de pequenos valores de q . Estes picos são característicos de sistemas interagentes e tais interações devem ser consideradas na metodologia de análise.

Como podemos observar na Figura 16 (*inset*), as curvas de espalhamento praticamente se sobrepõem na região de $q > 0.10 \text{ \AA}^{-1}$. Este fato

indica que as micelas formadas por este tensoativo nas mais diferentes concentrações são similares entre si, ou seja, não deve existir uma variação tão grande da forma das micelas em função da concentração de Triton X-114.

Considerando a região de pequenos valores de q , podemos observar que o aumento na concentração de TX-114 induz uma diminuição da intensidade espalhada nas curvas de SAXS pela concentração de tensoativo.

Figura 16. Curvas de SAXS em função da intensidade e do fator forma (q) das micelas, para sistemas constituídos por Triton X-114 em diferentes concentrações: 90 (quadrado preto), 180 (círculo vermelho), 270 (triângulo azul) e 450 mM (triângulo topázio).

A Figura 17 mostra os ajustes das curvas de SAXS obtidos com o modelo. A análise das curvas de SAXS mostra que realmente as micelas de TX-114 não se alteram em função da concentração de tensoativo. Os

parâmetros de ajuste das micelas são o raio parafínico, a anisometria, a espessura e a densidade eletrônica da região polar. Os parâmetros relacionados ao fator de forma das micelas de TX-114 são os mesmos em todos os casos. O raio parafínico é de 12 Å, enquanto que a espessura da região polar e sua densidade eletrônica são iguais a 14 Å e 0.40 e/Å³.

Figura 17. Curvas de SAXS em função da intensidade e do fator forma (q) das micelas, para os sistemas estudados (quadrados pretos), juntamente com os melhores ajustes obtidos.

Interessantemente, observa-se um efeito nas curvas de SAXS destas micelas similar ao efeito verificado em proteínas em solução, também utilizando a técnica de SAXS. Em alguns casos, onde a densidade de cargas na superfície micelar é baixa (no caso estudado ela é nula), é possível observar uma função de interferência atrativa a baixas concentrações, e na medida em que a concentração protéica (ou micelar, como no caso) aumenta tal função diminui e dá lugar a uma função repulsiva. A Figura 18 mostra essas funções de interferência para os diferentes sistemas.

Figura 18. Funções de interferência $S(q)$ em função do fator forma (q) das micelas, estudados em diferentes concentrações de Triton X-114. mM corresponde à mmol/L.

Como pode ser observado, as funções de interferência para os sistemas compostos por concentrações mais baixas de TX-114 apresentam um valor maior que 1 para $S(q \rightarrow 0)$. Este fato indica que as interações entre as micelas de TX-114 nessas condições têm um carácter atrativo, enquanto que nos casos em que este valor é menor que 1 as interações resultantes entre as micelas de TX-114 são repulsivas.

O passo seguinte do trabalho foi realizar medidas com o LPS puro em solução aquosa. Infelizmente, devido à baixa resolução da técnica de SAXS apenas o sistema em presença de alta concentração de LPS teve sinal detectável. Na realidade, a concentração de LPS testada em UE/mL foi bastante alta, da ordem de 10^6 UE/mL; no entanto, em termos de molaridade, esta correspondeu a 2,0 $\mu\text{mol/L}$, a qual pode ser quantificada pelo método. A Figura 19 mostra a curva de espalhamento junto com o melhor ajuste obtido utilizando-se a mesma metodologia empregada no caso das micelas de TX-114. Aqui, os LPS comportaram-se como um longo cilindro em solução com

dois níveis diversos de densidade eletrônica, como em uma micela. Neste caso, o raio interno do cilindro (que seria equivalente ao raio parafínico da micela de TX-114) é igual a 20 Å, enquanto que a espessura da segunda região (equivalente à espessura da região polar de uma micela) é igual a 40 Å. Nessas condições, o raio total do cilindro é igual a 60 Å e seu comprimento igual a 340 Å.

Figura 19. Curva de SAXS em função da intensidade e do fator forma (q) das micelas, para a solução contendo LPS puro em água apirogênica (2,0 $\mu\text{mol/L}$ de LPS), juntamente com o melhor ajuste obtido através do modelo de cilindro com dois níveis de densidade eletrônica diferentes.

Em suma, as interações entre moléculas de Triton X-114 e LPS, bem como o mecanismo envolvido na formação de micelas do tipo mistas ainda é pouco compreendida. Sendo necessária a investigação destas interações com o intuito de estimar o tipo de estrutura formada, tamanho e forma destas micelas.

No que tange o tema sobre remoção LPS, a eliminação destes contaminantes em uma única etapa de purificação para níveis aceitáveis é extremamente difícil devido à composição química complexa da molécula de LPS. No entanto, os resultados obtidos neste capítulo mostraram que o SMDFA é um processo simples, de fácil manuseio e potencialmente útil para

remoção de grandes quantidades de lipolissacarídeos como primeira etapa de purificação. Contudo, devem-se considerar presentes outros componentes biológicos como a proteína-alvo, de maneira que esta não deve ser removida juntamente com os contaminantes do processo. Neste aspecto, estudou-se no Capítulo III a otimização do processo, no qual foi avaliado os parâmetros: coeficiente de partição ($K_{GFP_{UV}}$), balanço de massa ($\%BM_{GFP_{UV}}$), porcentagem de remoção de LPS ($\%REM_{LPS}$) para amostras contendo GFP_{uv} pura e proveniente do homogeneizado celular de *E. coli* recombinante.

2.4. Conclusões

Os resultados indicaram que o tensoativo não-iônico Triton X-114 apresenta interferência no método de quantificação de LPS, provavelmente devido à semelhança entre a estrutura da molécula do tensoativo e a de LPS.

Os estudos de partição com o LPS puro indicaram que o sistema micelar de duas fases aquosas foi bastante eficiente em remover altas concentrações de LPS para a fase concentrada (rica em micelas), com valores de $\%REM_{LPS} > 95,0\%$.

Com base nos resultados obtidos a partir das curvas de SAXS para as amostras do tensoativo não-iônico Triton X-114, pode-se afirmar que as interações entre as micelas formadas dependem da concentração do tensoativo. Nas menores concentrações de Triton X-114 (90 e 270 mmol/L), as micelas formadas apresentaram atração entre si ($q > 1$). Por outro lado, com o aumento da concentração (270 e 450 mmol/L), o efeito de repulsão entre as micelas foi observado ($q < 1$). Com relação aos resultados obtidos com a solução de LPS puro, nota-se que as moléculas de LPS tendem a se auto-associarem formando cilindros, assemelhando-se a estruturas micelares. E ainda, estas observações levam a crer que existe a possibilidade de formação de micelas mistas entre moléculas de Triton X-114 e LPS quando em contato em ambiente aquoso.

CAPÍTULO III

OTIMIZAÇÃO DO ESTUDO DA PURIFICAÇÃO DE GFP_{uv} PROVENIENTE DE MEIO FERMENTADO DE *E. coli* EM SISTEMA MICELAR DE DUAS FASES AQUOSAS

**André M. Lopes¹, Pérola O. Magalhães²,
Priscila G. Mazzola³, João C. M. de Carvalho¹,
Thereza C.V. Penna¹ e Adalberto Pessoa-Jr¹**

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

²School of Health Sciences, University of Brasília – FS/UnB

³Department of Clinical Pathology, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas – Unicamp

3.1. INTRODUÇÃO

No campo biotecnológico para a produção de biomoléculas de interesse clínico-farmacêutico a remoção de LPS tem ocupado muitos pesquisadores e tem sido o motivo de muitas pesquisas nesta área. Um fator importante neste tema é que alguns processos utilizados para a remoção desses contaminantes de materiais biológicos podem causar efeitos indesejáveis às proteínas de interesse (FERREIRA et al., 2000; KANG; LUO 1998).

O caminho mais seguro para evitar contaminação microbiana e minimizar a presença de LPS é o emprego da esterilização durante as etapas iniciais da produção. E ainda, a utilização de processos de purificação para a remoção de resquícios de contaminantes. Um método de remoção deve assegurar a alta recuperação do bioproduto-alvo. Apesar dos protocolos de purificação reduzirem os níveis de LPS contaminante, a garantia para a liberação só é dada quando a concentração de LPS está abaixo do limite tolerável para um bioproduto específico. Por um lado, pode acontecer que o lote dos produtos finais seja contaminado acidentalmente, sendo este classificado como fora do controle de qualidade. Este produto deverá ser descartado e o reprocessamento não é uma regra específica; além disso, apresenta um custo elevado. Submeter esse lote à remoção de contaminantes não é permitido devido aos regulamentos de Boas Práticas de Fabricação, a menos que esta etapa faça parte do processo de validação (PETSCH; ANSPACH, 2000; MAGALHÃES; PESSOA-JR, 2010).

Bioprodutos de interesse podem ser purificados em sistemas constituídos por duas fases aquosas imiscíveis, em decorrência da partição diferenciada desses e das impurezas entre as fases líquidas. A partição de biomoléculas depende principalmente das propriedades físico-químicas das proteínas, tais como o *pI*, hidrofobicidade da superfície, massa molar e as características do meio de partição. Dentre essas características, podem ser destacados o tipo e concentração de polímero ou tensoativo utilizado, pH do meio e o tipo e concentração de sal. Pelo controle desses fatores, pode-se aumentar a seletividade da partição e recuperação da biomolécula-alvo.

O sistema micelar de duas fases aquosas garante remoções de altas concentrações de LPS para a fase concentrada (rica em micelas), o que torna esse tipo de processo bastante atrativo para a purificação de proteínas

hidrofílicas. Outro ponto vantajoso é que, com a separação das fases dos sistemas, o elevado teor de água das fases formadas (75,0-90,0% em massa) garante a manutenção das propriedades biológicas da proteína-alvo (ALBERTSSON, 1986; ASENJO, 1990; TUBIO et al., 2007).

Apesar do grande avanço nos estudos de sistemas de duas fases aquosas para purificação de proteínas que ocorreu na última década, pouco foi investigado até o presente a respeito da utilização desses sistemas para remoção de LPS (MAGALHÃES et al., 2006, 2008). O primeiro trabalho nesta área surgiu em 1990 e relata a remoção de LPS de *S. typhimurium* radiomarcado. Observou-se remoção completa do LPS após realização de ciclos sucessivos de separação de fases, com cada ciclo correspondendo a somente 2,0% de perda de proteínas totais (AIDA; PABST, 1990). Em sequência, outros trabalhos surgiram relatando aplicação prática dos SMDFA para remoção de LPS e comparando essa metodologia com as técnicas comumente aplicadas (ADAM et al., 1995; LIU et al., 1997).

Por mais de 40 anos, os sistemas de duas fases aquosas (SDFA) formados quando misturas de polímeros solúveis em água são combinados com outros polímeros ou com determinados sais inorgânicos acima das concentrações críticas são utilizados em separações, concentrações e fracionamento de solutos biológicos e partículas (WILLAUER et al., 2002). Atualmente, os SDFA formados não somente por polímeros e sais, mas também por tensoativos (micelas tradicionais ou reversas - SMDFA) ou por copolímeros em blocos, têm sido estudados para a purificação de biomoléculas de interesse (MAZZOLA et al., 2008).

O estudo da adição de sais em SMDFA apresenta uma interessante possibilidade de investigação da influência da partição, não só da biomolécula-alvo, mas também do contaminante, para determinada fase do sistema. Isto significa que diferentes íons podem apresentar diferentes afinidades pelas duas fases do sistema micelar (COSTA et al., 1998; HARRIS et al., 1994; UMAKOSHI et al., 1996).

Figura 20. Representação esquemática dos íons da série de Hofmeister em solução aquosa.

Adaptado de:

<http://employees.csbsju.edu/HJAKUBOWSKI/classes/ch331/protstructure/olhydrophobprot.html>

Existem alguns íons que são classificados quanto a sua atuação, conhecidos como íons da série de Hofmeister (Figura 20), que devem agir na estrutura da água e na propriedade de estabilizar proteínas de duas formas (COLLINS; WASHABAUGH, 1985): os íons cosmotrópicos (exemplos: sulfato, fosfato, cloreto) aumentam a estrutura da água e estabilizam proteínas, enquanto os caotrópicos (exemplos: tiocianato, perclorato) decrescem a estrutura da mesma e desestabilizam as proteínas, deixando o meio aquoso menos hidrofóbico. Isto explica o decréscimo do poder de solubilidade da água pela ação de íons cosmotrópicos que aumentam a partição de solutos em solventes orgânicos, enquanto o oposto é observado para íons caotrópicos (ANACKER; GHOSE, 1963; SCHOTT et al., 1984; SUDHÖLTER; ENGBERTS, 1979; TONOVA; LAZAROVA, 2005).

A adição de sais, mesmo que em concentrações milimolares, pode influenciar a partição de moléculas eletricamente carregadas. Embora os sais se distribuam quase que igualmente entre as fases, existem pequenas, mas significativas, diferenças nos coeficientes de partição de diferentes íons, o que

cria uma diferença de potencial elétrico entre as fases que, por sua vez, pode influenciar a partição de moléculas biológicas carregadas (SARUBBO et al., 2000).

Neste capítulo realizamos um estudo de otimização através de um planejamento estatístico (2^2) para a partição da GFPuv em SMDFA, avaliado pela metodologia de superfície de resposta. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da temperatura (baseado no efeito de volume de exclusão – EV) na partição da proteína-alvo em diferentes concentrações de tensoativo não-iônico Triton X-114. E ainda, aplicar as melhores condições experimentais obtidas com o planejamento estatístico para o estudo na presença do homogeneizado celular de *E. coli* e da adição de sais em SMDFA.

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1. Materiais

A ampicilina anidra foi obtida da Palmares (ERVY Comercial e Importadora Ltda.) e o IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo) da Sigma (St. Louis, MO). A solução estoque de tampão Tris-EDTA 200 mM (pH 8,0) foi preparada dissolvendo 2,4225 g de Tris hidroxil metil aminometano (Serva Feinbiochemica GmbH & Co, Alemanha) e 0,0374 g de EDTA (Vetec Quimica Fina – Brasil) em 60 mL de água deionizada. Essa mistura foi homogeneizada e o pH da solução ajustado com 1,0 M de HCl. O volume final foi ajustado para 100 mL, e finalmente, a solução estocada em geladeira a 4,0°C. A solução tampão Tris-EDTA 10 mM (pH 8,0) foi preparada por diluição a partir da solução estoque. O tampão de extração foi preparado em 3 etapas: para a solução tampão Tris-HCl 25 mM (pH 8,0) dissolveu-se 0,30275 g de Tris hidroxil metil aminometano em 90 mL de água deionizada. O pH foi ajustado com solução 1,0 M de HCl e conservado a 4,0°C. Para a solução de PMSF (fenil metil sulfonil fluoreto, USB, Suíça) 0,1 Mm, dissolveu-se 0,001742 g de PMSF em 1 mL de etanol. O volume foi completado com água deionizada para 10 mL. Adicionaram-se 10 mL em 90 mL da solução Tris-HCl. Para a solução de β -Mercaptoetanol 1,0 mM, adicionou-se 0,8 mL de β -mercaptoetanol em 100 mL da solução de PMSF. O tampão de extração foi finalmente estocado em frasco âmbar, e mantido sob refrigeração.

3.2.2. Determinação da Concentração de Proteínas Totais

A concentração total de proteínas no sistema proveniente do homogeneizado celular de *E. coli* recombinante, antes e após a separação de fases (somente da fase diluída), foi determinada pelo método de BCA (ácido bicinconínico) (SMITH et al., 1985). Este método baseia-se na reação das ligações peptídicas e cadeias laterais dos aminoácidos cistina, cisteína, triptofano e tirosina com o Cu^{2+} em solução alcalina, reduzindo-o a Cu^+ . O Cu^+ , por sua vez, forma um complexo solúvel em água com duas moléculas de BCA, de cor púrpura, que absorve fortemente a 562 nm. Portanto, em tubo de ensaio foram adicionados 50 μL da amostra contendo proteínas e 1 mL do reagente de BCA na proporção de 1:50, preparado a fresco pela mistura de solução de sulfato cúprico ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) a 4,0% com solução constituída de 1,0% de BCA sódico, 0,16% de tartarato de sódio, 0,4% de NaOH e de 0,95% de bicarbonato de sódio (pH 11,25, ajustado com NaOH). O tubo foi incubado a 37,0°C por 30 minutos. Após este período, o tubo foi resfriado à temperatura ambiente e a absorbância da solução lida a 562 nm em espectrofotômetro (Beckmann DU-640), utilizando-se água deionizada como branco. A concentração total de proteínas na amostra foi então obtida a partir de curva de calibração (Apêndice B), construída com base em soluções de albumina de soro bovino (BSA), com concentrações variando de 20 a 2.000 mg/L.

3.2.3. Cultivo de *E. coli* DH5- α para a Obtenção de GFPuv

Produção

A GFPuv foi produzida por meio do cultivo da cepa de *Escherichia coli* DH5- α congelada em glicerol. Uma alçada foi transferida para uma placa de Petri contendo ágar LB (Luria-Bertani, Difco), IPTG, indutor da expressão de fluorescência da proteína nas células, em concentração final de 0,5 mM (v/v) e 100 mg/mL de ampicilina. A placa foi incubada em estufa (Fanem, BOD 347) a 37°C, por 24 horas. Após este período, uma colônia foi transferida para 25 mL de caldo LB acrescentado de 100 mg/mL de ampicilina, e cultivada em agitação a 100 rpm (Tecnal, TE424), a 37,0°C por 24 horas. Após 2 horas de cultivo, adicionou-se IPTG suficiente para que a concentração final no frasco Erlenmeyer fosse de 0,5 mM (v/v).

Extração

Após a homogeneização a GFPuv foi extraída das células pela técnica do TPP (*Three Phase Partitioning* – partição em três fases). Decorrido esse período, todos os Erlenmeyers tiveram seus conteúdos vertidos em tubos de centrífuga de 50 mL e centrifugados a 8.820xg (Jouan BR4i, França), por 20 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado, e o *pellet* formado foi ressuspensionado em 2,0 mL de tampão de extração (Tris-EDTA 25 mM, pH 8,0; 1 mM β -mercaptoetanol e 0,1 mM fenilmetilsulfonilflúor – PMSF) por agitação em vórtex. Em seguida, misturou-se o conteúdo de dois tubos em um tubo de centrífuga de 15 mL, o que gerou aproximadamente 4,0 mL de amostra, e homogeneizou-se em vórtex (Quimis Q-220A).

A extração foi iniciada com a adição de 3,0 mL de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4,0 M e 7,0 mL de álcool butílico terciário (Mallinckrodt Baker, Kentucky), sob agitação vigorosa em vórtex por 8 minutos e centrifugado a 8.820xg, por 20 minutos, à temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante contendo t-butanol e o disco de células formado na interfase foram descartados, pois nesses não havia mais resquícios de GFPuv. A proteína GFPuv foi recuperada na fase inferior aquosa, uma alíquota da solução restante foi estocada em *ultrafreezer* a - 60,0°C para os estudos de partição contendo o homogeneizado celular em SMDFA. A outra parte da alíquota foi empregada para a obtenção da GFPuv pura por coluna de interação hidrofóbica.

Essa alíquota apresentou fluorescência intensa quando iluminada com luz UV, e então adicionou-se 7,0 mL de t-butanol, agitou-se vigorosamente em vórtex por 8 minutos e centrifugou-se a 8.820xg, por 20 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e a fase inferior contendo GFPuv foi dissolvida em 1,0 mL de tampão de extração.

Purificação

Após estas etapas, a purificação da GFPuv foi realizada em coluna de interação hidrofóbica de resina butil (HiPrep™ 16/10 Butil FF, Amersham Pharmacia), através de uma bomba peristáltica (P1 Amersham Biosciences, Uppsala, Suíça), primeiramente com adição de 40 mL de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2,0 M (Figura 21). Em seguida, ao volume obtido de solução (GFPuv + tampão de extração), adicionou-se o mesmo volume de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4,0 mol/L. Em seguida,

a solução foi injetada na coluna. E então, adicionou-se aproximadamente, 20 a 40 mL de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,3 mol/L para remover proteínas e outros compostos que não GFPuv. Para eluí-la da coluna, adicionou-se tampão Tris-EDTA 10 mM até que toda GFPuv fosse eluída da coluna. Essa eluição foi acompanhada com o auxílio de luz UV portátil. As amostras contendo GFPuv foram recolhidas em frascos transparentes. Ao fim, a coluna foi lavada com aproximadamente 50 mL de água Milli-Q e, finalmente, passou-se 20 mL de etanol 20,0%. A concentração de GFPuv purificada foi então determinada.

Figura 21. Purificação da proteína GFPuv por coluna de interação hidrofóbica. GFPuv ligada à resina por interações hidrofóbicas confrontada com luz UV.

3.2.4. Determinação da Concentração de GFPuv

As amostras contendo GFPuv foram quantificadas por método de fluorescência (RF 5301PC Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). Os comprimentos de onda utilizados foram de $\lambda_{\text{exc.}}=394$ nm e $\lambda_{\text{em.}}=509$ nm, baseando-se na curva padrão preparada com GFPuv padrão (Clontech, Palo Alto, CA, Estados Unidos), segundo Vessoni-Penna e Chiarini, 2003 (Apêndice C).

3.2.5. Estudo da Partição de GFPuv pura em SMDFA

O estudo da partição da GFPuv pura foi testada em SMDFA nas concentrações de 4,0, 6,0 e 8,0% (p/p) de TX-114/tampão, às temperaturas de 29,0, 33,0 e 37,0°C. Para o preparo destes ensaios foi adicionado ao sistema 0,5 g de solução de GFPuv pura ($[GFPuv]_{inicial}=91,0 \mu\text{g/mL}$).

3.2.6. Estudo da Partição do Homogeneizado Celular de *E. coli* em SMDFA

O estudo da partição com o homogeneizado celular de *E. coli* DH5- α foi testado em SMDFA nas condições 4,0 e 1,2% (p/p) de TX-114/tampão, às temperaturas de 60,0 e 48,0°C. Os resultados foram comparados com a partição da GFPuv pura nas mesmas condições.

3.2.7. Planejamento Experimental

Para os experimentos de partição da GFPuv pura adicionada em SMDFA foi utilizado um planejamento estatístico denominado planejamento em estrela, que consiste em um modelo linear de duas variáveis em dois níveis (do tipo 2^2), com um ponto central, adicionado de um planejamento idêntico porém girado de 45 graus em relação à orientação de partida, segundo Barros Neto et al. (2007) e Rodrigues e Iemma (2005).

Para a análise estatística dos resultados foram adotadas 2 variáveis respostas: coeficiente de partição (K_{GFPuv}) e porcentagem de recuperação da proteína-alvo ($\%REC_{GFPuv}$). Assim, a melhor condição baseada nos resultados estatísticos obtidos foi definida como aquela que proporcionou a melhor combinação entre estas respostas.

As repetições no ponto central foram realizadas para a obtenção da variabilidade experimental e com isto avaliar a significância estatística dos efeitos. Após a realização dos experimentos nas condições previamente estabelecidas, como mostra a Tabela 06, foi efetuada a análise estatística dos resultados obtidos, com o auxílio do *software Statgraphics Centurion XV* versão (15.2.05).

TABELA 07. Matriz completa de ensaios do planejamento experimental 2^2 .

Ensaios	[TX-114] (%p/p)	EV	T °C	X ₁	X ₂
1	2,0	0,35	52,0	-1	-1
2	6,0	0,35		1	-1
3	2,0	0,51	68,0	-1	1
4	6,0	0,51		1	1
5	4,0	0,32	48,0	0	$-\sqrt{2}$
6	4,0	0,54	72,0	0	$\sqrt{2}$
7	1,2	0,43		$-\sqrt{2}$	0
8	6,8	0,43	60,0	$\sqrt{2}$	0
9	4,0	0,43		0	0
Ensaios de repetição do ponto central					
10	4,0	0,43		0	0
11	4,0	0,43	60,0	0	0
12	4,0	0,43		0	0

*X₁=valores codificados de concentração de TX-114 (%p/p) [$X_1 = ([TX-114](\%p/p) - 6)/2$].
X₂=valores codificados de EV [$X_2 = (EV - 0,43)/0,08$].

3.2.8. Estudo da Presença de Sais em SMDFA

Neste item de estudo, foi investigado inicialmente o efeito da presença de sais na curva binodal do sistema TX-114/tampão. Para isso, avaliou-se concentrações de 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 5,0, 7,0, 9,0 e 12,0% (p/p) de TX-114/tampão em soluções salinas de MgSO₄ e (NH₄)₂SO₄ a 0,2 mol/L, CaCl₂ e KI a 0,2 e 0,5 mol/L. E, posteriormente, a adição destes sais na concentração de 0,2 mol/L a 4,0% (p/p) de TX-114/tampão a 60,0 °C, na presença de GFPuv e LPS puros em SMDFA.

3.2.9. Metodologia de Análise dos Resultados

Os resultados obtidos foram analisados em termos de coeficiente de partição, K_{GFPuv} , definido na equação 01, em termos de porcentagem de remoção de LPS (% REM_{LPS}), conforme equação 04, e razão volumétrica entre as fases do sistema (R), conforme equação 05.

A concentração de proteína-alvo, GFP_{uv}, foi calculada com base na porcentagem de recuperação de GFP_{uv} (%*REC*_{GFP_{uv}}), conforme equação 08:

$$\%REC_{GFP_{uv}} = \left(\frac{C_{GFP_{uv},d} \times V_d}{C_{GFP_{uv},i} \times V_{GFP_{uv},i}} \right) \times 100\% \quad (08)$$

em que $C_{GFP_{uv},d}$ e $C_{GFP_{uv},i}$ referem-se às concentrações do componente GFP_{uv} (µg/mL) na fase diluída e na solução estoque inicialmente adicionada ao sistema, respectivamente. V_d e $V_{GFP_{uv},i}$ são os volumes da fase diluída e da solução estoque inicialmente adicionada ao sistema, respectivamente.

O fator de purificação (f_p) foi calculado de acordo com a equação 09:

$$f_p = \frac{A_{e,d}}{A_{e,i}} \quad (09)$$

em que $A_{e,d}$ e $A_{e,i}$ correspondem aos valores de atividade específica na fase diluída e na solução estoque inicialmente adicionada ao sistema, respectivamente, sendo a atividade específica definida pela equação 10:

$$A_e = \frac{C_{GFP_{uv}}}{C_p} \quad (10)$$

3.3. Resultados e Discussão

3.3.1. Estudos da Partição de GFPuv Pura em SMDFA

A partição da GFPuv pura foi testada em SMDFA composto pelo sistema Triton X-114/tampão, com a adição de 0,5 g de solução de GFPuv ($[GFPuv]_{inicial}=91,0 \mu\text{g/mL}$) nas concentrações de 4,0, 6,0 e 8,0% (p/p) de TX-114 e temperaturas de 29,30, 33,30 e 37,30°C. Os resultados obtidos de coeficiente de partição da GFPuv (K_{GFPuv}), recuperação da biomolécula ($\%REC_{LPS}$) e remoção de LPS ($\%REM_{LPS}$) estão apresentados na Tabela 08.

TABELA 08. Resultados experimentais da partição da GFPuv pura em sistema TX-114/Tampão. R corresponde à razão volumétrica entre as fases do sistema, K_{GFPuv} ao coeficiente de partição da GFPuv, $\%REC_{GFPuv}$ à recuperação da GFPuv e $\%REM_{LPS}$ à remoção de LPS.

Ensaio	[TX-114] (%p/p)	T °C	R (V_c/V_d)	K_{GFPuv}	$\%REC_{GFPuv}$	$\%REM_{LPS}$
1	4,0	29,30	0,34	$2,05 \pm 0,04$	83,0	99,4
2	4,0	37,30	0,27	$4,34 \pm 0,03$	93,0	99,4
3	6,0	33,30	0,64	$2,53 \pm 0,05$	76,0	99,8
4	8,0	29,30	2,12	$1,86 \pm 0,06$	39,0	99,9
5	8,0	37,30	0,70	$3,97 \pm 0,03$	74,0	99,9
Quantificação de LPS proveniente da purificação da GFPuv						
Amostras	[LPS] (UE/mL)		$\%REM_{LPS}$			
GFPuv antes da purificação	10^6		-			
GFPuv após a purificação	$1,1 \times 10^5$		89,0			

Com base nos resultados de K_{GFPuv} obtidos nos ensaios, fica claro que a proteína-alvo, GFPuv, particiona preferencialmente para fase diluída (pobre em micelas), fato comprovado pelos valores de $K_{GFPuv} > 1,0$. Nas condições estudadas, o efeito de partição dessa biomolécula é governado pelo aumento da temperatura, como pode ser visualizado nos ensaios 1, 2 e 4, 5, nos quais com um aumento de 8,0°C o valor de K_{GFPuv} duplicou nos dois casos. Com a elevação da temperatura, ocorre um aumento do efeito de EV , refletido pelo aumento da concentração de micelas na F_c , o que influencia a exclusão por volume da GFPuv para a F_d . Aliado a este efeito notou-se, no ensaio 2, $\%REC_{GFPuv}=93,0\%$, o qual possui também o maior, $K_{GFPuv}=4,34$; o valor de

$\%REC_{GFP_{UV}}$ obtido está associado ao volume da F_d , que foi o maior obtido nos ensaios testados (como pode ser constatado com o valor $R=0,27$). Por outro lado, o ensaio 4 apresentou os menores valores de $K_{GFP_{UV}}$ e de $\%REC_{GFP_{UV}}$ (1,86 e 39,0%, respectivamente), pois nessa condição o volume da F_d do sistema obtido foi muito reduzido ($R=2,12$).

O parâmetro $\%REM_{LPS}$, que demonstra a porcentagem de LPS removidos para a F_c , apresentou valores superiores a 99,0% de remoção. Os ensaios 1-5 podem ser considerados eficientes para a remoção de LPS presentes em amostras de GFP_{uv} pura.

A quantificação das concentrações de LPS antes e após a purificação da GFP_{uv} por coluna de interação hidrofóbica também foi realizada. A concentração de LPS inicial antes da purificação foi da ordem de 10^6 UE/mL. Após a purificação da proteína-alvo, a concentração de contaminante caiu para aproximadamente $1,1 \times 10^5$ UE/mL, apresentando uma $\%REM_{LPS}=89,0\%$. Esse processo também foi capaz de remover altas concentrações de moléculas de LPS para a fase concentrada em micelas. No entanto, esse valor foi inferior aos obtidos com a separação de fases por TX-114 (ensaios 1-5). Apesar das altas concentrações de LPS removidas para F_c , a concentração final de LPS foi de aproximadamente 66,00 UE/mL. Contudo, baseado nos limites de tolerância preconizados pelas agências regulatórias, para a liberação de produtos farmacêuticos e biológicos, tal concentração final é insatisfatória, de maneira que deve ser reduzida a concentrações finais de até 5,0 UE/Kg (ANVISA, 2004; DANESHIAM et al., 2006; USP, 2002).

Tendo como prioridade a F_d do sistema micelar, pois é nessa fase que a GFP_{uv} é recuperada, o processo ideal para a purificação desta proteína seria aquele que obtém os maiores valores de $K_{GFP_{UV}}$, $\%REC_{GFP_{UV}}$ e $\%REM_{LPS}$. Com o intuito de encontrar essa combinação de respostas, decidiu-se ampliar os experimentos utilizando condições com temperaturas mais elevadas, mantendo as mesmas concentrações de TX-114 utilizadas. Com isso, foi possível otimizar o sistema utilizando as variáveis resposta avaliadas, $K_{GFP_{UV}}$ e $\%REC_{GFP_{UV}}$, e posteriormente, aplicar as melhores condições obtidas com o planejamento experimental para a partição do homogeneizado celular de *E. coli* e para a partição de GFP_{uv} e LPS puros na presença de sais.

3.3.2. Resultados do Planejamento Experimental

Neste Item, estão discutidos os resultados obtidos nos ensaios elaborados conforme o planejamento experimental ampliado (em estrela), abordado no Item 3.2.7. Os resultados obtidos foram confrontados em termos de concentração de tensoativo não-iônico TX-114 e de efeito do volume de exclusão (EV). As 2 variáveis resposta avaliadas foram o coeficiente de partição ($K_{GFP_{UV}}$) e a porcentagem de recuperação ($\%REC_{GFP_{UV}}$) da proteína-alvo pura. Para a comparação dos resultados experimentais obtidos de $K_{GFP_{UV}}$ e $\%REC_{GFP_{UV}}$ apresentados, com o modelo matemático proposto por Nikas et al. (1992) (equação 02), é fundamental o conhecimento do valor de EV ($\phi_c - \phi_d$) para cada temperatura estudada. O valor de ($\phi_c - \phi_d$) pode ser obtido a partir da curva binodal do sistema TX-114/tampão, uma vez que a temperatura de separação de fases é conhecida. Assim, para facilitar a visualização dos sistemas, cada um deles, num dado valor, de EV foi convertido em temperatura de partição, Tabela 09.

TABELA 09. Ensaios de partição da GFP_{uv} pura adicionada em SMDFA em diferentes concentrações de TX-114 e de EV . Para cada temperatura ($T^{\circ}C$) foram calculados os valores de EV correspondentes. R corresponde à razão volumétrica entre as fases do sistema.

Ensaios	[TX-114] (%p/p)	$T^{\circ}C$	EV	R (V_c/V_d)
1	1,2	60,0	0,43	0,04
2	2,0	52,0	0,35	0,06
3	2,0	68,0	0,51	0,04
4	4,0	48,0	0,32	0,18
5	4,0	60,0	0,43	0,13
6	4,0	72,0	0,54	0,10
7	6,0	52,0	0,35	0,26
8	6,0	68,0	0,51	0,16
9	6,8	60,0	0,43	0,22
Experimentos para a confirmação do modelo				
10	4,0	60,0	0,43	0,12
11	4,0	60,0	0,43	0,13
12	4,0	60,0	0,43	0,13

Com base nos resultados de R obtidos, em uma mesma concentração de tensoativo, por exemplo, de 4,0% (p/p) de TX-114, pode-se notar que a razão diminui com o aumento de EV , isto é, com o aumento da temperatura de partição. Baseado nos R obtidos, podemos observar que os menores valores encontrados foram nas concentrações de 1,2 e 2,0% (p/p) de TX-114, os quais apresentaram uma F_c com um volume bastante reduzido.

Tal efeito se deve ao fato de que, com o aumento da temperatura de partição, o volume da F_d tende a aumentar, e a outra fase, F_c , apresenta uma tendência em concentrar-se cada vez mais, o que está diretamente relacionado ao aumento da concentração de micelas nesta fase. Em outras palavras, esse efeito de concentração da F_c , faz com que exista um menor espaço físico entre as micelas do tensoativo não-iônico, o que diminuiria o espaço de acomodação para biomoléculas de alta massa molecular, sendo essas excluídas para a F_d .

De acordo com os resultados obtidos, os balanços de massa ($BM_{GFP_{UV}}$) foram de aproximadamente 100,0%. Com exceção dos experimentos a 2,0 ($X_1=-1$, $X_2=1$), 4,0 ($X_1=0$, $X_2=\sqrt{2}$) e 6,0% (p/p) de TX-114 ($X_1=1$, $X_2=1$), apresentaram $BM_{GFP_{UV}}$ de 75,0, 33,0 e 74,0%, respectivamente. Os ensaios realizados nas temperaturas de 68,0°C e 72,0°C demonstraram os menores valores para $BM_{GFP_{UV}}$, de 75,0 e 32,0%, respectivamente. Tais resultados se devem possivelmente ao efeito da desnaturação protéica ocasionado pela elevação de temperatura nos ensaios de partição, que foi maior para o ensaio a 72,0°C, apresentando uma perda de aproximadamente 68,0%. Os valores para $BM_{GFP_{UV}}$ não foram reportados.

Por outro lado, esses resultados mostram claramente o poder termorresistente que essa proteína recombinante apresenta quando confrontada em altas temperaturas. Ainda que submetida a 72,0°C por 3 horas, apresentou 32,0% de recuperação. O efeito da termorresistência da GFP_{uv} foi investigado por Ishii et al. (2007), que estudaram a estabilidade térmica da GFP_{uv} em formulações parenterais e constataram seu poder termorresistente. Esses autores concluíram, com base no desempenho da proteína em determinadas condições, que a mesma pode ser empregada como potencial indicador biológico para aplicações em processos de pasteurização, descontaminação de produtos parenterais, em água para injetáveis, entre

outros. Nas demais condições estudadas (ensaios realizados até 60,0°C), a proteína GFPuv apresentou-se estável na presença do tensoativo não-iônico Triton X-114, sem perda significativa em sua recuperação. Estes resultados corroboram os dados obtidos em relação à estabilidade desta proteína na presença do TX-114 (Apêndice D).

Figura 23. Valores de K_{GFPuv} e $\%REC_{GFPuv}$ obtidos nos ensaios realizados de acordo com o planejamento experimental em estrela (●). X_1 corresponde à variável codificada da concentração de TX-114 (em parênteses %p/p) e X_2 à variável codificada de EV (em parênteses correspondente a $T^\circ C$).

Com relação aos valores da variável resposta de coeficiente de partição da GFPuv obtidos, Figura 23, os ensaios apresentaram em todas as condições estudadas $K_{GFPuv} > 1,0$. Os maiores valores de K_{GFPuv} obtidos foram de 13,85 ($X_1=0$, $X_2=0$), 13,79 ($X_1=-\sqrt{2}$, $X_2=0$) e 9,33 ($X_1=\sqrt{2}$, $X_2=0$), valores que coincidem com a mesma temperatura de partição, 60,0°C ($EV=0,43$). Conclui-se que os maiores coeficientes de partição da GFPuv estão nesta faixa de temperatura. Isto confirma que a proteína-alvo apresenta caráter hidrofílico, não sendo atraída hidrofobicamente para a fase rica em micelas não-carregadas (F_c). A proteína GFPuv particiona preferencialmente para a F_d do sistema, região pobre em micelas, onde encontra maior volume aquoso disponível (Figura 24).

Figura 24. Separação de fases de um sistema a 4,0% (p/p) de TX-114/tampão, mantido em banho termorregulado a 60,0°C por 3 horas. Tubo de separação à esquerda visto à olho nu e o mesmo (à direita) visto em câmara com luz UV, na qual nitidamente apresenta maior intensidade fluorescente.

Aliado a esses resultados, a outra variável resposta avaliada foi o valor de $\%REC_{GFP_{UV}}$, que apresentou uma recuperação superior a 100,0%. Estes valores obtidos estão associados ao erro padrão estimado (9,22%) pelos experimentos realizados, e outro fator pode ser devido ao efeito da interação com o tensoativo não-iônico TX-114. O fenômeno observado de aumento na $\%REC_{GFP_{UV}}$ pode estar relacionado à hipótese descrita por Savelli et al. (2000) e também observada por Lopes et al. (2004), de que tensoativos ligariam-se a enzimas, causando mudança conformacional para uma forma mais ativa, podendo o grupo hidrofílico do tensoativo determinar tal função. Nesse sentido, tensoativos iônicos se ligam às proteínas e alteram sua atividade enzimática. Embora tensoativos não-iônicos em geral não modifiquem a estrutura terciária das proteínas, acredita-se que o aumento da recuperação da proteína verificado nesse estudo deve ter ocorrido em função de algum tipo de interação com o tensoativo, levando a uma mudança conformacional da GFP_{uv}. Tal mudança conformacional em sua estrutura pode ter levado a uma estrutura que, quando confrontada com picos de excitação a 394 nm, apresentou maior intensidade luminosa.

Os menores valores para a variável resposta $\%REC_{GFP_{UV}}$ obtidos no planejamento foram 32,0 ($X_1=0$, $X_2=\sqrt{2}$), 72,0 ($X_1=1$, $X_2=1$) e 74,0% ($X_1=-1$, $X_2=1$). Tais resultados foram afetados pela elevação da temperatura devido à

degradação da proteína, já discutidos anteriormente. O efeito observado nestas condições teve resultado direto no $K_{GFP_{UV}}$, reduzindo estes valores.

Consequentemente, com a obtenção das variáveis resposta, $K_{GFP_{UV}}$ e $\%REC_{GFP_{UV}}$, foi possível obter um modelo matemático teórico para a otimização do processo. Nas tabelas 10 e 11 estão apresentados os resultados da análise do modelo da regressão multivariável para a concentração de TX-114 em função do efeito de EV , bem como os resultados da análise de variância dessa regressão, respectivamente. O efeito da variável resposta $K_{GFP_{UV}}$ é dependente da concentração de TX-114 e do efeito da temperatura (EV), e pode ser interpretado com base na equação 11.

TABELA 10. Análise do modelo da regressão multivariável para a variável concentração de TX-114 em função do efeito de volume de exclusão (EV).

Parâmetro	Coefficiente de Regressão	Erro Padrão	Valor - t	Valor - p
Constante	14,003513	0,597608	23,4326	0,0000
X_1^2	-1,818077	0,538795	-3,3743	0,0062
X_2^2	-5,409162	0,538795	-10,0394	0,0000

R^2 ajustado=0,89. X_1 =corresponde a variável codificada da concentração de TX-114 (%p/p) e X_2 =corresponde a variável codificada de EV .

A equação obtida na análise de regressão multivariável para o coeficiente de partição da GFP_{UV} ($K_{GFP_{UV}}$) foi:

$$K_{GFP_{UV}} = 14,00 - 1,8181X_1^2 - 5,409X_2^2 \quad (11)$$

TABELA 11. Análise da variância do modelo de regressão multivariável para a variável de coeficiente de partição da GFP_{UV} ($K_{GFP_{UV}}$).

Fonte	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F - Quadrado	Valor - p
Modelo	230,583	2	115,291	53,8038	0,0000
Erro	23,5709	11	2,14281		
Total	254,154	13			

Nas tabelas 12 e 13 estão apresentados os resultados da análise do modelo da regressão multivariável para o efeito de EV , bem como os resultados da análise de variância dessa regressão, respectivamente. O efeito da variável $\%REC_{GFP_{UV}}$ não foi dependente da concentração de Triton X-114, apenas do efeito da temperatura, e pode ser analisado na equação 12. Os

modelos obtidos são resultantes da regressão multivariável aplicada aos resultados da variável K_{GFPuv} e $\%REC_{GFPuv}$, respectivamente.

TABELA 12. Análise do modelo da regressão multivariável para a variável efeito de volume de exclusão (EV).

Parâmetro	Coefficiente de Regressão	Erro Padrão	Valor - t	Valor - p
Constante	111,19364	3,132121	35,5011	0,0000
X_2	-22,078834	3,26016	-6,7723	0,0000
X_2^2	-20,216923	3,383758	-5,9747	0,0001

R^2 ajustado=0,86. X_2 =corresponde à variável codificada de EV .

A equação obtida na análise de regressão multivariável para a porcentagem de recuperação de GFPuv ($\%REC_{GFPuv}$) foi:

$$\%REC_{GFPuv} = 111,2 - 22,08X_2 - 20,22X_2^2 \quad (12)$$

TABELA 13. Análise da variância do modelo de regressão multivariável para a variável de porcentagem de recuperação de GFPuv ($\%REC_{GFPuv}$).

Fonte	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F - Quadrado	Valor p
Modelo	6934,04	2	3467,02	40,7806	0,0000
Erro	935,179	11	85,0163		
Total	7869,21	13			

A Figura 25 representa o modelo matemático (equação 11), em que se confirma a influência da concentração de TX-114 e do efeito de EV para a variável K_{GFPuv} . De fato, os maiores valores de K_{GFPuv} foram obtidos quando os ensaios de partição foram realizados na região do ponto central do planejamento, isto é, a 4,0% de TX-114 a 60,0°C ($EV = 0,43$).

Figura 25. Superfície de resposta para o coeficiente de partição da GFPuv (K_{GFPuv}) em função dos valores codificados. X_1 corresponde à variável codificada da concentração de TX-114 (%p/p), e X_2 à variável codificada de EV.

Com a interpretação dos modelos matemáticos obtidos, para os estudos da partição da GFPuv, as posteriores extrações foram realizadas nas melhores condições obtidas com o modelo, tais como o estudo da GFPuv proveniente do homogeneizado celular de *E. coli* na presença de LPS contaminante, e de sais adicionados em SMDFA.

3.3.3. Estudo da Partição do Homogeneizado Celular de *E. coli* em SMDFA

Nesta etapa do estudo foi realizada a partição do homogeneizado celular de *E. coli* contendo a proteína-alvo GFPuv e seu principal contaminante (LPS) em SMDFA composto pelo sistema TX-114/tampão. A fim de verificar a partição dos contaminantes com caráter hidrofóbico para a fase concentrada, rica em micelas não-carregadas e recuperar a proteína-alvo na F_d . Neste sistema, as proteínas hidrofílicas, como a GFPuv, particionam preferencialmente para a fase diluída, pobre em micelas. De acordo com a literatura, proteínas hidrofílicas migram para F_d do sistema por efeito de volume de exclusão e podem ser separadas de outras biomoléculas na F_c do sistema (NIKAS et al., 1992; LUE; BLANKSCHTEIN, 1996). Desta forma, as condições para os ensaios contendo o homogeneizado celular, tais como concentração de tensoativo não-iônico TX-114 e de temperatura, foram baseadas nas melhores condições obtidas com o planejamento experimental (Item 3.3.2.).

A Tabela 14 apresenta os resultados obtidos com o estudo da GFPuv pura e com o homogeneizado celular de *E. coli*. A recuperação da proteína-alvo ($\%REC_{GFPuv}$) para a fase diluída fechou em aproximadamente 100,0%, demonstrando que praticamente toda a proteína é recuperada na F_d . Com relação ao valor de K_{GFPuv} , o mesmo comportamento foi obtido para a GFPuv proveniente do homogeneizado celular, ou seja, partição preferencial para a F_d do sistema, a qual apresenta maior volume disponível para a proteína. Na condição do ponto central, 4,0% (p/p) de TX-114/tampão a 60,0°C, o coeficiente de partição para a GFPuv pura ($K_{GFPuv}=13,85$) foi menor do que para a do homogeneizado celular ($K_{GFPuv}=15,00$). Essa tendência também foi observada para as outras condições avaliadas. É provável que essa diferença entre os valores de K_{GFPuv} obtidos possa estar relacionada à influência da presença de diversas outras proteínas e outros componentes celulares provenientes do homogeneizado celular presentes na F_c . Tal efeito se associaria ao efeito de volume de exclusão (EV), aumentando este, e ocasionando maior expulsão da proteína GFPuv para a F_d do sistema.

TABELA 14. Resultados experimentais da partição do homogeneizado celular de *E. coli* em sistema TX-114/Tampão. R corresponde à razão volumétrica entre as fases do sistema, K_{GFPuv} ao coeficiente de partição da GFPuv, $\%REC_{GFPuv}$ à recuperação da GFPuv, $\%REM_{LPS}$ à remoção de LPS e f_p ao fator de purificação da GFPuv.

Parâmetros	GFPuv pura			Homogeneizado celular		
[TX-114] (%p/p)/T°C	4,0%/ 60,0 °C	1,2%/ 60,0 °C	4,0%/ 48,0 °C	4,0%/ 60,0 °C	1,2%/ 60,0 °C	4,0%/ 48,0 °C
$R(V_d/V_d)$	0,13	0,04	0,18	0,11	0,05	0,16
K_{GFPuv}	13,85	13,79	5,35	15,00	14,22	6,10
	±0,03	±0,04	±0,03	±0,03	±0,05	±0,04
% REC_{GFPuv}	115,0	121,0	118,0	117,0	96,0	118,0
% REM_{LPS}	-	-	-	99,9	99,9	99,9
f_p	-	-	-	10	-	-

*Os ensaios 4,0%/60,0°C, 1,2%/60,0°C e 4,0%/48,0°C referem-se aos pontos do planejamento experimental, $X_1=0$, $X_2=0$; $X_1=-\sqrt{2}$, $X_2=0$ e $X_1=0$, $X_2=-\sqrt{2}$, respectivamente.

O parâmetro investigado para o fator de purificação (f_p) foi estudado com o homogeneizado celular de *E. coli* na condição do ponto central, 4,0% (p/p) de TX-114/tampão a 60,0°C. Obteve-se um f_p da proteína-alvo de 10 vezes, o que

demonstra que foi recuperada 10 vezes mais GFPuv na F_d do que proteínas totais. A maior parte das proteínas contaminantes do processo particionam para a F_c em micelas, provavelmente devido ao caráter hidrofóbico destas.

A concentração inicial de LPS presente nas amostras contendo o homogeneizado celular foi bastante alta, da ordem de $9,36 \times 10^7$ UE/mL. Os resultados obtidos podem ser considerados iguais nas três diferentes condições avaliadas ($\%REM_{LPS}=99,9\%$). Os altos valores de $\%REM_{LPS}$ podem ser explicados baseando-se na partição das moléculas de LPS para F_c , a qual se dá por suas características hidrofóbicas. Como já mencionado em capítulos anteriores, as moléculas de LPS podem ser estruturadas em agregados micelares por interações não polares entre cadeias lipídicas (lípideo A) e pela porção hidrofóbica (cauda apolar) dos tensoativos; consequentemente estes agregados concentrariam-se na F_c (ANSPACH, 2001).

Mercaldi et al. (2008), da mesma maneira, obtiveram altas remoções de LPS para a F_c . Esses autores utilizaram, com sucesso, o SMDFA contendo Triton X-114 para remoção de LPS e outras proteínas de caráter hidrofóbico. Os resultados mostraram uma redução de mais de 90,0% de remoção de LPS, com uma concentração final de LPS no produto final de 44,0 UE/mL. Similarmente, Rozkov et al. (2008) relataram o uso do Triton X-114 para a remoção de LPS de preparações contendo plasmídeos expressos em culturas de células. Esses autores alcançaram uma remoção de 95,0% de LPS com dois ciclos e 99,0% com três ciclos de extração. Os pesquisadores trabalharam apenas com a F_d , a qual continha a biomolécula de interesse, obtendo uma concentração final de LPS presente no bioproduto de 64,0 UE/mL.

Com o estudo da partição do homogeneizado celular de *E. coli* nas condições empregadas, altas concentrações de LPS foram removidas para F_c , gerando concentrações finais de LPS de aproximadamente 37.440 UE/mL, bastante baixas em relação à concentração inicial ($9,36 \times 10^7$ UE/mL). Contudo, da mesma maneira como foi discutido no Item 3.3.1., é importante frisar que, baseado nos limites de tolerância para produtos farmacêuticos e biológicos, tais concentrações obtidas encontram-se fora dos limites aceitáveis pelas agências regulatórias (ANVISA, 2004; DANESHIAM et al., 2006; USP, 2002). Recomenda-se a implementação de uma nova etapa de purificação ao

processo de purificação, subsequente ao processo por SMDFA, visando a redução da carga de LPS contaminante.

3.3.4. Estudo da Presença de Sais em SMDFA

Efeito da presença de sais na curva binodal do sistema Triton X-114/Tampão

Neste item foi estudado o comportamento da adição de sais no deslocamento da curva binodal do sistema Triton X-114/tampão. Para avaliar a influência da presença de sais na curva binodal do sistema, estudou-se a adição de soluções salinas nas seguintes concentrações: MgSO_4 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 0,2 mol/L, CaCl_2 e KI a 0,2 e 0,5 mol/L.

Os sais adicionados no SMDFA acarretaram diferentes deslocamentos na curva binodal do sistema Triton X-114/tampão, como pode ser observado na Figura 26. Estes deslocamentos variaram de acordo com o tipo de sal utilizado e com sua concentração molar adicionada em sistema. Observou-se que a adição de maiores concentrações molares de sais (0,5 mol/L) resultou em um deslocamento mais acentuado da curva, do que as menores concentrações testadas (0,2 mol/L). Tal efeito também foi observado por Koshy et al. (1996), que estudaram a presença dos sais KCl, NaCl, LiCl, NaI e NaBr na curva binodal composta pelos tensoativos não-iônicos Triton X-114 e X-100.

Figura 26. Curvas binodais obtidas experimentalmente para o sistema TX-114/tampão com adição de diferentes sais. Cada ponto na curva corresponde aos valores de $T_{\text{NÉVOA}}$. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95,0% nos valores obtidos. M corresponde à mol/L.

De acordo com os resultados obtidos, a adição de CaCl_2 provocou abaixamento dos valores de $T_{\text{NÉVOA}}$, efeito também observado com MgSO_4 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. As concentrações de 0,2 mol/L de CaCl_2 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ não apresentaram uma diferença estatística significativa entre as curvas obtidas, essa pequena variação entre as curvas pode estar relacionada ao erro associado ao método, que consiste em observação visual dos $T_{\text{NÉVOA}}$. O efeito de abaixamento do $T_{\text{NÉVOA}}$, conforme descreveu Koshy et al. (1996), é devido à desidratação do grupo óxido de etileno presente na estrutura do tensoativo TX-114, o qual representa a porção da cabeça polar (região hidrofílica) da molécula. Provavelmente este efeito ocorra devido à competição de moléculas de água entre esse grupo e os íons dissociados presentes no sistema. Por outro lado, no caso da solução de KI em SMDFA, notou-se um aumento nos valores de $T_{\text{NÉVOA}}$. Efeito similar foi observado por Koshy et al. (1996), Schott e Hans (1976), os quais estudaram NaI e ânions caotrópicos como SCN^- , I^- e ClO_4^- , em sistemas Triton X-114 e X-100.

Os efeitos ocasionados no perfil da curva binodal do sistema TX-114/tampão demonstraram que os sais utilizados apresentam efeitos diferentes de interação com o tensoativo não-iônico TX-114 e com as moléculas de água no sistema. Em todos os casos, o que contribuiu para a diminuição ou elevação dos valores dos $T_{\text{NÉVOA}}$ foram os efeitos caotrópicos e cosmotrópicos promovidos pela presença dos sais. Esse tipo de interação com as moléculas de TX-114 ocorre mais precisamente no momento de formação de micelas ($T_{\text{NÉVOA}}$), o que modifica as relações inter e intramicelares na região da cabeça polar do TX-114 que interage com a molécula de água por pontes de hidrogênio.

Efeito da presença de sais na partição da GFPuv e LPS puros em SMDFA

A presença de íons dissociados entre as fases dos sistemas micelares pode influenciar a partição de materiais biológicos, para isto investigou-se a influência dos sais MgSO_4 , CaCl_2 , KI e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 0,2 mol/L, em um sistema a 4,0% (p/p) de TX-114/tampão a 60,0°C, na partição da GFPuv e LPS puros. Ressalta-se que para minimizar os efeitos do $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ provenientes das etapas de purificação da GFPuv (Item 3.2.3.), uma alíquota de GFPuv pura foi

dialisada em membranas de 12.000-16.000 Da de *cut-off* para a retirada de resquícios deste sal.

TABELA 15. Resultados experimentais da partição da GFP_{uv} e LPS puros em sistema TX-114/Tampão, na presença de diferentes sais. *R* corresponde à razão volumétrica entre as fases, $K_{GFP_{uv}}$ ao coeficiente de partição da proteína, %*REM*_{LPS} à remoção de LPS e $BM_{GFP_{uv}}$ ao balanço de massa da proteína.

Ensaio	[SAL] 0,2 mol/L	<i>R</i> (V_c/V_d)	$K_{GFP_{uv}}$	% <i>REM</i> _{LPS}	% <i>BM</i> _{GFP_{uv}}
1	KI	0,26	4,3±0,05	99,0	110,0
2	MgSO ₄	0,13	7,3±0,03	99,0	107,0
3	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,20	5,0±0,04	99,0	100,0
4	CaCl ₂	0,20	4,0±0,06	98,8	105,0
5	Amostra sem sal	0,13	13,0±0,05	99,4	115,0

De acordo com os resultados obtidos nos experimentos, os valores de $BM_{GFP_{uv}}$ foram de aproximadamente 100,0%, como mostra a Tabela 15.

Com a adição dos sais em SMDFA, os valores de $K_{GFP_{uv}}$ foram superiores a 1,0, o que demonstrou que a proteína é recuperada preferencialmente na F_d. Os maiores valores de $K_{GFP_{uv}}$ obtidos na presença de sais foram com MgSO₄ e (NH₄)₂SO₄ ($K_{GFP_{uv}}$ =7,3 e 5,0, respectivamente). No caso dos sais KI e CaCl₂, estes apresentaram os menores valores para $K_{GFP_{uv}}$ (4,3 e 4,0, respectivamente). O ensaio 5, na ausência de adição de sal, apresentou $K_{GFP_{uv}}$ =13,0, o maior valor obtido para todos os experimentos.

Apesar dos sais se distribuírem quase que igualmente entre as fases, diferenças de potencial elétrico entre as F_c e F_d podem direcionar a partição da biomolécula. Ou ainda, quando a concentração de sal atinge valores elevados, resulta em aprisionamento das moléculas de água para solvatação dos íons. Assim, as moléculas de água ordenadas em torno das regiões hidrofóbicas da proteína se tornam escassas e essas regiões ficam expostas, podendo interagir e se agregar entre si. Tal efeito, conhecido como *salting-out*, ocorre com sais di ou trivalentes ((NH₄)₂SO₄, Na₂SO₄, por exemplo) que competem com a proteína por moléculas de água para a solvatação. Consequentemente, as interações proteína-proteína tornam-se mais fortes que as interações proteína-solvente: a proteína sofre agregação e particiona para uma das fases; porém, tal efeito não foi observado nas condições avaliadas. Os íons dissociados entre as fases do sistema micelar não foram capazes de influenciar no aumento da

partição da proteína para a F_d (HEY et al., 2005; INOUE et al., 2004; KABIR et al., 2003; MARZZOCO; TORRES, 1999; PESSOA-JR; KILIKIAN, 2005).

Uma possível explicação para tal efeito pode estar relacionada com o que foi observado por alguns autores em sistemas poliméricos de duas fases. A adição de sais neutros (aqueles provenientes da neutralização total de um ácido ou de uma base, que na sua fórmula não aparece H^+ e nem OH^-), diminui o coeficiente de partição das proteínas carregadas negativamente e aumenta o coeficiente de partição das proteínas carregadas positivamente. No caso do presente trabalho, a GFPuv apresenta um pI entre 4,6-5,1, em pH 7,2 (tampão Mcllvaine). Essa proteína deverá apresentar uma carga global negativa; é possível que, com adição de $MgSO_4$, $CaCl_2$ e KI , estes influenciaram na diminuição dos valores de K_{GFPuv} . Desta forma, mais GFPuv foi particionada para a F_c do que quando comparada com o ensaio na ausência de sais (ensaio 5). A magnitude desse efeito observado pode ser correlacionada com a seguinte ordem: $SO_4^{2-} < F^- < Cl^- < I^-$ e $NH_4^+ < Na^+ < K^+$ (CASCONI et al., 1991; HUDDLESTON et al., 1991; SCHMIDT et al., 1996).

Para a variável $\%REM_{LPS}$, os ensaios 1-5 apresentaram valores aproximados de remoção de LPS (aproximadamente 99,0%). Os LPS em pH 7,2 devem apresentar carga global negativa, no entanto, a presença de íons, dissociados entre as fases do sistema micelar, não foi capaz de influenciar no aumento ou redução dos valores de $\%REM_{LPS}$.

Os resultados com a adição de sais em SMDFA foram bastante interessantes, pois demonstraram influenciar na redução do parâmetro K_{GFPuv} . Tal efeito pode estar associado com a carga negativa que a proteína-alvo apresenta nas condições empregadas. Os valores de remoção de LPS para a F_c não apresentaram diferenças entre os valores que vêm sendo obtidos ao longo deste trabalho, o que pode ser corroborado pelo ensaio 5, com $\%REM_{LPS}=99,4\%$.

Tendo em vista a redução dos níveis de LPS para limites aceitáveis preconizadas pelas entidades regulatórias, o processo por SMDFA pode ser aperfeiçoado empregando um processo de purificação em duas etapas. Uma das alternativas seria, por exemplo, uma primeira etapa de purificação constituída por SMDFA (constituído por TX-114), e uma segunda por cromatografia de afinidade por íons metálicos (IMAC). A primeira etapa com o

SMDFA consistiria em um processo de baixa resolução para favorecer a partição de moléculas mais hidrofóbicas, isto é, para a remoção de altas concentrações de LPS da ordem de 10^5 , 10^6 UE/mL para F_c . Subsequentemente, a etapa por IMAC seria introduzida para a remoção específica de moléculas de LPS por uma matriz carregada com íons metálicos com afinidade aos LPS, removendo estes contaminantes até concentrações menores que 5,0 EU/Kg.

O processo por IMAC é largamente utilizado em processos de purificação de proteínas; no entanto, ainda é pouco explorado para a remoção de LPS. Tal processo pode garantir alta resolução na remoção de resquícios de LPS das etapas provenientes do SMDFA. Não obstante, baseado na literatura e nas características físico-químicas das moléculas de LPS, realizou-se no Capítulo IV um estudo da adsorção de LPS em matriz IDA- Ca^{+2} através da utilização do processo por IMAC.

3.4. Conclusões

Os resultados obtidos com a partição da GFPuv pura em SMDFA apresentaram valores de $K_{GFPuv} > 1,0$, sendo a proteína-alvo particionada preferencialmente para fase diluída (pobre em micelas). Tal efeito aumentou com a elevação da temperatura (aumento do efeito de volume de exclusão), ocasionando uma maior expulsão de GFPuv para a F_d .

O estudo do planejamento experimental com a GFPuv pura apresentou os melhores resultados na região do ponto central (4,0% (p/p) de Triton X-114/tampão a 60,0°C), com $K_{GFPuv} = 13,85$ e $\%REC_{GFPuv} = 115,0\%$. O efeito da variável resposta K_{GFPuv} é dependente da concentração de Triton X-114 e do efeito da temperatura, e o efeito da variável $\%REC_{GFPuv}$ não foi dependente da concentração de Triton X-114, apenas do efeito da temperatura.

A partição do homogeneizado celular de *E. coli* em SMDFA apresentou valores de K_{GFPuv} superiores aos resultados com a partição da GFPuv pura nas mesmas condições. Tal efeito pode estar relacionado à presença de outros contaminantes no sistema. E ainda, a GFPuv apresentou um fator de purificação de 10 vezes em relação aos contaminantes, na fase diluída.

A adição dos sais $MgSO_4$, $CaCl_2$, KI e $(NH_4)_2SO_4$ causaram deslocamento da curva binodal do sistema Triton X-114/tampão. Tal efeito provocou maior ou menor elevação, ou diminuição, dos $T_{NÉVOA}$ segundo a concentração e o tipo de sal utilizado, respectivamente. Já com a adição de GFPuv e LPS puros em SMDFA na presença dos sais, estes ocasionaram queda nos valores obtidos para a variável K_{GFPuv} , o que pode estar associado à carga negativa que a proteína-alvo adquire nas condições estudadas. Contudo, baseado nas características físico-químicas da GFPuv e nas condições avaliadas, o processo ideal sugerido seria a não-adição de sais em SMDFA.

Em suma, o SMDFA foi bastante eficiente em remover LPS contaminante para a F_c ($\%REM_{LPS} > 99,0\%$) e seletivo em purificar a proteína-alvo GFPuv na fase diluída, tanto para as amostras com GFPuv pura, quanto às provenientes do homogeneizado celular de *E. coli*.

CAPÍTULO IV

ESTUDO DA ADSORÇÃO DE ENDOTOXINAS EM IDA- Ca^{+2} EMPREGANDO CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE POR ÍONS METÁLICOS

ESTUDIO DE LA ADSORCIÓN DE ENDOTOXINAS EN IDA- Ca^{+2} EMPLEANDO CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD POR IONES METÁLICOS

André M. Lopes¹, Jorge S. Romeu², Rolando Páez²,
Gabriel M. Perera², Adalberto Pessoa-Jr¹ e Lourdes Z. Cárdenas³

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

²Purification Development Departament – CIGB/Havana/Cuba

³Polytechnic University José Antonio Echeverría – CUJAE/Havana/Cuba

Doutorado Sanduíche realizado em cooperação com o
Instituto Superior Politécnico José Antonio Echeverría – ISPJAE
e o *Centro de Ingeniería Genética y Biotecnológica – CIGB*
- Havana/Cuba - 2009

4.1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da tecnologia de DNA recombinante tem, nos últimos anos, possibilitado a produção em larga escala de várias proteínas e peptídeos destinados a aplicações terapêuticas. A recuperação e purificação do produto é uma etapa fundamental, na qual é desejável a obtenção de alta pureza associada a um baixo custo. Através da tecnologia do DNA recombinante, proteínas podem ser obtidas intra ou extracelularmente em uma célula hospedeira, sendo comumente utilizada a bactéria *Escherichia coli* por ser considerada um microrganismo modelo com características genéticas bem conhecidas. Estas proteínas são denominadas heterólogas, por serem obtidas por células que não as produzem naturalmente (BAILEY; MEAGHER, 2000; DYR; SUTTNAR, 1997).

Durante a produção destas proteínas recombinantes, somente a etapa de recuperação e purificação representa, aproximadamente, de 60,0 a 70,0% dos custos operacionais. E, no caso da *E. coli*, a recuperação e purificação do bioproduto recombinante exige, a remoção de fragmentos celulares de alguns precursores de proteínas, e de impurezas e contaminantes derivados da cultura celular, principalmente dos lipopolissacarídeos (AQUINO, 2004). Estes processos de purificação normalmente baseiam-se em técnicas como a extração líquido-líquido e cromatográficas, estas últimas consistindo de uma matriz cromatográfica para a obtenção do bioproduto desejado com alto grau de pureza.

De uma maneira mais específica, o processo por cromatografia de afinidade por íons metálicos (IMAC) é um método especial de afinidade baseado na interação entre biomoléculas e íons metálicos. Este método foi introduzido em 1975 por Porath e, desde então, se converteu em uma das técnicas mais aplicadas para a purificação de diferentes biomoléculas (por exemplo: peptídeos, proteínas e ácidos nucleicos), para a separação de células a partir de extratos biológicos e para estudos de estrutura-função de proteínas (BRESOLIN et al., 2009).

O processo por IMAC explora a interação entre espécies doadoras de elétrons presentes na superfície de biomoléculas em solução e íons metálicos quelados imobilizados em uma matriz sólida. Essa afinidade resulta de ligações de coordenação reversíveis formadas entre o íon metálico quelado (centro de

adsorção) e certos grupamentos de aminoácidos, tais como imidazol da histidina, o tiol da cisteína e o indol do triptofano, os quais doam elétrons para o íon metálico, ou seja, atuam como bases de Lewis (CHAGA, 2001; PORATH, 1988; SULKOWSKI, 1989).

O agente quelante é acoplado a uma matriz sólida por meio de ligações covalentes. O íon metálico, por sua vez, é imobilizado ao agente quelante por ligações de coordenação formadas entre o íon metálico e átomos de nitrogênio, oxigênio ou enxofre, presentes na estrutura do agente quelante (PORATH et al., 1975; SULKOWSKI, 1989; WINZERLING et al., 1992). Uma matriz cromatográfica bastante empregada é a *Chelating Sepharose Fast Flow* - CSFF (MAGBOUL; MCSWEENEY, 1999a; 1999b; WILLOUGHBY, 1999). Esta matriz contém grupos do ácido iminodiacético (IDA) acoplados a resina de agarose (6,0% de ligações cruzadas) por ligações éteres estáveis via um braço espaçador de 7 carbonos. Esse adsorvente é estável e pode ser usado em pH na faixa de 2-14, e a capacidade de íons metálicos está entre 22-30 $\mu\text{moles M}^{+2}/\text{mL}$ de gel seco (PHARMACIA, 2002).

O fator fundamental na técnica de IMAC é a escolha do íon metálico a ser imobilizado. De um modo geral, qualquer metal capaz de interagir com as proteínas pode ser utilizado em IMAC; porém, Fe^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} e Ca^{2+} são os íons metálicos mais comumente empregados. Os íons metálicos Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} e Zn^{2+} são utilizados na purificação de proteínas que possuam resíduos acessíveis de histidina, triptofano e cisteína, onde os metais interagem com os grupamentos imidazol, indol e tiol, respectivamente, de cada aminoácido. Os íons Fe^{3+} e Al^{3+} ligam-se a fosfato e fosfoésteres primários, podendo ser utilizados para separar fosfoproteínas (ANDERSSON; PORATH, 1986; SULKOWSKI, 1988). O íon Ca^{2+} coordena o átomo de oxigênio presente em grupos carboxílicos dos resíduos dos aminoácidos ácido aspártico e ácido glutâmico, podendo ser utilizado para a purificação de proteínas ricas em grupamentos carboxílicos (MANTOVAARA et al., 1991).

Proteínas ou outros solutos presentes na fase móvel são adsorvidos principalmente pela formação de ligações de coordenação com sítios remanescentes dos íons metálicos quelados (Figura 27), havendo também a possibilidade do envolvimento de outras forças, tais como forças eletrostáticas, interações hidrofóbicas e forças de van der Waals, sendo que nem sempre é

possível determinar suas contribuições relativas (UEDA et al., 2003).

Figura 27. Estrutura proposta de um agente quelante complexado (ácido imidoacético – IDA) com íons metálicos. Adaptado de Porekar e Menart (2001) e Porath e Olin (1983).

As moléculas adsorvidas podem ser eluídas por competição com outras espécies doadoras de elétrons, por exemplo, com imidazol ou com um agente quelante solúvel; ou por protonação de grupos doadores de elétrons presentes na proteína adsorvida, por redução de pH (PORATH et al., 1975; SULKOWSKI, 1989; WINZERLING et al., 1992). De uma forma geral, íons metálicos imobilizados em uma matriz podem ser removidos pela adição de agentes competidores fortes, como o EDTA, sem que haja perda da capacidade da matriz, ou seja, ela pode ser carregada novamente com o mesmo íon metálico ou outro (POREKAR et al., 2001).

No caso de estudos para a remoção de LPS através de processos cromatográficos tradicionais, nota-se que estes não podem romper o complexo LPS-proteína; entretanto, a afinidade entre um íon metálico e a molécula de LPS é mais alta, podendo favorecer a dissociação deste complexo. Ainda, a eficiência da remoção de LPS em processos cromatográficos de afinidade pode ser influenciada pela força iônica do meio (HIRAYAMA; SAKATA, 2002).

Apesar deste processo ter sido largamente empregado em processos de purificação de proteínas, existem poucos trabalhos relatando sua aplicação para a remoção de LPS. Bischoff e colaboradores (1991) foram os primeiros autores que apresentaram fatores de remoção de LPS de 5 vezes, utilizando IDA-Zn no processo de purificação para a proteína α 1-antitripsina. Com este mesmo princípio, Zimmerman et al. (2006) demonstraram que, para o caso de um fragmento isolado de anticorpo, reduziu-se a presença de LPS com o emprego de uma etapa de lavagem com tensoativos no processo

cromatográfico. Estes autores verificaram que o tensoativo pôde romper o complexo LPS-anticorpo.

Em 2002, Luo e Kang apresentaram o primeiro estudo do emprego da cromatografia como um método de captura de LPS, empregando o ferro como íon acoplado ao grupo quelante. Esses autores obtiveram concentrações finais de LPS da ordem de 0,5 UE/mL, demonstrando que este método apresenta diferentes vantagens em relação a outros métodos de remoção de LPS, especialmente aqueles que utilizam métodos cromatográficos de afinidade (HIRAYAMA; SAKATA, 2002).

A remoção de LPS por cromatografia de afinidade e separação de fases por Triton X-114 para a descontaminação de proteínas recombinantes, como mioglobina e isoenzimas, foi descrita por Liu et al. (1997). Estes pesquisadores concluíram que a extração por SMDFA foi o método mais efetivo, reduzindo o conteúdo de LPS a 98,0% com concentrações finais de 25 UE/mg.

Assim, como já destacado no Capítulo III e abordado na Introdução, a associação da aplicação do SMDFA como primeira etapa para a remoção de LPS, com o processo de IMAC como segunda etapa de purificação, poderá garantir remoção de resquícios de LPS para níveis aceitáveis.

4.1.1. Teoria da Adsorção – Isotermas

A adsorção é a transferência de um soluto gasoso ou líquido (adsorbato) em uma superfície sólida (adsorvente), na qual este é retido como resultado de atrações intermoleculares com as moléculas sólidas, caracterizando um fenômeno superficial.

Segundo Burkert (1998), quando o adsorbente está em contato com o adsorbato, este começará a concentrar-se na interfase, o que diminui sua concentração no interior da solução até alcançar o equilíbrio. O equilíbrio é alcançado quando iguala-se as velocidades de adsorção e dessorção. O número de mols de adsorbato adsorbido por unidade de massa de adsorbente (q^*) alcançará a condição de equilíbrio à temperatura constante, segundo a equação 13:

$$q^* = V / m \times (c_0 - c^*) \quad (13)$$

em que V corresponde ao volume inicial da solução, m à massa de adsorbente, c_0 à concentração inicial de soluto e c^* à concentração de equilíbrio do soluto. Assim, a expressão que relaciona $q^*=f(c^*)$ à temperatura constante é denominada de isoterma de adsorção.

Isotermas de adsorção típicas são mostradas na Figura 28, de acordo com Belter et al. (1988). A abscissa dá a concentração do soluto na solução (c^*), usualmente em unidade de massa de soluto por volume de solução. A ordenada dá a capacidade de adsorção na superfície do adsorbente (q^*), expressa como massa de adsorbato por volume de fase sólida do adsorbente (matriz). Uma isoterma côncava em relação à abscissa é favorável, e forte adsorção ocorre mesmo em soluções diluídas. Uma isoterma côncava em relação à ordenada é descrita como não-favorável.

Figura 28. Isotherma de adsorção. c^* é a concentração de adsorbato na solução e q^* é a capacidade de adsorção do adsorbente. Fonte: Belter et al. (1988).

Gosling et al. (1989) descrevem que os modelos mais utilizados para descrever fenômenos de adsorção são as de Freundlich e Langmuir. A isoterma de Freundlich descreve a adsorção de uma grande variedade de antibióticos, esteróides e hormônios. Devido à sua simplicidade, é uma das equações mais utilizadas para correlacionar processos de adsorção (MANERA et al., 2008).

O modelo de Freundlich considera adsorção monocamada do adsorbato sobre os sítios de adsorção, mas considera uma distribuição heterogênea dos sítios de adsorção, conforme equação 14:

$$q^* = K \times c^n \quad (14)$$

em que q^* é a capacidade de adsorção na fase sólida, K a constante de equilíbrio de Freundlich, c^* a concentração de adsorbato na fase líquida e n é o expoente. O valor de n tomará forma linear ($n=1$), convexa ($n>1$) ou côncava ($n<1$).

Esse modelo descreve-se por meio de uma equação fundamentalmente empírica. O parâmetro K representa a constante de equilíbrio, similar ao parâmetro de capacidade de adsorção do modelo de Langmuir. Interpretar o parâmetro n tem sido mais complexo, e considera-se que este corresponda à afinidade de interação adsorbato-adsorvente. Consequentemente, um elevado valor de n indicará uma forte interação (KANG, 2000).

Gosling et al. (1989) mencionam que o modelo de Langmuir foi inicialmente proposto para descrever a adsorção de gases sobre superfícies, mas pode ser aproximado para muitos sistemas, sendo bastante usado para descrever adsorção por afinidade e troca-iônica de íons monovalentes. Esta isoterma considera um número finito de sítios ativos na superfície do sólido, onde em cada sítio se acopla uma só molécula. E ainda, não considera interação lateral entre moléculas vizinhas adsorvidas, o que resulta em uma monocamada de material adsorvido.

Segundo Moore (1976) e Atkins e De Paula (1992), o modelo de Langmuir considera que a habilidade das partículas em ligar-se aos sítios da superfície independe dos sítios próximos estarem ou não ocupados. A adsorção de proteínas em um ligante ocorre principalmente dentro da estrutura dos poros da partícula adsorvente. Esta interação pode ser descrita pela isoterma de Langmuir (LAN et al., 2001), conforme equação 15:

$$q^* = \frac{q_{\max} \times c^*}{K_d + c^*} \quad (15)$$

em que q^* e c^* são as concentrações de soluto em equilíbrio na fase sólida e fase líquida, respectivamente, $q_{\max}$ é a capacidade máxima de soluto que pode ser adsorvido na fase sólida e K_d é a constante de dessorção de Langmuir (entre adsorbato-adsorvente).

A capacidade de equilíbrio do adsorbente não é influenciada pela configuração experimental que se emprega para sua determinação: tanto em

coluna empacotada quanto em um processo em tanque agitado, ela será determinada pela natureza da interação ligante-soluto (KASTNER, 1999). Este modelo de isoterma pressupõe adsorção monocamada, homogeneidade dos sítios de ligação e não-interação de moléculas adsorbidas em sítios vizinhos.

4.1.1.1. Cinética de Adsorção

Os modelos cinéticos geralmente podem ser classificados como empíricos, fenomenológicos ou uma combinação dos dois. Para o modelo empírico pode ajustar-se os dados experimentais a uma forma funcional simples que não necessita haver uma base teórica. Os modelos fenomenológicos, por outro lado, baseiam-se em conceitos físico-químicos detalhados para descrever o processo. E ainda, estes podem levar a modelos complexos tornando a aplicação destes difíceis na prática (SÁNCHEZ; BRIONES, 2006). Os modelos avaliados neste trabalho foram aqueles denominados empíricos. A equação 16 foi utilizada para representar a cinética de adsorção de Daniel (BITTON; MARSCHALL, 1980), conforme:

$$\log \frac{C}{C_0} = kt + k' \sqrt{t} \quad (16)$$

em que C_0 corresponde à concentração de soluto na solução inicial e t o tempo.

Na primeira parte da equação, kt parece ser uma relação linear como a Lei de Fick de difusão. Esta lei estabelece que o fluxo difusional é proporcional ao gradiente de concentração (TREYBAL, 1980). As substâncias movem-se da zona de altas concentrações para a zona de baixas concentrações. O soluto na fase líquida difunde-se através da película ao redor do gel poroso (matriz) devido à diferença de concentrações.

A segunda parte da equação mostra uma situação em que o soluto difunde-se dentro do meio poroso homogêneo, em um leito não há agitação e este move-se por difusão. A distância total percorrida pelo soluto aumenta com a raiz quadrada do tempo (ATKINS; DE PAULA, 1992).

Figura 29. Etapas de transferência de massa do soluto entre a fase móvel (fase líquida - adsorbato) e a fase estacionária (fase sólida - adsorvente).

A transferência de massa entre a fase móvel (adsorbato) e a fase estacionária (adsorvente) usualmente é analisada assumindo que o processo ocorra em 3 etapas (Figura 29). Resumidamente as etapas são: transferência de massa por difusão desde a fase líquida até a superfície do adsorvente, caracterizada pelo coeficiente de transferência de massa (k_f), o transporte difusivo através dos poros do adsorvente, caracterizado pelo coeficiente de difusão efetivo (D_p). E, as interações de adsorção-dessorção entre o soluto e o ligante presentes no centro ativo no interior do poro, caracterizados pelas constantes cinéticas de adsorção-dessorção (K_a - K_d) (EMANUELSSON et al., 2008).

4.2. MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1. Materiais

A matriz cromatográfica utilizada foi a *Chelating Sepharose Fast Flow* (CSFF) adquirida da *Amersham Biosciences* (Uppsala, Suécia). Os outros reagentes utilizados já foram descritos, conforme os Itens 2.2. e 3.2. (Capítulos II e III, respectivamente). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.2.2. Quantificação de Íons Cálcio Imobilizados

Os íons cálcio foram quantificados por espectrofotometria de chama (Beckman DU). A metodologia foi baseada em Coelho e Gargantini (1969), e consistiu em preparar uma solução de EDTA 0,5 mol/L em solução de NaOH 1,0 mol/L, em balão de 500 mL, diluído com água destilada até aproximadamente 450 mL. O pH da solução foi ajustado para 9,0 com solução concentrada de NaOH e o volume completado, a solução foi filtrada.

A solução padrão de cálcio 0,05 mol/L, consistiu em adicionar CaCO_3 p.a., em pó, em estufa (Spencer Scientific, 10031) a 105,0°C por 6 horas, o material foi resfriado em dessecador e pesado em Béquer de 50 mL. Adicionou-se HCl (1:1), pouco a pouco, até dissolver todo o CaCO_3 e o material transferido para Erlenmeyer de 500 mL, adicionou-se aproximadamente 200 mL de água destilada fervida em agitação. O material foi resfriado e transferido para um balão volumétrico de 500 mL, e seu volume completado. A solução assim preparada conteve 2,0 mg de Ca^{+2} /mL; as demais soluções foram preparadas a partir desta, através de diluições.

A quantificação de íons Ca^{+2} imobilizados na matriz foi calculada com base na diferença entre a concentração total de íon aplicado e a concentração de íon eluído no processo (regeneração da matriz). As amostras eluídas foram quantificadas conforme a curva de calibração obtida (Apêndice E).

4.2.3. Protocolo de Preparação para a Determinação da Cinética e Isotermas de Adsorção entre LPS-IDA- Ca^{+2}

⇒ *Cinética de Adsorção*

O método baseia-se em adicionar LPS em contato com o material adsorvente por tempo determinado, coletando amostras periodicamente e determinando a concentração de LPS por um método físico. O objetivo da técnica é avaliar como a concentração do soluto diminui pelo tempo, até que se alcance o equilíbrio. A seguir descreve-se a metodologia empregada para o estudo:

- 1) A matriz CSFF encontrava-se em solução de etanol 20,0%. Adicionou-se um volume de 5-7 mL de resina em um tubo de centrífuga de 50 mL. Iniciaram-se as lavagens com água de injeção (AI), completando o volume do tubo até 45 mL com AI. Centrifugou-se o material a 17.027xg (HIMAC Centrifuge – SCTA5BA – Hitachi, Tóquio/Japão), por 20 segundos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o processo repetido por mais 2 vezes;
- 2) Do tubo de centrífuga de 50 mL, passou-se para um volume de aproximadamente 14 mL de resina ressuspendida em AI para um tubo de centrífuga de 15 mL. Centrifugou-se o material a 17.027xg, por 20 segundos à temperatura ambiente para compactar a resina no fundo do tubo. O processo repetido por mais 2 vezes;
- 3) Após a última centrifugação foi determinada a relação entre o volume total do tubo e o volume de resina compactada (que foi 2:1, respectivamente). A solução foi misturada e transferida para um tubo PD-10, do qual toda a água foi eluída;
- 4) Adicionou-se 5 mL de NaOH 0,5 mol/L e deixou-se eluir. O processo repetido por mais 2 vezes;
- 5) Incubou-se com o mesmo volume de resina NaOH 0,5 mol/L por 1 hora, com o tubo PD-10 fechado na parte inferior. Após esse período de incubação, adicionou-se mais 5 mL da mesma solução até eluí-la;
- 6) Adicionou-se o mesmo volume de resina com água acidificada (HCl 0,1 mol/L de HCl), deixando-se eluir. O processo repetido por mais 2 vezes;
- 7) Adicionou-se AI para lavagem da resina (3 vezes o volume da resina), deixando-se eluir. Posteriormente, o tubo PD-10 foi fechado na parte inferior, adicionou-se metade do volume de resina, com CaCl_2 0,1 mol/L (etapa de imobilização de íons Ca^{+2} em CSFF). O tubo PD-10 foi fechado na parte superior, permanecendo sob agitação por 20 minutos (Thermolyne, modelo 33120, Iowa/UEA). O tubo PD-10 foi então aberto na parte inferior, e seu conteúdo eluído. Adicionou-se AI (2 vezes o volume da resina) deixando eluir a solução. Em seguida adicionou-se tampão de eluição – TEL (5 vezes o volume) e, finalmente, o tampão de equilíbrio – TEQ (5 vezes o volume da resina), deixando-se eluir a solução;
- 8) Adicionou-se igual volume ao da resina de TEQ, o tubo PD-10 foi fechado e agitado lentamente; em seguida o material foi vertido em um tubo de centrífuga de 15 mL. O material foi centrifugado a 17.027xg por 20 segundos, à temperatura ambiente, para compactar a resina no fundo do tubo. O processo foi repetido por mais 2 vezes;

- 9) Após a última centrifugação a relação entre o volume total do tubo e o volume de resina compactada foi determinada.

Exemplo: Volume total = 10 mL – Volume de resina = 5 mL

Alíquota que deverá ser retirada (?) – Volume desejado = 0,05 mL (ou 50 µL)

Para os ensaios utilizou-se 50 µL de resina; então alicotou-se 0,1 mL (100 µL) do volume total;

- 10) O tubo contendo o volume total foi agitado, e então retirado 100 µL do material sendo adicionado em microtubos. Os microtubos contendo resina foram incubados com 30 vezes o volume de amostras (50 µL de resina, incubou-se com 1,5 mL de amostra). Posteriormente, os tubos foram mantidos na horizontal em uma placa de agitação, acondicionados em temperatura controlada a 25,0°C;
- 11) Após o período de incubação, os microtubos foram centrifugados a 16.110 $\times g$ por 30 segundos, e seus sobrenadantes coletados. Por fim, as amostras dos sobrenadantes foram quantificadas.

Os tempos avaliados para a realização do estudo cinético para a adsorção de LPS foram: 30 seg, 1, 2, 5, 10 e 30 min, 1, 3, 6, 9, 12, 24, 48 e 72 h. Para cada tempo foram realizadas três réplicas, com uma contaminação de 100 UE/mL.

Tampões Utilizados

Os tampões utilizados nos experimentos foram: Tampão de equilíbrio (TEQ) - Acetato de sódio 20 mmol/L e NaCl 0,5 mol/L, pH 4,0. Tampão de eluição (TEL) - Acetato de sódio 20 mmol/L e NH₄Cl 0,5 mol/L, pH 4,0. Por fim, os tampões foram filtrados à vácuo em filtro de 0,22 µm e estocados sob refrigeração.

⇒ Isotermas de Adsorção

Para o estudo das isotermas de adsorção de LPS foi utilizado o protocolo acima descrito. As amostras foram contaminadas com uma concentração crescente de LPS puro: 20, 200, 1.000, 2.000, 4.000, 25.000, 50.000, 100.000, 150.000 e 200.000 UE/mL, permanecendo em incubação por 24 horas, à temperatura de 25°C. Ressalta-se apenas uma modificação: as lavagens com tampão de equilíbrio (TEQ) foram substituídas por lavagens com água de injeção.

Regeneração da Resina - Chelating Sepharose Fast Flow

A regeneração da resina CSFF, foi realizada adicionando água de injeção (3 vezes o volume da resina), sendo eluída, a resina foi então incubada por 20 minutos com solução de EDTA 0,1 mol/L. A solução foi eluída e o material alicotado (Item 4.2.2.). Adicionou-se novamente EDTA 0,1 mol/L (3 vezes o volume da resina), em seguida, lavou-se com água de injeção (5 vezes o volume da resina), toda solução foi eluída, e a resina ressuspensa e estocada em solução de etanol 20,0%.

4.2.4. Planejamento Experimental

Com o objetivo de realizar a menor quantidade de experimentos e encontrar a melhor região para os estudos de adsorção entre LPS-IDA- Ca^{+2} , foi desenvolvido um planejamento experimental de superfície de resposta 3^2 , de maneira a avaliar as variáveis de adsorção q_{max} (capacidade máxima de adsorção) e K (constante de afinidade entre LPS-IDA- Ca^{+2}) em diferentes pH e forças iônicas (F.I. em mol/L). A matriz completa dos experimentos pode ser visualizada na Tabela 16. Os resultados obtidos deste estudo foram tratados estatisticamente através do *software Statgraphics Centurion XV* versão (15.2.05).

TABELA 16. Matriz completa de ensaios do planejamento experimental 3^2 .

Ensaios	pH	F.I. (mol/L)
1	4,0	0,25
2	4,0	0,5
3	4,0	1,0
4	5,5	0,25
5	5,5	0,5
6	5,5	1,0
7	8,0	0,25
8	8,0	0,5
9	8,0	1,0
Ensaios de repetição do ponto central		
10	5,5	0,5
11	5,5	0,5
12	5,5	0,5

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. Cinética de Adsorção entre LPS-IDA- Ca^{+2}

O estudo da cinética de adsorção para as moléculas de LPS adsorverem no complexo IDA- Ca^{+2} foi investigado por um período total de 72 horas (Apêndice F). A Figura 30 mostra a curva cinética para o processo de adsorção de moléculas de LPS em IDA- Ca^{+2} , representando os valores de C/C_0 em relação ao tempo (t).

Figura 30. Cinética de adsorção entre LPS-IDA- Ca^{+2} em recipiente agitado em diferentes tempos de reação a 25,0°C. Curvas experimental (•) e ajustada (-).

Com base na curva cinética obtida, a relação da concentração de soluto na fase líquida e da concentração inicial da amostra diminuiu a valores próximos de 1,0, mantendo-se constante em torno de 0,40. Assim, com base nos resultados, pode se considerar que o equilíbrio é alcançado com aproximadamente 25 horas de contato.

Figura 31. Cinética de adsorção entre LPS-IDA- Ca^{+2} em recipiente agitado em diferentes tempos de reação a 25,0°C ajustada pela equação de Daniel.

Os dados obtidos foram ajustados por um modelo matemático conhecido como modelo de Daniel (BITTON; MARSCHALL, 1980), como observado na Figura 31.

Este modelo considera a influência da difusão das células através do filme líquido ao redor da partícula adsorvente, além da contribuição da reação adsorbato-adsorvente. O gráfico mostra o resultado da adaptação do modelo de regressão linear múltipla. A equação 17 representa o modelo ajustado:

$$\log(C / C_0) = 0,0269 \times t - 0,3903 \times \text{SQRT}(t) \quad (17)$$

A Figura 32 (a) e b)) representa a contribuição de ambos os termos do modelo para o valor da variável dependente de $\log(C/C_0)$. Pode-se observar como a variabilidade de resíduos é menor no caso da variável $\text{SQRT}(t)$, indicando o maior efeito deste sobre o modelo. Dado que estas variáveis correspondem aos principais mecanismos que se manifestam no processo de adsorção, podemos considerar que o mecanismo de difusão tem um efeito maior do que a reação química.

Figura 32. Variabilidade dos resíduos entre o efeito de $\log(C/C_0)$ em função do tempo (a) e $\text{SQRT}(t)$ (b), respectivamente.

4.3.2. Determinação das Isotermas de Adsorção entre LPS-IDA-Ca⁺²

Neste item estão apresentados os resultados experimentais planejados no item 4.2.4., no qual foram avaliados: pH 4,0, 5,5 e 8,0; e força iônica (F.I.) 0,25, 0,5 e 1,0 mol/L de NaCl. O estudo destes efeitos permitiram avaliar a melhor condição de pH e F.I. para a obtenção da maior capacidade de adsorção (q^*) entre LPS-IDA-Ca⁺², além de determinar a constante de afinidade entre adsorbato-adsorvente (K).

Como têm sido propostas na literatura, as isotermas de adsorção são utilizadas para representar o equilíbrio entre as concentrações de soluto adsorvido sobre a superfície da matriz e as concentrações de soluto em solução. No estado de equilíbrio, a taxa de soluto que está sendo adsorvida na superfície da resina é igual à taxa que deixa a superfície (BURKERT, 1998). A isoterma indica a quantidade de adsorvente requerida e a sensibilidade do processo de adsorção quanto à concentração do soluto.

Para a análise dos resultados experimentais foi realizado um ajuste dos modelos mais comumente utilizados na literatura: Freundlich e Langmuir.

4.3.2.1. Ajuste da Isoterma por Freundlich

Para a obtenção dos parâmetros do modelo proposto por Freundlich, que representa a adsorção entre LPS-IDA-Ca⁺², os valores de q^* e c^* provenientes das isotermas experimentais foram linearizados através de regressão linear da equação 18, conforme:

$$\ln q^* = \ln K + n \ln c^* \quad (18)$$

Com os dados de regressão linear podem-se obter os valores estimados dos parâmetros da equação, K e n. Na Tabela 17 obtêm-se os valores para estas variáveis em cada condição empregada, assim como os dados estatísticos obtidos com o ajuste.

TABELA 17. Valores obtidos para os parâmetros da equação de Freundlich para a adsorção entre LPS-IDA- Ca^{+2} . K corresponde à constante de equilíbrio da equação e n é o valor do expoente. O valor de n tomará forma linear ($n=1$), convexa ($n>1$) ou côncava ($n<1$).

	F.I. (mol/L)	K	n	R ² ajustado	Desvio- padrão
pH 4,0	1,00	30,73	1,172	82,60	1,64
	0,50	5097,47	0,477	74,70	1,01
	0,25	105,23	0,866	78,70	1,90
pH 5,5	1,00	59,90	1,071	93,40	0,93
	0,50	464,32	0,681	72,60	1,43
	0,25	53,57	0,962	95,10	0,68
pH 8,0	1,00	42,68	0,900	95,10	0,68
	0,50	53,57	0,824	85,50	0,85
	0,25	44,51	0,782	87,80	0,71

Dos valores obtidos a partir da equação nota-se que, para se obter um alto valor de q^* correspondente à maior quantidade de adsorbato por unidade de volume de adsorvente, ou seja, maior adsorção, seria conveniente contar com os maiores valores de K e n. Por outro lado, para os estudos com colunas cromatográficas, recomenda-se que o valor do expoente da equação de Freundlich seja menor que um ($n<1$). Neste caso considera-se uma isoterma favorável, já que a zona de adsorção vai se estreitando à medida em que avança a coluna (RICHARDSON et al., 2002). Da Tabela 17 conclui-se que os maiores valores de K foram nas condições de pH 4,0 e 5,5 com F.I. de 0,5 mol/L. Observa-se que para essas condições de maior K, obtêm-se os menores valores de n.

Para efeito comparativo de ambos os parâmetros no valor de q^* , procedeu-se em utilizar modelos de isotermas ajustadas a cada pH e F.I. para avaliar q^* em um dado intervalo de c^* . Na Figura 33 podem-se observar os resultados das isotermas obtidas nas diferentes condições. Para pH 4,0 e 5,5 com F.I. 1,0 mol/L foram obtidos os maiores valores de q^* , fundamentalmente a altos valores de concentrações já que o expoente n para estas condições é maior que um ($n>1$) assim, a isoterma não tende a se estabilizar em um valor máximo, como ocorre se n é menor que um.

Figura 33. Isothermas de adsorção entre LPS-IDA- Ca^{+2} em função de q^* , que representa a capacidade de adsorção da matriz, e c^* representando a concentração de LPS em solução, segundo modelo de Freundlich. F.I. corresponde à força iônica investigada (mol/L).

O comportamento de adsorção verificado nas condições de pH 4,0 e 5,5 com F.I. 1,0 mol/L, nas quais n é maior que 1, é típico de sistemas em que: o solvente se adsorve fortemente, ou então que existe uma forte atração intermolecular dentro da camada adsorvida (DECHOW, 1989). Comparado com os outros valores n obtidos, nestas condições considera-se alta afinidade entre adsorbato-adsorvente.

Para uma melhor interpretação dos resultados de adsorção entre LPS-IDA- Ca^{+2} , na Figura 34 (a), b) e c)), pode-se observar as isothermas obtidas para diferentes valores de pH e F.I., as quais foram divididas em três zonas de concentração de LPS, baixa, média e alta, respectivamente.

Figura 34. Isothermas de adsorção entre LPS-IDA- Ca^{+2} em função de q^* , que representa a capacidade de adsorção da matriz, e c^* a concentração de LPS em solução, segundo modelo de Freundlich, divididas em intervalos de concentração de LPS: a) baixa, b) média e c) alta. F.I. corresponde à força iônica investigada (mol/L).

Conforme os dados obtidos, dependendo da concentração de LPS presente no meio cada valor de pH e F.I. poderá ser avaliado separadamente.

Por exemplo, em baixas concentrações de LPS, inferiores a 2.500 UE/mL, a maior adsorção alcançada foi na condição de pH 4,0 e F.I. 0,5 mol/L (Figura 34a), que mostra uma curva de adsorção côncava desde o eixo da concentração na fase líquida, que tende a estabilizar-se em um máximo. Em médias e altas concentrações de LPS (Figura 34b e c), a maior adsorção alcançada foi na condição de pH 4,0 e F.I. 1,0 mol/L, demonstrando que na condição de menor pH e maior F.I., mais moléculas de LPS são adsorvidas na matriz IDA-Ca⁺². Em todo o intervalo de concentração de LPS estudado (baixa, média ou alta), na condição de pH 8,0 em qualquer F.I. obtêm-se os menores valores de adsorção, resultado similar obtido por Kang (2000), que estudou a adsorção de LPS-IDA-Fe³⁺.

Esta afinidade entre as moléculas de LPS e o ligante metálico imobilizado na matriz pode estar relacionada com a interação eletrostática entre grupos doadores de elétrons presentes na porção do lipídeo A dos LPS (grupos fosfato) e os grupos aceptores de elétrons (íons Ca⁺²). Essa interação é responsável pelo fenômeno de adsorção entre LPS-IDA-Ca⁺² e é a base para os mecanismos de afinidade em IMAC.

A concentração total de íon Ca⁺² imobilizado na matriz IDA foi determinada como sendo de 30 µmol/mL de adsorvente. O valor obtido está dentro do intervalo especificado pelo fabricante (PHARMACIA, 2002). Um ponto interessante de se discutir neste aspecto sobre íons imobilizados é que a concentração de LPS é superior a concentração destes, no entanto, como os valores de adsorção de LPS em IDA-Ca⁺² são elevados, pode-se sugerir que íons Ca⁺² podem interagir com múltiplas moléculas de LPS. Consideramos duas possibilidades para esta interação: a primeira seria que um complexo de moléculas de LPS (micelas) se ligariam ao sítio ativo, a segunda, seria que um único sítio poderia interagir com várias moléculas de LPS ao mesmo tempo. Contudo, o mecanismo de interação da primeira hipótese é mais convincente.

A influência do pH no processo de adsorção pode ser explicada através do mecanismo eletrostático entre as moléculas de LPS e a matriz IDA-Ca⁺². Tal efeito eletrostático está relacionado com os valores de pK dos LPS, com pK₁=1,3 e pK₂=8,2 (HOU; ZANIEWSKI, 1990). Assim, pode-se considerar que na condição de pH 8,0 as moléculas de LPS devem estar carregadas positivamente, o que explicaria a menor adsorção na matriz positivamente

carregada (Ca^{+2}). De outra forma, para os menores pH investigados, 4,0 e 5,5, as moléculas de LPS apresentariam grupos negativamente carregados, o que aumentaria a afinidade pela matriz, e consequentemente aumentaria o valor da capacidade de adsorção.

O efeito da força iônica pode estar associado com a observação de Kang (2000) que estudou a adsorção de LPS-IDA- Fe^{+3} , este autor reporta que o aumento da força iônica no processo de adsorção pode influenciar o aumento do número de agregação de moléculas de LPS. Isto é, mais monômeros de LPS agregariam-se, aumentando a estrutura micelar, o que refletiria em aumento da capacidade de adsorção dos agregados de LPS com o ligante metálico, e consequentemente mais moléculas de LPS seriam adsorvidas na matriz. Esta discussão pode ser corroborada com os resultados obtidos no presente trabalho, maiores valores de F.I. testados (0,5 e principalmente 1,0 mol/L) apresentaram maiores capacidades de adsorção de LPS.

Outra hipótese para explicar as menores capacidades de adsorção de LPS obtidas seria que em baixas forças iônicas as moléculas de LPS podem formar estruturas do tipo vesículas. Neste caso, a porção do lipídeo A estaria incorporada no interior destas estruturas, reduzindo a interação dos grupos fosfatos com o ligante de afinidade. Desta maneira, a capacidade de adsorção seria menor em baixas forças iônicas em consequência de possíveis efeitos estéricos. Este efeito pode ser explicado porque nestas condições, de baixa F.I., as moléculas de LPS associadas em estruturas vesiculares seriam muito grandes para terem livre difusão nos poros do adsorvente. Como reportado na literatura (SWEADNER, 1997), o tamanho de agregados micelares de LPS é de aproximadamente 10 a 70 nm, enquanto que as subunidades de LPS são muito menores. Os poros de adsorventes devem ser grandes o suficiente para permitir livre difusão das partículas, no caso de LPS os poros devem ser maiores que 1,4 μm . Conforme o fabricante, os poros da matriz IDA apresentam poros com tamanho de 100 nm. Portanto, nestas condições de baixa F.I. não haveria livre difusão de moléculas de LPS nos poros desta matriz, e dessa forma não haveria interação com o ligante de afinidade imobilizado, o que justificaria o efeito estérico.

Para encontrar a influência do pH e F.I. sobre a concentração de LPS adsorvido, os resultados foram ajustados a modelos estatísticos aplicando regressão múltipla (Tabela 18 e 19, respectivamente), conforme equação 19:

$$\ln q = 0,8725 \ln c + 1,4761 \times \text{pH} - 0,1559 \times \text{pH}^2 + 5,6339 \times \text{F.I.} - 3,6641 \times \text{F.I.}^2 \quad (19)$$

TABELA 18. Análise de variância para a variável $\ln q$, avaliando o efeito da concentração de LPS em solução, e da variável pH, dependendo do efeito da força iônica.

Parâmetro	Coefficiente de Regressão	Desvio-padrão	Valor - t	Valor - p
$\ln(c)$	0,8725	0,0314	27,7832	0,0000
pH	1,4761	0,2240	6,5886	0,0000
F.I.	5,6339	2,3109	2,4379	0,0157
pH^2	-0,1559	0,0198	-7,8609	0,0000
F.I.^2	-3,6641	1,7669	-2,0738	0,0394

TABELA 19. Análise de variância do modelo de regressão múltipla para a variável $\ln(q)$.

Fonte	Soma dos Quadrados	GL	Quadrado Médio	F - Quadrado	Valor - p
Modelo	25278,80	5	5055,76	2524,97	0,0000
Erro	394,45	197	2,00		
Total	25673,20	202			

$R^2=0,98$; R^2 (ajustado para GL)=0,98; Desvio-padrão estimado=1,4150. GL corresponde aos graus de liberdade.

A partir das análises estatísticas, pode-se inferir que o fator que menos influi no resultado é o efeito da F.I., dados os menores valores de t e maiores de p (Tabela 18). O efeito do pH tem influência em dois termos, pH e pH^2 , um positivo e outro negativo, respectivamente. À medida em que aumenta o pH, a diferença entre ambos termos se torna menor, de maneira que este efeito, quando alcançado em pH 8,0, terá como contribuição o menor valor para $\ln(q)$ obtido. Destaca-se também que este efeito para pH 4,0 e 5,5 é similar. No caso da F.I., os termos F.I. e F.I.^2 são opostos, mas com maior valor de F.I. a diferença é maior, de maneira que aumenta a adsorção. No caso dos valores de F.I. de 0,5 e 1,0 mol/L o efeito sobre o valor de $\ln(q)$ também é similar.

É interessante ressaltar que, quando selecionados todos os dados obtidos, é possível encontrar um ajuste para a isoterma de Freundlich válida para todo o intervalo. De outra forma, quando se seleciona apenas os valores

de pH 4,0 e 5,5, obtém-se uma maior correlação. Na Tabela 20 pode-se observar os parâmetros.

TABELA 20. Ajuste da isoterma de Freundlich para cada caso separadamente (valores obtidos para a adsorção entre LPS-IDA- Ca^{+2}). K corresponde à constante de equilíbrio da equação e n é o valor do expoente. O valor de n tomará forma linear ($n=1$), convexa ($n>1$) ou côncava ($n<1$).

	K	n	R ² ajustado	Desvio- padrão
Todos valores experimentais	169,32	0,803	73,90	1,59
pH 4,0 e 5,5 e qualquer F.I.	163,48	0,876	77,80	1,62

4.3.2.2. Ajuste da Isotherma por Langmuir

O ajuste da isoterma de Langmuir foi realizado através de regressão linear, dado o tipo e função da equação 15. Esta equação pode-se escrever em termos da constante de adsorção ou dessorção (K_a ou K_d , respectivamente). A Tabela 21 apresenta os resultados obtidos para o ajuste deste modelo.

TABELA 21. Valores obtidos para os parâmetros da equação de Langmuir para a adsorção entre LPS-IDA- Ca^{+2} . $q_{\max}$ corresponde à capacidade máxima de LPS que pode ser adsorvida na matriz, e K_d à constante de dissociação de Langmuir.

pH	F.I. (mol/L)	$q_{\max}$	K_d	R ² ajustado	Desvio- padrão
4,0	1,0	$1,91 \times 10^6$	5.698,5	79,10	$2,7 \times 10^5$
4,0	0,5	$7,90 \times 10^4$	2.126,6	50,00	$3,1 \times 10^5$
4,0	0,25	$1,82 \times 10^6$	778,9	57,30	$7,5 \times 10^6$
5,5	1,0	$4,53 \times 10^6$	8.970,0	49,60	$1,60 \times 10^6$
5,5	0,5	$7,30 \times 10^5$	1.237,5	44,90	$3,5 \times 10^5$
5,5	0,25	$4,98 \times 10^{12}$	$1,39 \times 10^{11}$	76,40	$4,8 \times 10^5$
8,0	1,0	$8,50 \times 10^5$	6.882,6	42,40	$3,9 \times 10^5$
8,0	0,5	$2,90 \times 10^5$	22.288,1	67,70	$6,2 \times 10^4$
8,0	0,25	$8,50 \times 10^5$	68.904,9	36,50	$3,1 \times 10^5$

Como é possível observar a partir dos valores do quadrado do coeficiente de correlação, que são baixos, não deve-se considerar que o

modelo de Langmuir represente os resultados de adsorção entre LPS-IDA- Ca^{+2} .

Pesquisadores como Sharma e Agarwal (2001), Johnson e Arnold (1995) e Jiang e Hearn (1996), têm demonstrado que a adsorção de proteínas (lisozima, ovalbumina, albumina de soro bovino, conalbumina e aglutinina) em sistemas IMAC, os quais empregam matrizes de agarose, não seguem o modelo de Langmuir devido a fatores como ligação da proteína em múltiplos sítios de adsorção, natureza heterogênea da superfície sólida e interações não específicas do tipo proteína-proteína. Semelhantemente ao observado por estes autores, foi constatado no presente estudo que é bastante possível que interações entre LPS-LPS e ligações de agregados de LPS em múltiplos sítios de adsorção devam ocorrer. Assim, nas condições empregadas, a adsorção de LPS-IDA- Ca^{+2} é melhor representada pelo modelo de Freundlich, mais indicado para explicar o fenômeno estudado.

4.4. Conclusões

Tendo em conta os resultados obtidos nesse Capítulo, recomenda-se empregar o processo de IMAC-IDA- Ca^{+2} para a remoção de LPS contaminante presente em caldo fermentado contendo a GFPuv nas condições de menor pH e maior força iônica (4,0 e 1,0 mol/L, respectivamente). Deste modo, trabalhando em pH 4,0 a carga global da GFPuv deverá ser positiva, o que ocasionará repulsão em relação à matriz carregada com íons Ca^{+2} . E, conseqüentemente, a GFPuv deverá ser eluída enquanto agregados de LPS se adsorveriam à matriz IDA- Ca^{+2} , reduzindo a concentração de contaminante no bioproducto de interesse.

CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Dada a estrutura desta tese, a maioria das conclusões a que se pôde chegar já se encontram enunciadas nos capítulos aos quais se referem. O texto aqui apresentado consiste em um resumo delas.

Foi obtido LPS puro proveniente de cultivo de *Escherichia coli* recombinante para sua utilização nos ensaios de partição em sistemas micelares de duas fases aquosas. Além disso, foi implementada a metodologia objetivando a quantificação de LPS de amostras contaminadas, com base no ensaio cinético cromogênico.

Os resultados indicaram que o tensoativo não-iônico Triton X-114 apresenta interferência no método de quantificação de LPS, provavelmente devido à semelhança entre a estrutura da molécula do tensoativo e a de LPS.

Com base nos resultados obtidos a partir das curvas de espalhamento de raios-X a baixos ângulos para as soluções de Triton X-114 em solução aquosa água, pode-se afirmar que as interações entre as micelas formadas dependem da concentração do tensoativo. Nas menores concentrações (90 e 270 mmol/L), as micelas formadas apresentaram atração entre si. Por outro lado, com o aumento da concentração (270 e 450 mmol/L), foi observado um efeito repulsivo. O resultado obtido com a solução de LPS puro em solução aquosa mostrou haver uma auto-associação de monômeros de LPS, formando estruturas micelares cilíndricas. Estas observações levam a crer que existe a possibilidade de formação de micelas mistas entre moléculas de Triton X-114 e LPS em ambiente aquoso.

Os resultados obtidos com a partição da GFP_{uv} pura em sistemas micelares de duas fases aquosas apresentaram valores de $K_{GFP_{uv}} > 1,0$, sendo a proteína-alvo particionada preferencialmente para fase diluída (pobre em micelas). Tal efeito aumentou com a elevação da temperatura (aumento do efeito de volume de exclusão).

O estudo do planejamento experimental com a GFP_{uv} pura apresentou os melhores resultados na região do ponto central (4,0% (p/p) de Triton X-114/tampão a 60,0°C), com $K_{GFP_{uv}} = 13,85$ e $\%REC_{GFP_{uv}} = 115,0\%$. O efeito da variável resposta $K_{GFP_{uv}}$ é dependente da concentração de Triton X-114 e do

efeito da temperatura, e o efeito da variável $\%REC_{GFPuv}$ não foi dependente da concentração de Triton X-114, apenas do efeito da temperatura.

A partição do homogeneizado celular de *E. coli* em sistemas micelares de duas fases aquosas apresentou valores de K_{GFPuv} superiores aos resultados com a partição da GFPuv pura nas mesmas condições. Tal efeito pode estar relacionado à presença de outros contaminantes no sistema. E ainda, a GFPuv apresentou um fator de purificação de 10 vezes em relação aos contaminantes, na fase diluída.

A adição dos sais $MgSO_4$, $CaCl_2$, KI e $(NH_4)_2SO_4$ causaram deslocamento da curva binodal do sistema Triton X-114/tampão. Tal efeito provocou maior ou menor elevação, ou diminuição, dos $T_{NÉVOA}$ segundo a concentração e o tipo de sal utilizado, respectivamente. A adição de GFPuv e LPS puros em sistemas micelares de duas fases aquosas na presença dos sais, ocasionou queda nos valores obtidos para a variável K_{GFPuv} , o que pode estar associado à carga negativa que a proteína-alvo adquire nas condições estudadas. Contudo, baseado nas características físico-químicas da GFPuv e nas condições avaliadas, sugere-se a não-adição de sais em SMDFA.

Em suma, o processo de purificação por sistemas micelares de duas fases aquosas foi bastante eficiente em remover LPS contaminante para a F_c . Em todas as condições de partição estudadas, nenhuma apresentou $\%REM_{LPS} < 95,0\%$. Além disso, foi seletivo em purificar a proteína-alvo GFPuv na fase diluída, tanto para as amostras com GFPuv pura, quanto às provenientes do homogeneizado celular de *E. coli*.

E finalmente, para a utilização do processo por cromatografia de afinidade por íons metálicos visando a remoção de LPS presente em meio fermentado contendo GFPuv, recomenda-se o emprego deste nas condições de menor pH e maior força iônica (4,0 e 1,0 mol/L, respectivamente). Deste modo, trabalhando em pH 4,0 a carga global da GFPuv deverá ser positiva, o que ocasionará repulsão em relação à matriz carregada com íons Ca^{+2} . E, consequentemente, a GFPuv deverá ser eluída enquanto agregados de LPS se adsorveriam à matriz $IDA-Ca^{+2}$, reduzindo para níveis toleráveis a concentração de contaminante no bioproduto de interesse.

REFERÊNCIAS

- ADAM, O.; VERCELLONE, A.; PAUL, F.; MONSAN, P.F.; PUZO, G. A non-degradative route for the removal of endotoxin from exopolysaccharides. **Analytical Biochemistry**, v.225, p.321–327, 1995.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia para qualidade em química analítica**: uma assistência a acreditação. Brasília: ANVISA, 2004. 76p. (Séries temáticas – Acreditação de laboratórios, v.1).
- AGUI, W.; KURACHI, Y.; ABE, M.; OGINO, K.J. Antibact. **Antifungal Agents**, 17, p.101, 1989.
- ANDERSSON, L.; PORATH, J. Isolation of phosphoproteins by immobilized metal (Fe^{3+}) affinity chromatography. **Analytical Biochemistry**, v.154, p.250-254, 1986.
- AIDA, Y.; PABST, M.J. Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114. **Journal of Immunological Methods**, v.132, n.2, p.191-195, 1990.
- 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, Chichester: Wiley-Interscience, 1986. 346p.
- ANACKER, E.W.; GHOSE, H.M. Counterions and micelle size. 1. Light scattering by solutions of dodecyltrimethylammonium salts. **Journal of Physical Chemistry**, v.67, n.8, p.1713-1716, 1963.
- ANSPACH, F.B. Endotoxin removal by affinity sorbents. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v.49, p.661-681, 2001.
- ANSPACH, F.B.; HILBECK, O. Removal of endotoxins by affinity sorbents, **Journal of Chromatography, A**, v.711, p.81–92, 1995.
- AQUINO, L.C.L. **Purificação de pró-insulina humana recombinante com cauda de poli(histidina): cromatografia em membranas de afinidade com íons metálicos imobilizados**. Campinas, SP. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia Química – Universidade de Campinas, 2004.
- ASENJO, J.A. **Separation process in biotechnology**. New York: Marcel Dekker, 1990. 801p. (Bioprocess technology, v.9).
- ATKINS, P.; DE PAULA, J. **Physical Chemistry**, 4ed. New York: Oxford University Press. 1992.
- BAILEY, S.M.; MEAGHER, M.M. Separation of soluble protein from inclusion bodies in Escherichia coli lysate using crossflow microfiltration. **Journal of Membrane Science**, v.166, p.137-146, 2000.
- BELTER, P.A.; CUSSLER, E.L.; HU, W. **Bioseparations**: Downstream Processing for Biotechnology. New York: John Wiley & Sons, 1988. 368p.
- BANG, F.B. The toxic effect of a marine bacterium on Limulus and the formation of blood clots. **Biology Bulletin**, v.105, p.361-362, 1953.

BARBOSA, LRS. **Estudo de sistemas de relevância biológica por espalhamento de raios-x a baixos ângulos**. São Paulo, SP. Tese de Doutorado, Instituto de Física – Universidade de São Paulo, 2008. 226p.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos**. 3.ed. Campinas: Unicamp, 2007. 480p.

BAUMGARTNER, J.D.; GLAUSER, M.P. Immunotherapy of endotoxemia and septicemia. **Immunobiology**, 187, p.464–477, 1993.

BUETLER, B.; CERAMI, A. Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator. **Annual Review of Biochemistry**, v.57, p.505-518, 1988.

BISCHOFF, R.; SPECK, D.; LEPAGE, P.; DELATRE, L.; LEDUX, C.; BROWN, S.W.; ROITSCH, C. Purification and biochemical characterization of recombinant α 1-antitrypsin variants expressed in *Escherichia coli*. **Biochemistry**, v.30, p. 3464-3472, 1991.

BITTON, G.; MARSHALL, K.C. **Adsorption of Microorganisms to Surfaces**, New York; John Wiley and Son, Inc, 1980.

BLANKSCHTEIN, D.; THURSTON, G.M.; BENEDEK, G.B. Phenomenological theory of equilibrium thermodynamic properties and phase separation of micellar solutions. **Journal of Chemical Physics**, v.85, p.7268-7288, 1986.

BOKMAN, S.H.; WARD, W.W. Renaturation of *Aequorea* green fluorescent protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.101, p.1372-1380, 1981.

BORDIER, C. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. **Journal of Biological Chemistry**, v.256, p.1604-1607, 1981.

BRESOLIN, I.T.L.; MIRANDA, E.A.; BUENO, S.M.A. Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) de biomoléculas: aspectos fundamentais e aplicações tecnológicas, **Química Nova**, v.32, p.1288-1296, 2009.

BROCHSZTAIN, S.; BERCI, P.; TOSCANO, VG.; CHAIMOVICH, H.; POLITI, M.J. Ion binding and selectivity in zwitterionic micelles. **Journal of Physical Chemistry**, v.94, n.17, p.6781-6785, 1990.

BURKERT, C.A.V. **Estudo experimental e teórico da separação de cefalosporina C em coluna de leito fixo**. Campinas, SP. Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade de Campinas, 1998.

CAETANO, W.; BARBOSA, L.R.S.; ITRI, R.; TABAK, M. Trifluoperazine effects on anionic and zwitterionic micelles: a study by small angle X-ray scattering. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.260, p.414-422, 2003.

CAETANO, W.; GELAMO, E.L.; TABAK, M.; ITRI, R. Chlorpromazine and sodium dodecyl sulphate mixed micelles investigated by Small Angle X-Ray Scattering. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.248, p.149-157, 2002.

CAMBREX. **Limulus Amebocyte Lysate (LAL) Kinetic-QCL**. Catalog number: 50-650U. (Catalog A) [Catálogo]. Disponível em: <http://www.lonza.co.jp/products/endotoxin/pdf/kqcl.pdf>. Acesso em: 08/Ago/2007.

CAMBREX. **Limulus Amebocyte Lysate (LAL) Pyrogen - 5000**. Catalog Number: 50-650U, 50-650NV, 50-650H. (Catalog B) [Catálogo]. Disponível em: <http://www.lonza.co.jp/products/endotoxin/pdf/kqcl.pdf>. Acesso em: 08/Ago/2007.

CASCONI, O.; ANDREWS, B.A.; ASENJO, J.A. Partitioning and purification of thaumatin in aqueous two-phase systems. **Enzyme and Microbial Technology**, v.13, p.629-635, 1991.

CARALE, M.T.R. **Salt effects on micellization, micellar growth, and phase behavior of aqueous solutions of nonionic surfactants**. Cambridge, 1993. 189p. Tese de Doutorado - Massachusetts Institute of Technology.

CHAGA, G.S. Twenty-five years of immobilized metal ion affinity chromatography: past, present and future. **Journal Biochemistry Biophysical Methods**, v.49, p.313-334, 2001.

CHALFIE, M.; KAIN, S., eds. **Green fluorescent protein: properties, applications and protocols**. New York: Wiley-Liss, 1998. 400p.

CHALFIE, M.; TU, Y.; UESKIRCHEN, G.; WARD, W.W.; PRASHER, D.C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**, v.263, n.5148, p.802-805, 1994.

CHAMPLUVIER, B.; KULA, M.R. Dye-ligand membranes as selective adsorbents for rapid purification of enzymes: a case study. **Biotechnology and Bioengineering**, v.40, p.33-40, 1992.

CHANDLER, D. **Introduction to Modern Statistical Mechanics**, Oxford University Press, USA, 1989.

CHANG, Y.K.; CHASE, H.A. Ion exchange purification of G6PDH from unclarified yeast cell homogenates using expanded bed adsorption. **Biotechnology and Bioengineering**, v.49, n.2, p.204-216, 1996.

CHANG, Y.K.; MCCREATH, G.E.; CHASE, H.A. Development of an expanded bed technique for an affinity purification of G6PDH from unclarified yeast cell homogenates. **Biotechnology and Bioengineering**, v.48, p.355-366, 1995.

CHENG, H.T.; HUANG, K.C.; YU, H.Y.; GAO, K.J.; ZHAO, X.; LI, F.; TOWN, J.; GORDON, J.R.; CHENG, J.W. A new protocol for high-yield purification of recombinant human CXCL8₍₃₋₇₂₎K11R/G31P expressed in *Escherichia coli*. **Protein Expression & Purification**, v.61, p.65-72, 2008.

CHEVALIER, Y.; ZEMB, T. The structure of micelles and microemulsions. **Reports on Progress in Physics**, v.53, p.279-371, 1990.

CHUDAKOV, D.; LUKYANOV, S.; LUKYANOV, K. Fluorescent proteins as a toolkit for *in vivo* imaging. **Trends in Biotechnology**, v.23, n.12, p.605-613, 2005.

COLLINS, K.D.; WASHABAUGH, M.W. The Hofmeister effect and the behavior of water at interfaces. **Quarterly Reviews of Biophysics**, v.18, n.4, p.323-422, 1985.

COOPER, J.F.; LEVIN, J.; WAGNER, H.N. New rapid *in vitro* test for pyrogen in short-lived radiopharmaceuticals. **Journal of Nuclear Medicine**, v.11, p.310, 1970.

COSTA, S.A.; PESSOA-JR, A.; ROBERTO, I.C. Xylanase recovery by aqueous two phase systems using experimental design. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.70/72, p.629-639, 1998.

COTTON, M.; BAKER, A.; SALTIK, M.; WAGNER, E.; BUSCHLE, M. Lipopolysaccharide is a frequent contaminant of plasmid DNA preparations and can be toxic to primary human cells in the presence of adenovirus. **Gene Therapy**, v.1, p.239–246, 1994.

CRAMERI, A.; WHITEHORN, E.A.; TATE, E.; STEMMER, W.P.C. Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. **Nature Biotechnology**, v.14, p.315-319, 1996.

CUNHA, T.; AIRES-BARROS, R. Large-scale extraction of proteins. **Molecular Biotechnology**, v.20, p.29-40, 2002.

DANESHIAN, M.; GUENTHER, A.; WENDEL, A.; THOMAS, H.; VON-AULOCK, S. *In vitro* pyrogen test for toxic or immunomodulatory drugs. **Journal of Immunological Methods**, v.131, p.169-175, 2006.

DARKOW, R.; GROTH, T.; ALBRECHT, W.; LUTZOW, K.; PAUL, D. Functionalized nanoparticles for endotoxin binding in aqueous solutions. **Biomaterials**, v.20, p.1277-1283, 1999.

DECHOW, F.J. **Separation and Purification Techniques in Biotechnology**. Noyes Publications, NJ, 1989.

DI PADOVA, F.E.; BRADE, H.; BARCLAY, G.R.; POXTON, I.R.; LIEHL, E.; SCHUETZE, E.; KOCHER, H.P.; RAMSAY, G.; SCHREIER, M.H.; MCCLELLAND, D.B. A broadly cross-protective monoclonal antibody binding to *Escherichia coli* and *Salmonella lipopolysaccharides*. **Infection and Immunity**, v.61, n.9, p.3863–3872, 1993.

DIAS, R.; MEL'NIKOV, S.; LINDMAN, B.; MIGUEL, M.G. DNase behavior in the presence of oppositely charged surfactants. **Langmuir**, v.16, p.9577–9583, 2000.

DYR, J.E.; SUTTNAR, J. Separation used for purification of recombinant proteins. **Journal of Chromatography B**, v.699, p.383-401, 1997.

ELIN, R.; WOLFF, S. Nonspecificity of the *Limulus* amoebocyte lysate test: positive reactions with polynucleotides and proteins. **Journal of Infectious Diseases**, v.128, p.349-352, 1973.

EMANUELSSON, I.; KARIN, A.; RISÖ, J. **Characterising of chromatography gels for purification of erythropoietin**. Dissertação de Mestrado – CUJAE, Havana, Cuba, 2008.

ENATURE.com – Homepage. **Atlantic Horseshoe Crab, *Limulus polyphemus***. Disponível em: <http://www.enature.com/fieldguides/detail.asp?recnum=SC0040>. Acesso em: 10/08/2007.

ERRIDGE, C.; BENNETT-GUERRERO, E.; POXTON, I.R. Structure and function of lipopolysaccharides. **Microbes and Infection**, v.4, p.837-851, 2002.

EVERBERG, H.; LEIDING, T.; SCHIOTH, A.; TJERNELD, F.; GUSTAVSSON, N. 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**, v.1122, n.1/2, p.35–46, 2006.

FARMACOPÉIA Brasileira.

Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeia/index.htm>. Acesso em: 20 fev. 2007.

FERNANDEZ, A.; SALAGER, J.L.; SCORZZA, C. Surfactantes. IV Surfactantes Noniônicos. Módulo de enseñanza en fenomenos interfaciales. **Cuaderno FIRP**, S303-PP, v.2, p.15-17, 2004.

FERREIRA, G.N.M.; MONTEIRO, G.A.; PRAZERES, D.M.F.; CABRAL, J.M.S. Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccine applications. **Trends in Biotechnology**, v.18, p.380–388, 2000.

FISCHBACH, M.; HEINRICH, E.; DESPREZ, P.; DURINGER, R. Online dialysate filtration: a method of dialysate endotoxin removal or only reduction. **Nephron**, v.66, n.1, p.117-118, 1994.

FLETCHER, J.R.; RAMWELL, P.W. The effects of prostacyclin (PGI₂) on endotoxin shock and endotoxin-induced platelet aggregation in dogs. **Circulatory Shock**, v.7, p.299-308, 1980.

FRAKER, D.L.; STOVROFF, M.C.; MERINO, M.J.; NORTON, J.A. Tolerance to tumor necrosis factor in rats and the relationship to endotoxin tolerance and toxicity. **Journal of Experimental Medicine**, v.168, p.95-105, 1988.

FRATELLI, F.; SIQUINI, T.J.; PRADO, S.M.A.; HIGASHI, H.G.; CONVERTI, A.; CARVALHO, J.C.M. Effect of medium composition on the production of tetanus toxin by *Clostridium tetani*. **Biotechnology Progress**, v.21, p.756-761, 2005.

GAINES DAS, R.E.; BRUGGER, P.; PATEL, M.; MISTRY, Y.; POOLE, S. Monocyte activation test for pro-inflammatory and pyrogenic contaminants of parenteral drugs: test design and data analysis. **Journal of Immunological Methods**, v.288, n.1/2, p.165-177, 2004.

GERBA, C.P.; HOU, K. Endotoxin removal by charge-modified filters. **Applied and Environmental Microbiology**, v.50, n.6, p.1375-1377, 1985.

GLATTER, O.; KRATKY, O. **Small Angle X-ray Scattering**, Academic Press, 1982.

GORBET, M.B.; SEFTON, M.V. Endotoxin: the uninvited guest. **Biomaterials**, v.26, p.6811-6817, 2006.

GOSLING, I.S.; COOK, D.; FRY, M.D.M. The role of adsorption isotherm in the design of chromatographic separations for downstream processing. **Chemical Engineering Research & Design**, v.67, p.232-242, 1989.

HANSEN, J.P.; HAYTER, J.B. A rescaled MSA structure factor for dilute charged colloidal dispersions. **Molecular Physics**, v.46, p.651-656, 1982.

HANSEN, J.P.; MCDONALD, I.R. **Theory of simple liquids**, Academic Press: London, 1976.

HARRIS, P.; WRIGHT, G.; ANDREWS, A.T.; PYLE, D.L.; ASENJO, J.A. The application of aqueous two-phase partitioning to the purification of proteins from transgenic sheep milk. **Progress in Biotechnology**, v.9, p.823-826, 1994.

HAYTER, J.B.; PENFOLD, J. An analytic structure factor for macroion solutions. **Molecular Physics**, v.42, p.109-118, 1981.

HEY, M.J.; JACKSON, D.P.; YAN, H. The salting-out effect and phase separation in aqueous solutions of electrolytes and poly (ethylene glycol). **Polymer**, v.46, p.2567-2572, 2005.

HIRAYAMA, C.; MAKATA, M.; MORIMOTO, S.; TACHIBE, H.; IHARA, H.; OHKUMA, L.; MIYACHI, Y. The removal of endotoxins from protein solutions using column packings with aminated poly (γ -methyl L-glutamate) spheres. **Chromatographia**, v.40, p.33-38, 1995.

HIRAYAMA, C.; SAKATA, M. Chromatographic removal of endotoxin from protein solutions by polymer particles. **Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.781, n.1/2, p.419-432, 2002.

HOFFMANN, S.; PETERBAUER, A.; SCHINDLER, S.; FENNRICH, S.; POOLE, S.; MISTRY, Y.; MONTAG-LESSING, T.; SPREITZER, I.; LOESCHNER, B.; VAN AALDEREN, M.; BOS, R.; GOMMER, M.; NIBBELING, R.; WERNER-FELMAYER, G.; LOITZL, P.; JUNG, T.; BRCIC, M.; BRUEGGER, P.; FREY, E.; BOWE, G.; CASADO, J.; COECKE, S.; DE LANGE, J.; MOGSTER, B.; NAESS, L.M.; AABERGE, I.S.; WENDEL, A.; HARTUNG, T. International validation of novel pyrogen tests based on human monocyte cells. **Journal of Immunological Methods**, v.298, n.1/2, p.161-173, 2005.

HOU, K.C.; ZANIEWSKI, R. Depyrogenation by endotoxin removal with positively charged depth filter cartridge. **Journal of Parenteral Science and Technology**, v.44, p.204-209, 1990.

HOWELL, W.H. Observations upon the chemical composition and coagulation of the blood of *Limulus polyphemus*, *Callinectes hastatus*, and *Cucumaria sp.* **Johns Hopkins University Circulars**, v.43, p.4-5, 1885.

HUDDLESTON, J.G.; OTTOMAR, K.W.; NGONYANI, D.M.; LYDDIATT, A. Influence of system and molecular parameters upon fractionation of intracellular proteins from *Saccharomyces* by aqueous two-phase partition. **Enzyme and Microbial Technology**, v.13, p.24-32, 1991.

INOUE, T.; YOKOYAMA, Y.; ZHENG, L.Q. Hofmeister anion effect on aqueous phase behavior of heptaethylene glycol dodecyl ether. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.274, p.349-353, 2004.

ISHII, M. **Aplicação da proteína verde fluorescente, GFPuv, como indicador biológico na validação da autoclavagem de soluções parenterais e da esterilização por óxido de etileno de itens termolábeis: comparação com esporos de *Bacillus subtilis*.** São Paulo, 2006. 245p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

ISHII, M.; KUNIMURA, J.S.; VESSONI-PENNA, T.C.; CHOLEWA, O. Study on the thermal stability of green fluorescent protein (GFP) in glucose parenteral formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v.337, p.109-117, 2007.

ISRAELACHVILI, J.N., ed. **Intermolecular and surface forces**. 2.ed. London: Academic, 1991. 450p.

ISSEKUTZ, A.C. Removal of Gram-negative endotoxin from solutions by affinity chromatography. **Journal of Immunological Methods**, v.61, p.275-281, 1983.

JENSEN, L.B.; TORP, A.M.; ANDERSEN, S.B.; SKOV, P.S.; POULSEN, L.K.; KNOL, E.F.; VAN HOFFEN, E. The biological activity of a recombinantly expressed (His)₆-tagged peanut allergen (rAra h 1) is unaffected by endotoxin removal. **Journal of Immunological Methods**, v.335, p.116-120, 2008.

JIANG, W.; HEARN, T.W. Protein interaction with immobilized metal ion affinity ligands under high ionic strength conditions. **Analytical Biochemistry**, v.242, p.45-54, 1996.

JOHANSSON, H.O.; LUNDH, G.; KARLSTROM, G.; TJERNELD, F. Effect of ions on partitioning of serum albumin and lysozyme in aqueous two-phase systems containing ethylene oxide/propylene oxide copolymers. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1290, p.289-298, 1996.

JOHANSSON, H.O.; PERSSON, J.; TJERNELD, F. Thermoseparating water/polymer system: a novel one-polymer aqueous two-phase system for protein purification. **Biotechnology and Bioengineering**, v.66, p.247-257, 1999.

JOHNSON, R.D.; ARNOLD, F.H. Multipoint binding and heterogeneity in immobilized metal affinity chromatography. **Biotechnology and Bioengineering**, v.48, p.437-443, 1995.

JOZALA, A.F.; LOPES, A.M.; MAZZOLA, P.G.; MAGALHÃES, P.O.; VESSONI PENNA, T.C.; PESSOA Jr., A. Liquid-liquid extraction of commercial and biosynthesized nisin by aqueous two-phase micellar systems. **Enzyme and Microbial Technology**, v.42, n.2, p.107-112, 2008.

KABIR, M.H.; ARAMAKI, K.; ISHITOBI, M.; KUNIEDA, H. Cloud point and formation of microemulsions in sucrose dodecanoate systems. **Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.216, n.1/3, p.65-74, 2003.

KAMEI, D.T. **Protein and viral partitioning in two-phase aqueous micellar systems**. Cambridge, 2001. 316p. Tese de Doutorado - Massachusetts Institute of Technology.

KAMEI, D.T.; KING, J.A.; WANG, D.I.C.; BLANKSCHTEIN, D. Separating lysozyme from bacteriophage P22 in two-phase aqueous micellar systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v.80, n.2, p.233-236, 2002a.

KAMEI, D.T.; KING, J.A.; WANG, D.I.C.; BLANKSCHTEIN, D. Understanding viral partitioning in two-phase aqueous nonionic micellar systems. 2. Effect of entrained micelle-poor domains. **Biotechnology and Bioengineering**, v.78, n.2, p.203-216, 2002b.

KANG, Y. **Endotoxin removal from protein solution by immobilized metal ion affinity chromatography**. Newark, 2000. 232p. Dissertação de Mestrado - New Jersey Institute of Technology.

KANG, Y.; LUO, R.G. Chromatographic removal of endotoxin from hemoglobin preparations: effects of solution conditions on endotoxin removal efficiency and protein recovery. **Journal of Chromatography, A**, v.809, n.1/2, p.13-20, 1998.

KASTNER, M. **Protein liquid chromatography**. Amsterdam: Elsevier, 1999. 941p. (Journal of Chromatography Library, 61).

KIM, Y.C.; KWON, S.; LEE, S.Y.; CHANG, H.N. Effect of pLysS on the production of bioadhesive precursor protein by fed-batch cultivation of recombinant *Escherichia coli*. **Biotechnology Letters**, v.20, p.799-803, 1998.

KNEEN, M.; FARINAS, J.; LI, Y.; VERKMAN, A.S. Green fluorescent protein as a noninvasive intracellular pH indicator. **Journal of Biophysics**, v.74, p.1591-1599, 1998.

KOSHY, L.; SAIYAD, A.H.; RAKSHIT, A.K. The effects of various foreign substances on the cloud point of Triton-X 100 and Triton-X 114. **Colloid and Polymer Science**, v.274, p.583-587, 1996.

LAM, H.; KAVOOSI, M.; HAYNES, C.A.; WANG, D.I.C.; BLANKSCHTEIN, D. Affinity-enhanced protein partitioning in decyl β -D-glucopyranoside two-phase aqueous micellar systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v.89, p.381-392, 2005.

LAN, Q.; BASSI, S.A.; ZHU, J.; MARGARITIS, A. A modified Langmuir model for the prediction of the effects of ionic strength on the equilibrium characteristics of protein adsorption onto ion exchanger/affinity adsorbents. **Chemical Engineering Journal**, v.81, p.179-186, 2001.

SIMON, L.; OTTO, H. Aqueous two-phase extraction: a case study in process analysis and control. In: AIChE ANNUAL MEETING, Cincinnati, 2005. **Conference Proceedings**, Cincinnati, 2005. p.237-246.

LEE, C.K.; SU, W.D. Nonionic surfactant-mediated affinity cloud point extraction of vancomycin. **Separation Science and Technology**, v.3, n.16, p.3267-3277, 1999.

LEE, J.H. High level expression of antimicrobial peptide mediated by a fusion partner reinforcing formation of inclusion bodies. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.277, p.575-580, 2000.

LEVIN, J.; BANG, F.B. A description of cellular coagulation in the Limulus **Bulletin of the Johns Hopkins Hospital**, v.115, p.337-345, 1964.

LEWIS, P.J.; ERRINGTON, J. Use of green fluorescent protein for detection of cell-specific gene expression and subcellular protein localization during sporulation in *Bacillus subtilis*. **Microbiology**, v.142, p.733-740, 1996.

LIEBERS, V.; BRÜNING, T.; RAULF-HEIMSOTH, M. Occupational endotoxin-exposure and possible health effects on humans (review). **American Journal of Industrial Medicine**, v.49, p.474-491, 2006.

LIN, M.F.; WILLIAMS, C.; MURRAY, M.V.; ROPP, P.A. Removal of lipopolysaccharides from protein-lipopolysaccharide complexes by nonflammable solvents. **Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.816, n.1/2, p.167-174, 2005.

LINDER, M.B.; QIAO, M.; LAUMEN, F.; SELBER, K.; HYYTIAE, T.; NAKARI-SETAELAE, T.; PENTTILAE, M.E. Efficient purification of recombinant proteins using hydrophobins as tags in surfactant-based two-phase systems. **Biochemistry**, v.43, n.37, p.11873-11882, 2004.

LIPFERT, J.; COLUMBUS, L.; CHU, V.B.; LESLEY, S.A.; DONIACH, S.J. Size and Shape of Detergent Micelles by Small-Angle X-ray Scattering. **Journal of Physical Chemistry B**, v.111, p.12427-12438, 2007.

LIU, C.L.; KAMEI, D.T.; KING, J.A.; WANG, D.I.C.; BLANKSCHTEIN, D. Separation of proteins and viruses using two-aqueous micellar systems. **Journal of Chromatography, B: Biomedical Sciences and Applications**, v.711, n.1/2, p.127-138, 1998.

LIU, C.L.; NIKAS, Y.J.; BLANKSCHTEIN, D. Novel bioseparations using two-phase aqueous micellar systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v.52, p.185-192, 1996.

LIU, S.; TOBIAS, R.; MCCLURE, S.; STYBA, G.; SHI, Q.; JACKOWSKI, G. Removal of endotoxin from recombinant protein preparations. **Clinical Biochemistry**, v.30, p.455-463, 1997.

LOPES, A.M.; MAGALHÃES, P.O.; MAZZOLA, P.G.; RANGEL-YAGUI, C.O.; CARVALHO, J.C.M.; PENNA, T.C.V.; PESSOA-Jr A. LPS removal from an *E. coli* fermentation broth using aqueous two-phase micellar system. Submetido: **Biotechnology Progress** em 25/02/10.

LOPES, A.M. **Purificação da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase por sistemas micelares de duas fases aquosas contendo ligantes de afinidade**. São Paulo, 2006. 136p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

LOPES, A.M.; RANGEL-YAGUI, C.O.; PESSOA-JR, A. Can affinity interactions Influence the partitioning of glucose-6-phosphate dehydrogenase in two-phase aqueous micellar systems? **Química Nova**, v.31, n.5, p.998-1003, 2008.

LOPES, A.M.; RANGEL-YAGUI, C.O.; PESSOA-JR, A. Influência dos tensoativos Triton X-114 e C10E4 na atividade enzimática da glicose-6-fosfato desidrogenase. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.40, p.142-145, 2004.

LOURENÇO, F.R.; KANEKO, T.M.; PINTO, T.J.A. Estimativa da incerteza em ensaio de detecção de endotoxina bacteriana pelo método de gelificação. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, n.4, p.438-443, 2005.

LUO, R.G.; KANG, Y. Methods for removing endotoxins from biological solutions using immobilized metal affinity chromatography. **United States Patent** N° US 6,365,147 B1, Publicada em: 02/04/2002.

MAGALHÃES, P.O.; PESSOA-JR, A. **Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology**, edited by Michael C. Flickinger, John Wiley & Sons, 2010.

MAGALHÃES, P.O.; LOPES, A.M.; MAZZOLA, P.G.; RANGEL-YAGUI, C.O.; PENNA, T.C.V.; PESSOA Jr., P. Methods of Endotoxin removal from biological preparations: a review. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v.10, n.3, p.271-287, 2007.

MAGALHÃES, P.O.; LOPES, A.M.; PESSOA-JR, A. Técnicas utilizadas na determinação de endotoxinas e pirogênios em produtos de interesse farmacêutico. **Bio Farma**, v.1, p.188-201, 2006.

MAGBOUL, A.A.A.; MCSWEENEY, P.L.H. Purification and properties of an acid phosphatase from *Lactobacillus curvatus* DPC2024. **Food Chemistry**, v.67, p.233-240, 1999a.

MAGBOUL, A.A.A.; MCSWEENEY, P.L.H. Purification and properties of an acid phosphate from *Lactobacillus curvatus* DPC2024. **International Dairy Journal**, v.9, p.849-855, 1999b.

MANERA, A.P.; KAMIMURA, E.S.; BRITES, L.M.; KALIL, S.J. Adsorption of Amyloglucosidase from *Aspergillus niger* NRRL 3122 Using Ion Exchange Resin. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.51, p.1015-1024, 2008.

MANTOVAARA, T.; PERTOFT, H.; PORATH, J. Carboxymethylated Aspartic Acid Agarose, a Selective Adsorbent for Calcium-Binding Proteins, Preliminary Studies. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.13, p.315-322, 1991.

SÁNCHEZ, R.M. ; BRIONES, J.R. **Cinética Química**. Editorial Pueblo y Educación. Havana, Cuba, p.101-110, 2006.

MARZZOCO, A.; TORRES, B.B. **Bioquímica básica**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 360p.

MATSUMAE, H.; MINOBE, S.; KINDAN, K.; WATANABE, T.; SATO, T.; TOSA, T. Specific removal of endotoxin from protein solutions by immobilized histidine. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.12, n.2, p.129-140, 1990.

MAYER, H.; WECKESSER, J. 'Unusual' lipid A's: structures, taxonomical relevance and potential value for endotoxin research. In: RIETSCHER, E.T., ed. **Chemistry of endotoxin**. Amsterdam: Elsevier Science, 1984. p.221-247. (Handbook of endotoxin, v.1).

MAZZOLA, P.G.; LAM, H.; KAVOOSI, M.; HAYNES, C.A.; PESSOA Jr., A.; PENNA, T.C.V.; WANG, D.I.C.; BLANKSCHTEIN, D. Affinity-tagged green fluorescent protein (GFP) extraction from a clarified E. coli cell lysate using a two-phase aqueous micellar system. **Biotechnology and Bioengineering**, v.93, n.5, p.998–1004, 2006.

MAZZOLA, P.G.; LOPES, A.M.; HASMANN, F.A.; JOZALA, A.F.; PENNA, T.C.V.; MAGALHAES, P.O.; RANGEL-YAGUI, C.O.; PESSOA-JR, A. Liquid–liquid extraction of biomolecules: an overview and update of the main techniques. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.83, p.143–157, 2008.

MCCREATH, G.E.; CHASE, H.A.; OWEN, R.O.; LOWE, C.R. Expanded bed affinity-chromatography of dehydrogenases from bakers-yeast using dye-ligand perfluoropolymer supports. **Biotechnology and Bioengineering**, v.48, n.4, p.341-354, 1995.

MCNEFF, C.; ZHAO, Q.; ALMLOF, E.; FLICKINGER, M.; PETER, W.C. The efficient removal of endotoxins from insulin using quaternized polyethyleneimine-coated porous zirconia. **Analytical Biochemistry**, v.274, p.181-187, 1999.

MERCALDI, M.P.; DAMS-KOZLOWSKA, H.; PANILAITIS, B.; JOYCE, A.P.; KAPLAN, D.L. Discovery of the dual polysaccharide composition of emulsan and the isolation of the emulsion stabilizing component. **Biomacromolecules**, v.9, n.7, p.1988-1996, 2008.

MICHIE, H.R.; MANOGUE, K.R.; SPRIGGS, D.R.; REVHAUG, A.; O'DWYER, S.; DINARELLO, C.A.; CERAMI, A.; WOLFF, S.M.; WILMORE, D.W. Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. **New England Journal of Medicine**, v.318, p.1481-1486, 1988.

MINOBE, S.; SATO, T.; TOSA, T.; CHIBATA, I. Characteristics of immobilized histamine for pyrogen adsorption. **Journal of Chromatography**, v.262, p.193-198, 1983.

MINOBE, S.; WATANABE, T.; SATO, T.; TOSA, T.; CHIBATA, I. Preparation of adsorbents for pyrogen adsorption. **Journal of Chromatography, A**, v.248, p.401-408, 1982.

MINUTH, T.; THOMMES, J.; KULA, M.R. A closed concept for purification of the membrane-bound cholesterol oxidase from *Nocardia rhodochrous* by surfactant-based cloud-point extraction, organic-solvent extraction and anion-exchange chromatography. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.23, p.107, 1996.

MITZNER, S.; SCHNEIDEWIND, J.; FALKENHAGEN, D.; LOTH, F.; KLINKMANN, H. Extracorporeal endotoxin removal by immobilized polyethylenimine. **Artificial Organs**, v.17, p.775-781, 1993.

MOORE, W.J. **Físico Química**. São Paulo: Edgard Blücher, v.2, 1976. 866p.

MORITA, T.; TANAKA, S.; NAKAMURA, T.; IWANAGA, S. A new (1-3)- β -D-glucana-mediated coagulation pathway found in *Limulus* amoebocytes. **FEBS Letters**, v.129, p.318-321, 1981.

MULLER, N. Is there a region of highly structured water around a nonpolar solute molecule. **Journal of Solution Chemistry**, v.17, n.7, p.661-672, 1988.

NAGAKI, M.; HUGHIS, R.D.; KEAN, H.N.; LAU, J.Y.N.; WILLIAMS, R. *In vitro* plasma perfusion through adsorbents and plasma ultrafiltration to remove endotoxin and cytokines. **Circulatory Shock**, v.38, p.182-188, 1992.

NARAYANAN, J.; ABDUL RASHEED, A.S.; BELLARE, J.R.J. A small-angle X-ray scattering study of the structure of lysozyme-sodium dodecyl sulfate complexes. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.328, p.67-72, 2008.

NIKAS, Y.J.; LIU, C.L.; SRIVASTAVA, T.; ABBOTT, N.L.; BLANKSCHTEIN, D. Protein partitioning in two-phase aqueous nonionic micellar solutions. **Macromolecules**, v.25, p.4794-4806, 1992.

NÚÑEZ-DELICADO, E.; BRU, R.; SÁNCHEZ-FERRER, A.; GARCÍA-CARMONA, F. Triton X-114-aided purification of latent tyrosinase. **Journal of Chromatography, B: Biomedical Sciences and Applications**, v.680, n.1/2, p.105-112, 1996.

OGIKUBO, Y.; NORIMATSU, M.; NODA, K.; TAKAHASHI, J.; INOTSUME, M.; TSUCHIYA, M.; TAMURA, Y. Evaluation of the bacterial endotoxin test for quantification of endotoxin contamination of porcine vaccines. **Biologicals**, v.32, p.88-93, 2004.

OHNO, N.; MORRISON, D.C. Lipopolysaccharide interaction with lysozyme: binding of lipopolysaccharide to lysozyme and inhibition of lysozyme enzymatic activity. **Journal of Biological Chemistry**, v.264, p.4434-4441, 1989.

ORNSTEIN, L.S.; ZERNIKE, F. Accidental deviations of density and opalescence at the critical point of a single substance. **Proceeding of the Koninklijke Nederlandse Akademie Van Wetenschappen**, v.17, p.793-806, 1914.

PARK, C.Y.; JUNG, S.H.; BAK, J.P.; LEE, S.S.; RHEE, D.K. Comparison of the rabbit pyrogen test and Limulus amoebocyte lysate (LAL) assay for endotoxin in hepatitis B vaccines and the effect of aluminum hydroxide. **Biologicals**, v.33, p.145-151, 2005.

PARK, J.H.; SZPONAR, B.; LARSSON, L.; GOLD, D.R.; MILTON, D.K. Characterization of lipopolysaccharides present in settled house dust. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.262-267, 2004.

PEARSON, F.C.; BOHON, J.; LEE, W.; BRUSZER, G.; SAGONA, M.; JAKUBOWSKI, G.; DAWE, R.; MORRISON, D.; DINARELLO, C. Characterization of *Limulus* amebocyte lysate-reactive material from hollow-fiber dialyzers. **Applied and Environmental Microbiology**, v.48, p.1189-1196, 1984.

PELCZAR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R.; EDWARDS, D.D.; PELCZAR, M.F. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. São Paulo: Makron, 1996. v.1, cap.9, p.231-244.

PESSOA Jr., A.; KILIKIAN, B.V. **Purificação de produtos biotecnológicos**. Barueri, São Paulo: Manole, p.115-139, 2005.

PETSCH, D.; ANSPACH, F.B. Endotoxin removal from protein solutions. **Journal of Biotechnology**, 76, p.97-119, 2000.

PHARMACIA LKB BIOTECHNOLOGY Affinity Chromatography – Principles and Methods – (código: 18-1022-29), guide 1, 2002.

PILUSO, L.G.; MARTINEZ, M.Y. Resolving liposomal inhibition of quantitative LAL methods. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v.53, n.5, p.260-263, 1999.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. Pirogênio. In: _____. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos correlatos e cosméticos**. São Paulo: Atheneu, 2000. cap.6, p.167-200.

PORATH, J. IMAC-Immobilized metal ion affinity based chromatography. **Trends Analytical Chemistry**. v.7, p.254-259, 1988.

PORATH, J.; CARLSSON J.; PISSAON, I.; BELFRAGE, G. Metal Chelate Affinity Chromatography, a New Approach to Protein Fractionation. **Nature**, v.258, p.598-599, 1975.

PORATH, J.; OLIN, B. Immobilized metal ion affinity adsorption and immobilized metal ion affinity chromatography of biomaterials. Serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions. **Biochemistry**, v.22, p.1621-1630, 1983.

POREKAR, V.G.; MENART, V. Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. *Journal Biochemistry Biophysical Methods*, v.49, p.335–360, 2001.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R. **Tecnologia farmacêutica**. 4.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1996. v.3, 2257p.

PUVVADA, S.; BLANKSCHTEIN, D. Molecular-thermodynamic approach to predict micellization, phase behavior, and phase separation of micellar solutions. I. Application to nonionic surfactants approach. **Journal of Chemical Physics**, v.92, n.6, p.3710-3724, 1990.

PYO, S.H.; LEE, J.H.; PARK, H.B.; HONG, S.S.; KIM, JH. A large-scale purification of recombinant histone H1.5 from *Escherichia coli*. **Protein Expression & Purification**, v.23, p.38–44, 2001.

QUINA FH, CHAIMOVICH H. Ion-exchange in micellar solutions. 1. Conceptual-framework for ion-exchange in micellar solutions. **Journal of Physical Chemistry**, v.83, n.14, p.1844-1850, 1979.

RAETZ, C.R.; ULEVITCH, R.J.; WRIGHT, S.D.; SIBLEY, C.H.; DING, A.; NATHAN, C.F. Gram-negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction. **FASEB Journal**, v.5, n.12, p.2652-2660, 1991.

RAETZ, C.R.H. Biochemistry of endotoxins. **Annual Review of Biochemistry**, v.59, p.129–170, 1990.

RAMELMEIER, R.A.; TERSTAPPEN, G.C.; KULA, M.R. The partitioning of cholesterol oxidase in Triton X-114 based aqueous two-phases systems. **Bioseparation**, v.2, p.315-324, 1991.

RANGEL-YAGUI, C.O.; LAM, H, KAMEI, D.T.; WANG, D.I.C.; PESSOA-JR, A.; BLANKSCHTEIN, D. Glucose-6-phosphate dehydrogenase partitioning in two-phase aqueous mixed (nonionic/cationic) micellar systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v.82, p.445-456, 2003.

RANGEL-YAGUI, C.O.; PESSOA-JR, A.; BLANKSCHTEIN, D. Two-phase aqueous micellar systems: an alternative method for protein purification. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.21, n.4, p.531-544, 2004.

REICHELTL, P.; SCHWARZ, C.; DONZEAU, M. Single step protocol to purify recombinant proteins with low endotoxin contents. **Protein Expression & Purification**, v.46, p.483-488, 2006.

RICHARDSON, J.; HARKER, J.; BACKHURST, J. **Chemical Engineering: Particle Technology and Separatin Processes**. 4.ed. 2002.

RIETSCHER, E.T.; KIRIKAE, T.; SCHADE, F.U.; MAMAT, U.; SCHMIDT, G.; LOPPNOW, H.; ULMER, A.J.; ZAHNINGER, U.; SEYDEL, U.; DI PADOVA, F. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. **FASEB Journal**, v.8, p.217-225, 1994.

ROBART, F.D.; WARD, W.W. Solvent perturbations of Aequorea green fluorescent protein. **Photochemistry**, v.51, p.92S, 1990.

RODRIGUES, E.M.G.; MILAGRES, A.M.F.; PESSOA Jr., A. Xylanase recovery: effect of extraction conditions on the AOT-reversed micellar systems using experimental design. **Process Biochemistry**, v.34, n.2, p.121-125, 1999a.

RODRIGUES, E.M.G.; PESSOA-JR, A.; MILAGRES, A.M.F. Screening of variables in xylanase recovery using BDBAC reversed micelles. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.77, p.779-788, 1999b.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**: uma estratégia sequencial de planejamentos. Campinas: Casa do Pão Editora, cap.3, p.95-119, 2005.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**: uma estratégia sequencial de planejamentos. Campinas: Casa do Pão Editora, cap.5, p.135-160, 2005.

ROMSTED, L.S. Micelle formation by surfactants. In: MITTAL, K.L.; LINDMAN, B, eds. **Surfactants in solution**. New York: Plenum Press., 1984. p.1015-1068. [Proceedings of International Symposium on Surfactants in Solution, v.2].

ROZKOV, A.; LARSSON, B.; GILLSTRÖM, S.; BJÖRNESTEDT, R.; SCHMIDT, S.R. Large-scale production of endotoxin-free plasmids for transient expression in mammalian cell culture. **Biotechnology and Bioengineering**, V.99, n.3, p.557-566, 2008.

RUSSELL, W.M.S.; BURCH, R.L. **The principles of humane experimental technique**. London: Methuen, 1959. 252p.

RYAN, J. Endotoxins and cell culture. In: CORNING LIFE SCIENCES. 2004. p.1-8. **[Technical Bulletin]**.

Disponível em:

http://www.level.com.tw/html/ezcatfiles/vipweb20/img/img/20297/cc_endotoxins_tc_305_rev1.pdf. Acesso em: 25/06/2008.

SAKATA, M.; KAWAI, T.; OHKUMA, K.; IHARA, H.; HIRAYAMA, C. Reduction of endotoxin contamination of various crude vaccine materials by Gram-negative bacteria using aminated poly(gamma-methyl L-glutamate) spherical particles. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.16, p.1065-1068, 1993.

SANCHEZ-FERRER, A.; BRU, R.; GARCIA-CARMONA, F. Partial purification of a thylakoid- bound enzyme using temperature-induced phase partitioning. **Analytical Biochemistry**, v.184, n.2, p.279-282, 1990.

SANTOS, F.; SANTOS, A.G.; BIERNAT, J.C.; SOUZA, M.E.L.; RAUBACH, A.; AGUIRRE, A.; ANTONIAZZI, V.R.; SCORSATTO, K.; SEIBEL, I.; DEMIN, S.S.; HICKMANN, A.C.; OLIVEIRA, F.P.; BORBA, E.V.; SIMON, S.; SANTOS, S.S. Detecção de endotoxina pelo teste do Limulus Amebocyte Lysate (LAL) em unidades de hemodiálise. **Revista Virtual de Medicina**, v.1, 2000.

SARUBBO, L.A.; OLIVEIRA, L.A.; PORTO, A.L.F.; DUARTE, H.S.; CARNEIRO-LEÃO, A.M.A.; LIMA-FILHO, J.L.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; TAMBOURGI, E.B. New aqueous two-phase system based on cashew-nut tree gum and poly(ethylene glycol). **Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.743, n.1/2, p.79-84, 2000.

SAVELLI, G.; SPRETI, N.; DI PROFIO, P. Enzyme activity and stability control by amphiphilic self-organizing systems in aqueous solutions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.5, n.1/2, p.111-117, 2000.

SCHÄDLICH, L.; SENGEL, T.; KIRSCHNING, C.J.; MÜLLER, M.; GISSMANN, L. Refining HPV 16 L1 purification from *E. coli*: reducing endotoxin contaminations and their impact on immunogenicity. **Vaccine**, v.27, p.1511-1522, 2009.

SCHINDLER, R.; DINARELLO, C.A. A method for removing interleukin-1 and tumor necrosis factor-inducing substances from bacterial cultures by ultrafiltration with polysulfone. **Journal of Immunological Methods**, v.116, p.159-165, 1989.

SCHMIDT, A.S.; ANDREWS, B.A.; ASENJO, J.A. Correlations for the partition behavior of proteins in aqueous two-phase systems: effect of overall protein concentration. **Biotechnology and Bioengineering**, v.50, p.617-626, 1996.

SCHOTT, H.; HAN, S.K. Effect of inorganic additives on solutions of nonionic surfactants III: CMC's and surface properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.65, p.975-978, 1976.

SCHOTT, H.; ROYCE, A.E.; HAN, S.K. Effect of inorganic additives on solutions of nonionic surfactants. 7. Cloud point shift values of individual ions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.98, n.1, p.196-201, 1984.

SELBER, K.; TJERNELD, F.; COLLÉN, A.; HYYTIÄ, T.; NAKARI-SETÄLÄ, T.; BAILEY, M.; FAGERSTROM, R.; KAN, J.; VAN DER LAAN, J.; PENTTILA, M.; KULA, M.-R. Large-scale separation and production of engineered proteins, designed for facilitated recovery in detergent-based aqueous two-phase extraction systems. **Process Biochemistry**, v.39, n.7, p.889-896, 2004.

SHARMA, S.K. Endotoxin detection and elimination in biotechnology. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.1, p.5-22, 1986.

SHARMA, S.; AGARWAL, G.P. Interactions of proteins with immobilized metal ions – Role of ionic strength and pH. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.243, p.61-72, 2001.

SHIBATANI, T.; KAKIMOTO, T.; CHIBATA, I. Purification of high molecular weight urokinase from human urine and comparative study of two active forms of urokinase. **Thrombosis and Haemostasis**, v.49, n.2, p.91-95, 1983.

SIMON, L., OTTO, H. Aqueous Two-phase extraction – a case study in process analysis and control. **AIChE Annual Meeting**, Cincinnati, OH. pp. 237e, 2005.

SIVARS, U.; ABRAMSON, J.; IWATA, S.; TJERNELD, F. Affinity partitioning of a poly(histidine)-tagged integral membrane protein, cytochrome *bo*₃ ubiquinol oxidase, in a detergent-polymer aqueous two-phase system containing metal-chelating polymer. **Journal of Chromatography, B: Biomedical Sciences and Applications**, v.743, n.1/2, p.307-316, 2000.

SIVARS, U.; TJERNELD, F. Mechanisms of phase behavior and protein partitioning in detergent/polymer aqueous two-phase systems for purification of integral membrane proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1474, p.133-146, 2000.

SMITH, P.K.; KROHN, R.I.; HERMANSON, G.T.; MALLIA, A.K.; GARTNER, F.H.; PROVENZANO, M.D.; FUJIMOTO, E.K.; GOEKE, N.M.; OLSON, B.J.; KLENK, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v.150, n.1, p.76-85, 1985.

SUDHÖLTER, E.J.R.; ENGBERTS, J.B.F.N. Salt effects on the critical micellar concentration, iodide counterion binding, and surface micropolarity of 1-methyl-4-dodecylpyridinium iodide micelles. **Journal of Physical Chemistry**, v.83, n.14, p.1854-1859, 1979.

SULKOWSKI, E. Immobilized metal-ion affinity chromatography of proteins on IDA-Fe⁺³. **Makromolekulare Chemie-Macromolecular Symposia**, v.17, p.334-335, 1988.

SULKOWSKI, E. The saga of IMAC and MIT. **Bioessays**, v.10, p.170-175, 1989.

SVERGUN, D.I.; FEIGIN, L.A. **Structure analysis by Small-angle X-ray and Neutron Scattering**. Plenum Press, NY, 1987.

SWEADNER, K.J.; FORTE, M.; NELSEN, L.L. Filtration removal of endotoxin (pyrogens) in solution in different states of aggregation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.34, n.4, p.382-385, 1977.

Takeda Chemicals. European patent, EP211968, 1988.

TANFORD, C. **The hydrophobic effect**: formation of micelles and biological membranes. 2.ed. New York: Wiley, 1980. 233p.

TELLER, J.D.; KELLY, K.M. A turbidimetric Limulus amebocyte assay for the quantitative determination of Gram negative bacterial endotoxin. **Progress in Clinical and Biological Research**, v.29, p.423-33, 1979.

TENG, N.N.H.; KAPLAN, H.S.; HEBERT, J.M.; MOORE, C.; DOUGLAS, H.; WUNDERLICH, A.; BRAUDE, A.I. Protection against Gram-negative bacteremia and endotoxemia with human monoclonal IgM antibodies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.82, n.6, p.1790-1794, 1985.

TENNIKOV, M.B.; GAZDINA, N.V.; TENNIKOVA, T.B.; SVEC, F. Effect of porous structure of macroporous polymer supports on resolution in high-performance membrane chromatography of proteins. **Journal of Chromatography, A**, v.798, n.1/2, p.55-64, 1998.

TONOVAA, K.; LAZAROVA, Z. Influence of enzyme aqueous source on RME-based purification of α -amylase. **Separation and Purification Technology**, v.47, p.43-51, 2005.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. cap.5, p.113-119.

TUBIO, G.; NERLI, B.; PICÓ, G. Partitioning features of bovine trypsin and alpha-chymotrypsin in polyethylene glycol-sodium citrate aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.852, n.1/2, p.244–249, 2007.

TREYBAL, R.E. **Operaciones de transferencia de masa**. 2ed, 1980.

TUCKER, I.; PENFOLD, J.; THOMAS, R.G.; GRILLO, I.; MILDNER, D.F.R.; BARKER, J.G. Self-Assembly in Complex Mixed Surfactant Solutions: The Impact of Dodecyl Triethylene Glycol on Dihexadecyl Dimethyl Ammonium Bromide. **Langmuir**, 24, p.10089-10098, 2008.

UEDA, E.K.M.; GOUT, P.W.; MORGANTI, L. Current and prospective applications of metal ion–protein binding. **Journal Chromatography A**, v.988, p.1-23, 2003.

UMAKOSHI, H.; YANO, K.; KULOI, R.; KOMASWA, I. Exative cultivation of recombinant Escherichia coli using aqueous two-phase systems for production and separation of intracellular heat shock proteins. **Biotechnology Progress**, v.12, p.51-56, 1996.

UNITED States Pharmacopeia: USP24; National Formulary: NF19. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1999. p.2875-2879.

UNITED States Pharmacopoeia: USP26. Rockville: United Stated Pharmacopeial Convention, 2002. p.2569.

Food and Drug Administration. Department of Health and Human Services. United States. **Guideline on validation of the Limulus Amebocyte Lysate test as an end-product endotoxin test for human and animal parental drugs, biological products, and medical devices**. Rockville: DHSS, FDA, 1987. 49p. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Blood/UCM080966.pdf>. Acesso em: 10/10/2008.

VAARA, M.; NURMINEN, M. Outer membrane permeability barrier in Escherichia coli mutants that are defective in the late acyltransferases of lipid A biosynthesis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.43, p.1459-1462, 1999.

VAN ROOSMALEN, D.; DOHMEN-SPEELMANS, M.P.J.; DIETZ, C.H.J.T.; VAN DEN BROEKE, L.J.P.; VAN DER WIELEN, L.A.M.; KUERENTJES, J.T.F. Bioseparations in aqueous micellar systems based on excluded-volume interactions. **Food and Bioproducts Processing**, v.86, p.51–58, 2006.

VERWEY, E.J.W.; OVERBEEK, J.G. **Theory of Stability of Lyophobic Colloids**, Amsterdam: Elsevier, 1948.

VESSONI-PENNA, T.C.; CHIARINI, E. Permeation associated with three-phase-partitioning method on release of green fluorescent protein. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.105-108, p.481-491, 2003.

WARD, W.W. Biochemical and physical propepts of green fluorescent protein. In: CHALFIE, M.; KAIN, S., eds. **Green fluorescent protein**: properties, applications and protocols. New York: Wiley-Liss, 1998. p.45-75.

WEARY, M.; PEARSON, F. A manufacturer's guide to depyrogenation. **BioPharm**, v.1, p.22-29, 1988.

WEBER, C.; HENNE, B.; LOTH, F.; SCHOENHOFEN, M.; FALKENHAGEN, D. Development of cationically modified cellulose adsorbents for the removal of endotoxins. **ASAIO Journal**, v.41, n.3, p.430-434, 1995.

WESTPHAL, O.; JANN, K. Bacterial lipopolysaccharides: extraction with phenol-water and further applications of the procedure. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v.5, p.83-91, 1965.

WILLAUER, H.D.; HUDDLESTON, J.G.; ROGERS, R.D. Solute partitioning in the aqueous biphasic systems composed of polyethylene glycol and salt: the partitioning of small neutral organic species. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.41, p.1892-1904, 2002.

WILLIAMS, K.L. **Endotoxins, pyrogens, lal testing and depyrogenation**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 2001. 359p.

WILLOUGHBY, N.A.; KIRSCHNER, T.; SMITH, M.P.; HJORTH, R.; TITCHENER-HOOKER, N.J. Immobilized metal ion affinity chromatography purification of alcohol dehydrogenase from baker's yeast using an expanded bed adsorption system. **Journal of Chromatography A**, v.840, p.194-204, 1999.

WINZERLING, J.J.; BERNA, P.; PORATH, J. In **Methods: a companion to Methods in Enzymology 4**. Academic Press, New York, p.4-13, 1992.

XU, Y.; SOUZA, M.A.; PONTES, M.Z.R.; VITOLO, M.; PESSOA Jr., A. Liquid-liquid extraction of enzyme by affinity aqueous two-phase systems. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.46, n.4, p.741-750, 2003.

YAMAZAKI, M.; OHSHIKA, M.; ITO, T. Phase-separation of Triton X-100 micelle solution induced by osmotic-stress. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1063, p.176-177, 1991.

YANG, F.; MOSS, L.G.; PHILIPS, G.N. The molecular structure of green fluorescent protein. **Nature Biotechnology**, v.14, p.1246-1251, 1996.

YOUNG, N.S.; LEVIN, J.; ROBERT, A. Prendergast: an invertebrate coagulation system activated by endotoxin: evidence for enzymatic mediation. **Journal of Clinical Investigation**, v.51, n.7, p.1790-1797, 1972.

ZIEGLER, E.J.; FISHER Jr., C.J.; SPRUNG, C.L.; STRAUBE, R.C.; SADOFF, J.C.; FOULKE, G.E.; WORTEL, C.H.; FINK, M.P.; DELLINGER, R.P.; TENG, N.N. et al. Treatment of Gram-negative bacteremia and septic shock with HA-1A human monoclonal antibody against endotoxin: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. The HA-1A Sepsis Study Group. **New England Journal of Medicine**, v.324, n.7, p.429-436, 1991.

ZIMMER, M. Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior. **Chemical Reviews**, v.102, p.759-781, 2002.

ZIMMER, M. **Green fluorescent protein (GFP)**. Disponível em: <http://www.conncoll.edu/ccacad/zimmer/GFP-ww/GFP-1.htm>. Acesso em: 17/05/2008.

ZIMMERMAN, T.; FRÈRE, C.P.; SATZGER, M.; RABA, M.; WEISBACH, M.; DÖHN, K.; POPP, A.; DONZEAU, M. Simultaneous metal chelate affinity purification and endotoxin clearance of recombinant antibody fragments. **Journal of Immunological Methods**, v.314, p.67–73, 2006.

ZOELLER, N.; LUE, L.; BLANKSCHTEIN, D. Statistical-thermodynamic framework to model nonionic micellar solutions. **Langmuir**, v.13, n.20, p.5258-5275, 1997.

ZOURAB, S.M.; SABET, V.M.; ABO-EL DAHAB, H. Behavior of micelles of a nonionic surfactant in the presence of concentrated electrolytes at different temperatures. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v.12, n.1, p.25-36, 1991.

ZULAUF, M. Detergent Phenomena in membrane protein crystallization. In: MICHEL, H., ed. **Crystallization of membrane proteins**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p.53-72.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Determinação das características estruturais e físico-químicas entre as moléculas de Triton X-114 e LPS, através do estudo de espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS)

Estudo realizado com a colaboração da Profa. Dra. Rosângela Itri e apoio teórico-experimental do Dr. Leandro R. S. Barbosa, realizado no Instituto de Física da Universidade de São Paulo – IF/USP

A.1. Introdução

A análise de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (*Small Angle X-ray Scattering* – SAXS) é bastante útil na determinação de características de partículas de dimensões coloidais (entre dezenas e centenas de Ângstrons), como por exemplo, micelas. Qualquer processo de espalhamento envolve relação inversa entre o tamanho da partícula e o ângulo de espalhamento. A seguir, apresenta-se uma introdução da teoria geral de espalhamento de raios-X.

Para um sistema esfericamente simétrico de partículas idênticas com baixa polidispersão e baixa anisometria, pode-se escrever a intensidade de espalhamento como sendo (GLATTER; KRATKY, 1982; SVERGUN; FEIGIN, 1987).

$$I(q) = kn_p \langle F^2(q) \rangle \left\{ 1 + 4\pi n_p \int_0^\infty (g(r) - 1) \frac{\sin(qr)}{qr} r^2 dr \right\} \quad (20)$$

$$= kn_p P(q) S(q)$$

em que k é uma constante relacionada ao arranjo experimental (constante determinada a partir da curva de SAXS de uma amostra padrão), n_p é a densidade numérica das partículas, $P(q)$ é

conhecido como fator de forma da partícula espalhadora e $q (= \frac{4\pi}{\lambda} \sin\theta)$, λ o comprimento de

onda da radiação incidente sendo 2θ o ângulo de espalhamento) é o módulo do vetor de

espalhamento; $S(q) = 1 + 4\pi n_p \int_0^\infty (g(r) - 1) r^2 \frac{\sin(qr)}{qr} dr$ é a função de interferência entre as

partículas espalhadoras, sendo $g(r)$ a função de distribuição radial, relacionada à probabilidade de se encontrar uma partícula distante de r do centro de uma partícula de referência.

A.1.1. Curvas de SAXS para Sistemas Micelares

Os agregados micelares são caracterizados por possuírem uma densidade eletrônica não homogênea (Figura 42). Estes agregados são compostos por um interior hidrofóbico, cuja densidade eletrônica ($\rho_{par}=0.275 \text{ e/\AA}^3$) é menor que a da água ($\rho_{\text{água}}=0.334 \text{ e/\AA}^3$), e uma camada polar (hidrofílica), cuja densidade eletrônica é maior que a densidade eletrônica da água. A figura abaixo mostra uma esquematização geral da estrutura micelar.

Figura 35. Esquematização da estrutura de um agregado micelar, com o interior hidrofóbico e as cabeças polares interagindo entre si.

A.1.2. Cálculo do Fator de Forma $P(q)$ de Agregados Micelares em Solução

Utilizaram-se dois modelos para o fator de forma de micelas em solução: elipsóide prolato de revolução e o cilindro.

Neste trabalho, o fator de forma elipsoidal foi utilizado para estudar o fator de forma de micelas não-iônicas de Triton X-114, as quais foram consideradas um elipsóide prolato, com dois níveis de densidade eletrônica (Figura 43) o que permite a modelação do fator da forma de uma micela elipsoidal em solução (HANSEN; HAYTER, 1982).

Figura 36. Esquematização do modelo micelar tipo elipsoidal. Os parâmetros de ajuste das curvas de SAXS para este elipsóide são: R_{par} (raio parafínico), vR_{par} (semi-eixo maior do elipsóide), assim como σ_{pol} e ρ_{pol} (espessura e densidade eletrônica da camada polar, respectivamente). $\rho_{\text{água}}$ e ρ_{par} são as densidades eletrônicas da água e da região parafínica, respectivamente, mantidas constantes e iguais a 0.334 e 0.275 $\text{e/\AA}^3$.

Assim, este fator de forma pode ser escrito (BARBOSA, 2008), como:

$$P(q) = \int_0^{\frac{\pi}{2}} \left[(\rho_{par} - \rho_{pol}) V_{par} \varphi(qR_{par} \Theta_{par}(\psi)) + (\rho_{pol} - \rho_{agua}) V_{pol} \varphi(qR_{pol} \Theta_{pol}(\psi)) \right]^2 \cos(\psi) d\psi \quad (21)$$

onde

$$\Theta_1(\psi) = (\cos^2 \psi + \nu^2 \sin^2 \psi)^{\frac{1}{2}}$$

$$\Theta_2(\psi) = (\cos^2 \psi + \nu_{tot}^2 \sin^2 \psi)^{\frac{1}{2}}$$

e $\nu_{tot} = (\nu R_{par} + \sigma_{pol}) / R_{pol}$ é a razão axial da partícula inteira, onde $R_{pol} = R_{par} + \sigma_{pol}$; σ_{pol} é a espessura da segunda camada de densidade eletrônica ρ_{pol} .

Seja agora um cilindro de tamanho L e raio da seção transversal $R_{pol} + R_{par}$ (Figura 44).

Figura 37. Função distribuição de densidade eletrônica $\rho_c(r)$ da secção transversal de um cilindro, composta por dois níveis de densidades eletrônicas diferentes, ρ_{par} e ρ_{pol} , em relação ao meio, $\rho_{água}$.

O fator de forma deste cilindro para uma dada orientação é dado por:

$$F_{cil}^2(q, \psi) = 4(\rho_{par} - \rho_{pol})^2 V_{par}^2 \frac{\sin^2(q\nu R_{par} \cos \psi)}{(q\nu R_{par} \cos \psi)^2} \frac{J_1^2(qR_{par} \sin \psi)}{(qR_{par} \sin \psi)^2} +$$

$$+ 4(\rho_{pol} - \rho_{agua})^2 V_{pol}^2 \frac{\sin^2(q\nu_{tot} R_{pol} \cos \psi)}{(q\nu_{tot} R_{pol} \cos \psi)^2} \frac{J_1^2(qR_{pol} \sin \psi)}{(qR_{pol} \sin \psi)^2} \quad (22)$$

onde agora $\nu = \frac{L}{2R_{par}}$ é a anisometria da região de densidade eletrônica ρ_{par} do cilindro e

$$\nu_{tot} = \frac{L}{2(R_{par} + \sigma_{pol})}; \quad \sigma_{pol} = R_{pol} - R_{par}$$

Assim, o fator de forma será dado por:

$$P(q) = \int_0^{\pi} F_{cil}^2(q, \psi) d\psi \quad (23)$$

A.1.3. Cálculo da Função de Interferência de Sistemas Micelares em Solução

Durante a execução deste trabalho, evidenciamos que alguns sistemas apresentaram interações entre as partículas espalhadoras; em especial, micelas compostas de tensoativos iônicos podem apresentar tal função nas curvas de SAXS. Neste estudo utilizou-se o tensoativo não-iônico; entretanto, em altas concentrações, estes podem apresentar funções de interferência.

A função $S(q)$ depende do potencial de interação entre as partículas e de suas posições relativas, via a função de distribuição radial $g(r)$ (equação 20). É bem conhecido que uma transformada de Fourier conecta as funções de interferência $S(q)$ e a função de correlação total $h(r)$ ($=g(r) - 1$) (CHANDLER, 1989). Se duas partículas não podem se interpenetrar, nenhuma partícula pode ser encontrada mais perto que a distância máxima de aproximação D (=diâmetro médio da partícula), tal que $g(r < D)=0$. No outro extremo, para distâncias muito maiores que o diâmetro médio da partícula, não deve existir interação entre as mesmas, já que os potenciais de interação de longo alcance são proporcionais a r^{-1} . Assim, a densidade de partículas longe da partícula de referência é indistinguível da densidade média das partículas e $g(r \rightarrow \infty)=1$.

O cálculo utilizado para a função de correlação total, $h(r)$, é o mesmo da teoria fundamental de líquidos: resolve-se a equação de Ornstein e Zernike (1914) (equação 24), impondo algumas relações de fechamento (Percus-Yevick (PY), Aproximação de Esfera Média (MSA), *Hipperneted Chain* (HNC), *Random Phase Approximation* (RPA), dentre outras) (HANSEN; MCDONALD, 1976). A equação de Ornstein-Zernike pode ser escrita como:

$$h(r_{12}) = c(r_{12}) + n_p \int c(r_{13})h(r_{23})dr_3 \quad (24)$$

em que $h(r_{ij})$ é função de correlação total da partícula i à partícula j , $c(r_{ij})$ é a correlação direta da partícula i com a partícula j (também chamada de correlação de pares) e r_{ij} é a distância da partícula i à partícula j .

As relações de fechamento nada mais são do que funções matemáticas que correlacionam a função de correlação de pares, $c(r)$, com a função de distribuição radial, $g(r)$, a fim de que a equação de Ornstein e Zernike tenha uma solução. Dentre todas as metodologias citadas para resolver (analiticamente ou não) a equação de Ornstein-Zernike, destaca-se a relação de fechamento *MSA* (*Mean Spherical Approximation*), desenvolvida por Hayter e Penfold (1981) e Hansen e Hayter (1982). A relação de fechamento MSA vem sendo amplamente utilizada pelo nosso grupo de pesquisa (CAETANO et al., 2002; 2003) e também por outros grupos de pesquisa ao redor do mundo (LIPFERT et al., 2007; NARAYANAN et al., 2008; TUCKER et al., 2008).

Esta relação de fechamento supõe que as micelas podem ser representadas como esferas "duras" efetivas (com volume equivalente e diâmetro $\sigma_e = 2R_{ef}$) em solução, sendo que o potencial mais comumente adotado para a interação de micelas em solução é o termo repulsivo do potencial *DLVO* (Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek) (VERWEY; OVERBEEK, 1948), uma vez que não existem evidências de um termo atrativo em sistemas micelares a baixas concentrações. O termo repulsivo deste potencial pode ser escrito como:

$$U(r) = \frac{Z^2 e^2}{\varepsilon (1 + 0.5 k_{DB} \sigma_{eff})} \frac{e^{-(k_{DB}(r - \sigma_{eff}))}}{r} \quad (25)$$

onde $k_{DB}^2 = \frac{8\pi e^2 N_A I}{10^3 \varepsilon K_B T}$, sendo Z a carga na superfície da micela, e a carga fundamental do

elétron, ε a constante dielétrica do meio, N_A o número de Avogadro, I a força iônica, K_B a constante de Boltzmann e T a temperatura. Neste modelo, k_{DB} é o inverso do comprimento de Debye, que descreve o intervalo de atuação do potencial repulsivo. No caso de micelas em solução, é interessante substituir Z por αN_{ag} (N_{ag} =Número de agregação). Deste modo, α está relacionado à porcentagem de cargas na superfície da micela. É importante salientar que α , por ser um parâmetro de ajuste, pode suprir algumas deficiências do potencial adotado. Assim, ele não pode ser interpretado diretamente como o coeficiente de ionização das micelas, mas sim como um valor efetivo. É interessante mencionar aqui que a força iônica foi calculada utilizando-se as constantes de dissociação dos sais que compõem o tampão, por isso o valor da força iônica pode ser ligeiramente diferente do valor nominal.

APÊNDICE B

A quantificação de proteínas totais foi realizada utilizando a Figura 38.

Figura 38. Curva de calibração da concentração total de proteínas obtida pelo método de BCA. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95,0% nos valores obtidos.

APÊNDICE C

Quantificação da Proteína Verde Fluorescente Recombinante – GFPuv

A GFPuv obtida a partir do cultivo de *Escherichia coli* DH5- α e foi purificada como descrito no Item 3.2.3., armazenada em frasco apirogênico e estocada em $-8,0^{\circ}\text{C}$. Sua quantificação foi realizada em fluorímetro utilizando uma curva de calibração previamente estabelecida por Ishii (2006), (Figura 39). Uma alíquota da amostra produzida e purificada foi confrontada em luz UV (Figura 40).

Figura 39. Curva de calibração da proteína GFPuv obtida em fluorímetro nos comprimentos de ondas $\lambda_{\text{exc.}}=394$ nm e $\lambda_{\text{emi.}}=509$ nm.

Figura 40. Tubo tipo Falcon contendo amostra purificada de GFPuv, evidenciada em câmara sem e com luz UV.

APÊNDICE D

Avaliação da Interferência do Triton X-114 na Metodologia de Quantificação e Estabilidade da GFPuv

Este estudo teve como objetivo avaliar a interferência do tensoativo não-iônico Triton X-114 na metodologia de determinação de GFPuv. Foi avaliada também a estabilidade da proteína GFPuv na presença do TX-114.

Os resultados obtidos para o estudo da interferência do TX-114 (nas concentrações de Triton X-114 a 2,0, 4,0, 6,0, 8,0, 10,0, 14,0, 18,0, 20,0 e 22,0% (p/p) preparados em tampão Mcllvaine) na metodologia de determinação de GFPuv podem ser visualizados na Figura 41. Os dados obtidos mostraram que as concentrações estudadas do tensoativo não-iônico TX-114 apresentaram média de interferência da ordem de 0,272 $\mu\text{g/mL}$ (o que correspondeu a uma intensidade luminosa de 1,5 nm).

É importante ressaltar que nestas amostras não foi adicionada GFPuv. Assim, o valor obtido refere-se apenas à influência do tensoativo no método. Tal valor é considerado baixo (ruído), e deve-se possivelmente à estrutura do TX-114, que apresenta um anel aromático em sua porção hidrofóbica, o qual absorve luz UV e emite um sinal que pode ser detectado nas condições empregadas. Assim, com o objetivo de diminuir essa interferência na determinação da GFPuv, o valor médio de interferência foi subtraído das leituras de amostras contendo GFPuv.

Figura 41. Interferência do TX-114 durante 1 hora de homogeneização à temperatura ambiente na determinação da intensidade de fluorescência da GFPuv. As barras de erros correspondem a um intervalo de confiança de 95,0% nos valores obtidos (neste caso as barras de erros apresentaram valores muito baixos, impossibilitando sua visualização).

O estudo sobre a avaliação da estabilidade da GFPuv na presença de diferentes concentrações de sistemas TX-114/tampão mostrar que mesmo nas maiores concentrações avaliadas (18,0, 20,0 e 22,0% (p/p) de TX-114) não foi detectada diferença significativa quando comparada às menores concentrações do tensoativo (2,0, 4,0 e 6,0% (p/p)). As amostras foram analisadas em espectrofluorímetro à temperatura controlada de 10,0°C (para evitar possível turvação das amostras). Todas as concentrações avaliadas proporcionaram um valor médio em intensidade luminosa de aproximadamente 540 nm (Figura 42), o que permite inferir que o tensoativo TX-114 não apresentou qualquer efeito desnaturante à proteína GFPuv.

Figura 42. Estudo da estabilidade da proteína GFPuv na presença de diferentes concentrações do tensoativo não-iônico TX-114, durante 1 hora, à temperatura ambiente. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95,0% nos valores obtidos.

Provavelmente, o efeito de desnaturação protéica não ocorra devido ao fato de o tensoativo ser uma molécula não carregada, e com isso não apresentar uma forte interação com a proteína GFPuv não afetando sua intensidade luminosa nas condições testadas. Assim, a proteína GFPuv apresenta-se estável no sistema de duas fases aquosas estudado; portanto, o tensoativo Triton X-114 pode ser empregado para a purificação dessa proteína.

APÊNDICE E

A quantificação de íons cálcio imobilizados na matriz cromatográfica para os estudos de adsorção de LPS foi realizada utilizando a Figura 43.

Figura 43. Curva de calibração da concentração de íons cálcio (mg/L) por porcentagem de emissão.

APÊNDICE F

Valores originais obtidos para os ensaios do estudo da cinética de adsorção entre LPS-IDA-Ca⁺² (Tabela 22).

TABELA 22. Estudo da cinética de adsorção de LPS em IDA-Ca⁺², em diferentes tempos de reação a 25,0°C.

Tempo (h)	C/C ₀	LogC/C ₀	SQRT(t)	Tempo (h)	C/C ₀	LogC/C ₀	SQRT(t)
0	1,05	0,02	0	3	0,46	-0,33	1,732
0	0,84	-0,07	0	3	0,38	-0,41	1,732
0	1,09	0,04	0	3	0,4	-0,39	1,732
0,0083	1,02	0,008	0,091	3	0,72	-0,14	1,732
0,0083	0,76	-0,11	0,091	6	0,88	-0,05	2,449
0,0166	0,98	-0,007	0,129	6	0,68	-0,16	2,449
0,0166	0,8	-0,09	0,129	6	0,42	-0,37	2,449
0,0166	0,65	-0,18	0,129	9	0,42	-0,37	3,000
0,0333	1,04	0,02	0,182	9	0,41	-0,38	3,000
0,0333	0,86	-0,06	0,182	9	0,43	-0,35	3,000
0,0333	0,82	-0,08	0,182	12	0,2	-0,68	3,464
0,0833	0,94	-0,02	0,288	12	0,34	-0,45	3,464
0,0833	0,82	-0,08	0,288	12	0,14	-0,84	3,464
0,0833	0,86	-0,06	0,288	12	0,36	-0,43	3,464
0,1666	1,08	0,03	0,408	12	0,53	-0,27	3,464
0,1666	0,07	1,14	0,408	24	0,37	-0,42	4,898
0,1666	0,87	-0,05	0,408	24	0,79	-0,09	4,898
0,5	0,71	-0,14	0,707	24	0,14	-0,84	4,898
0,5	0,72	-0,14	0,707	48	0,34	-0,46	6,928
0,5	0,36	-0,44	0,707	48	0,3	-0,51	6,928
1	0,8	-0,09	1,000	48	0,3	-0,51	6,928
1	0,94	-0,02	1,000	72	0,14	-0,84	8,485
1	0,35	-0,45	1,000	72	0,22	-0,64	8,485

Parâmetro	Estimativa	Desvio-padrão	t	Valor-p
t	0,0269042	0,005501	4,89063	0,0000
SQRT(t)	-0,390279	0,038138	-10,2333	0,0000

Análise de Variância

Fonte	Soma dos Quadrado	Df	Média Quadrada	Razão-F	Valor-p
Modelo	24,8682	2	12,4341	174,09	0,0000
Resíduo	2,6427	37	0,071424		
Total	27,5109	39			

$R^2=90,39\%$
 R^2 ajustado para d.f.=90,13%
 Erro padrão para estimativa=0,267253
 Erro médio absoluto=0,197417
 Estatística de Durbin-Watson=2,08352

95,0% intervalo de confiança para os coeficientes estimados

Parâmetro	Estimaiva	Erro	Limite menor	Limite maior
t	0,0269042	0,00550117	0,0157577	0,0380506
SQRT(t)	-0,390279	0,0381381	-0,467555	-0,313004

Figura 44. Gráfico de $\log(C/C_0)$ do efeito observado para a distribuição dos resíduos para o estudo cinético.

Com base na análise estatística, pode-se argumentar que desde que o valor p na Tabela ANOVA é menor que 0,01, existe uma relação estatisticamente significativa entre as variáveis para um nível de confiança de 99,0%. A estatística R^2 indica que o modelo explica 90,39% da variabilidade em $\log(C/C_0)$. A estatística R^2 ajustado é mais conveniente para comparar modelos com diferentes números de variáveis independentes, foi igual 90,13%. O erro padrão da estimativa mostra o desvio padrão dos resíduos, que é de 0,2672. O erro médio absoluto de 0,1974 é o valor médio dos resíduos.