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

**PURIFICAÇÃO DA α -TOXINA (FOSFOLIPASE C) OBTIDA A PARTIR
DE *Clostridium perfringens* TIPO A UTILIZANDO SISTEMAS DE
DUAS FASES AQUOSAS DE MODO DESCONTÍNUO E CONTÍNUO**

Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares

Tese para obtenção do título de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Adalberto Pessoa Júnior
Co-Orientadora:
Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto

São Paulo

2005

**PURIFICAÇÃO DA α -TOXINA (FOSFOLIPASE C) OBTIDA A PARTIR
DE *Clostridium perfringens* TIPO A UTILIZANDO SISTEMAS DE
DUAS FASES AQUOSAS DE MODO DESCONTÍNUO E CONTÍNUO**

Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares

**Tese para obtenção do título de
DOUTOR**

**Orientador:
Prof. Dr. Adalberto Pessoa Júnior
Co-Orientadora:
Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto**

São Paulo

2005

16310

DEDALUS - Acervo - CQ

30100011437

S676p Soares, Maria Taciana Cavalcanti Vieira
Purificação da α -toxina (fosfolipase C) obtida a partir de *Clostridium perfringens* tipo A utilizando sistemas de duas fases aquosas de modo descontínuo e contínuo -- São Paulo, 2005.

13+p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.

Orientador: Pessoa Júnior, Adalberto

Co-Orientador: Porto, Ana Lúcia Figueiredo

1. Enzimologia industrial 2. Microbiologia industrial 3. Fosfolipase : Bioquímica I. T. II. Pessoa Júnior, Adalberto, orientador. III. Porto, Ana Lúcia Figueiredo, co-orientador

660.63e CDD

Quando você acredita em si mesmo e considera sua alma divina e preciosa, irá se transformar em um ser capaz de promover milagres e realizar seus sonhos.

*Dedico esta tese à minha família
pelas horas que passaram sem
mim, em especial ao meu filho e
marido por tantos momentos
vividos sob minha ausência.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus por sempre colocar as pessoas certas na minha vida.

Agradeço em especial ao Prof. Dr. Adalberto Pessoa Júnior pela orientação nos momentos necessários, à confiança depositada em mim mesmo sem me conhecer e a possibilidade de participar de uma nova realidade.

À minha “mãe” científica, Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto, pela orientação, amizade, confiança na minha capacidade e principalmente pela paz e tranquilidade nos tantos momentos da realização deste trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho, diretor do Laboratório de Imunopatologia Keiso-Asami – LIKA, por permitir a realização deste trabalho nas instalações do LIKA e pela amizade de tantos anos.

Agradeço a Vallée S. A., nas pessoas dos Srs. Dr. Otto Mozzer e MSc Igor Viana Brandi, por disponibilizar o material para o desenvolvimento desta tese e por mim receber no Laboratório de Fermentação – Vallée, (LEF).

Ao Prof. Dr. Benício Barros Neto, pela ajuda incondicional no desenvolvimento de toda a estatística e pelas valiosas contribuições nas discussões deste trabalho.

À minha amiga Tatiana Porto, por sua amizade verdadeira, companheirismo e ajuda na elaboração deste trabalho, pelas discussões proveitosas e troca de estímulos científicos.

Agradeço aos novos amigos encontrados no Laboratório do Prédio Semi-Industrial, em especial ao Ângelo Samir e Carlota pela agradável convivência nos poucos meses que passei neste laboratório.

Agradeço aos meus velhos amigos do Laboratório de Biotecnologia – LIKA/ UFPE, Keila, Alessandro, Veridiana, Daniela Viana pela paciência e amizade em todos os momentos da elaboração desta tese.

A Márcia Nieves, minha estagiária, pela ajuda na elaboração de uma parte deste trabalho.

Não poderia deixar de agradecer aos funcionários das secretarias do departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica e da Faculdade de Ciências Farmacêuticas: Juarez, Miriam, Elza, Jorge, Elaine e Benê, que sempre me atenderam de forma cordial.

Agradeço aos funcionários do LIKA: Ilma, Conceição, Isabel, Sr. Otaviano, Moisés, Cleide, Vera, D. Celestina, Oscar pela amizade ao longo dos anos e pela ajuda sempre disponível.

Agradeço a FAPESP – Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da minha bolsa de doutorado e financiamento deste trabalho.

Finalmente, gostaria de agradecer a todos os meus familiares e amigos, que sempre me apoiaram e incentivaram a seguir com fé o caminho que escolhi, sem nunca pensar em desistir dos meus sonhos. Em especial a minha sogra Maria Madalena Vieira Soares, por ficar com meu filho enquanto eu viajava para realizar o doutorado.

De uma forma geral, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Sumário

LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	15
LISTA DE ABREVIATURAS	17
RESUMO	18
ABSTRACT	19
INTRODUÇÃO	20
OBJETIVOS	23
OBJETIVO GERAL	23
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
CAPÍTULO I	24
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
1. 1 – <i>CLOSTRIDIUM PERFRINGENS</i>	24
1.2 – TOXINA ALFA (FOSFOLIPASE C)	27
1.2.1 – Histórico	27
1.2.2 – Estrutura e propriedades físico-químicas	28
1.2.3 – Mecanismo de ação	29
1.2.4 – Doenças relacionadas com a toxina alfa	30
1.2.5 – Purificação da toxina alfa	30
1. 3 – SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS (SDFA)	33
1.3.1 – Considerações Gerais	33
1.3.2 – Diagrama de fases	35
1.3.3 – Fatores que influenciam a partição de biomoléculas	36
1.3.4 – Modelos teóricos	41
1.3.5 – Aplicação em grande escala	43
1.3.6 – Equipamentos para extração utilizando sistemas de duas fases aquosas	43
1.3.7 – Coluna de discos perfurados rotativos (PRDC)	45
1.3.8 – Aplicação de planejamentos experimentais em Sistemas de duas fases aquosas (SDFA)	47
CAPÍTULO II	49
EXTRAÇÃO DA TOXINA ALFA PRODUZIDA PELO <i>CLOSTRIDIUM PERFRINGENS</i> TIPO A EM SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS	49

2.1 INTRODUÇÃO	51
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS	52
2.2.1 Materiais	52
2.2.2 Preparação da toxina alfa	53
2.2.3 Preparação dos sistemas de duas fases aquosas	53
2.2.4 Atividade fosfolipásica C	54
2.2.5 Determinação da concentração de proteína	54
2.2.6 Planejamento experimental e análise estatística	54
2.2.7 Determinação do coeficiente de partição, fator de purificação e rendimento em atividade	55
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
2.3.1 Primeiro planejamento experimental	57
2.3.2 Segundo planejamento experimental	63
2.4 CONCLUSÃO	68

CAPÍTULO III 69

PURIFICAÇÃO DA TOXINA ALFA A PARTIR DE <i>CLOSTRIDIUM PERFRINGENS</i> TIPO A EM SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS PEG-FOSFATO	69
3.1 INTRODUÇÃO	71
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS	72
3.2.1 Materiais	72
3.2.2 Preparação da toxina alfa	73
3.2.3 Preparação dos sistemas de duas fases aquosas	73
3.2.4 Atividade fosfolipásica C	74
3.2.5 Determinação da concentração de proteína	74
3.2.6 Planejamento experimental e análise estatística	74
3.2.7 Determinação do coeficiente de partição, fator de purificação e rendimento em atividade	75
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
3.4 CONCLUSÃO	83

CAPÍTULO IV 84

EXTRAÇÃO CONTÍNUA DA TOXINA ALFA A PARTIR DE <i>CLOSTRIDIUM PERFRINGENS</i> TIPO A EM UMA COLUNA DE DISCOS PERFURADOS ROTATIVOS USANDO O SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS PEG-FOSFATO	84
4.1 INTRODUÇÃO	86
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS	89
4.2.1 Materiais	89
4.2.2 Preparação da toxina alfa	89
4.2.3 Preparação do sistema de duas fases aquosas	89
4.2.4 Coluna de discos perfurados rotativos	90
4.2.5 Procedimentos experimentais	90
4.2.6 Métodos analíticos	91
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	94
4.3.1 Efeito da taxa de fluxo da fase dispersa	94
4.3.2 Efeito da velocidade de agitação rotacional	98
4.4 CONCLUSÕES	102

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104
-----------------------------------	------------

ANEXOS I – ARTIGOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS DURANTE A TESE DE DOUTORADO	117
--	------------

I – A) LARGE SCALE PURIFICATION OF <i>CLOSTRIDIUM PERFRINGENS</i> TOXIN: A REVIEW	117
--	------------

Lista de Figuras

Figura 1.1.1 – Lâmina de coloração de Gram mostrando a forma do <i>Clostridium perfringens</i> . _____	26
Figura 1.2.2.1 – Estrutura da toxina alfa mostrando seus domínios N e C terminais, região flexível ligando os dois domínios e locais de fixação dos íons Zn e Ca. _____	29
Figura 1.3.2.1 – Exemplo de diagrama de fases de um sistema PEG-sal. _____	36
Figura 2.3.1.1 – Gráfico em cubo para os valores obtidos do coeficiente de partição no primeiro planejamento apresentado na Tabela 2.2.1.1. Os valores em parênteses são as concentrações do PEG. _____	58
Figura 2.3.1.2 – Gráfico em cubo para os valores obtidos do fator de purificação no primeiro planejamento apresentado na Tabela 2.2.1.1. Os valores em parênteses são as concentrações do PEG. _____	62
Figura 2.3.2.1 – Gráfico em cubo para os valores obtidos do fator de purificação no segundo planejamento apresentado na Tabela 2.3.2.1. Os valores em parênteses são as concentrações do PEG. _____	64
Figura 2.3.2.2 Relação entre rendimento em atividade ($Y\%$) e o fator de purificação (P_f) na partição da toxina alfa em sistema de duas fases aquosas PEG-fosfato. _____	68
Figura 3.3.1 Representação geométrica das médias previstas das concentrações de PEG e fosfato no coeficiente de partição da toxina alfa em sistema de duas fases aquosas PEG-fosfato. _____	78
Figura 3.3.2 Representação geométrica das médias previstas das concentrações de PEG e fosfato no fator de purificação da toxina alfa em sistema de duas fases aquosas PEG-fosfato. _____	80
Figura 3.3.3 Superfície de resposta efeitos das concentrações de PEG e fosfato no fator de purificação da toxina alfa em sistema de duas fases aquosas PEG-fosfato. _____	81
Figura 3.3.4 Representação geométrica das médias previstas das concentrações de PEG e fosfato no rendimento em atividade para a extração da toxina alfa em sistema de duas fases aquosas PEG-fosfato. _____	82
Figura 4.3.1.1 Influência da taxa de fluxo da fase dispersa (V_D) no “hold up” (E_D) para a extração contínua da toxina alfa produzida a partir de <i>Clostridium perfringens</i> tipo A em	

coluna de discos perfurados rotativos (PRDC) usando sistema de duas fases aquosas PEG – fosfato. _____ 95

Figura 4.3.1.2 Influência da taxa de fluxo da fase dispersa (V_D) no coeficiente de transferência de massa (K_{Da}) para a extração contínua da toxina alfa produzida a partir de *Clostridium perfringens* tipo A em coluna de discos perfurados rotativos (PRDC) usando sistema de duas fases aquosas PEG – fosfato. _____ 96

Figura 4.3.1.3 Influência da taxa de fluxo da fase dispersa (V_D) na eficiência de separação (E_S) para a extração contínua da toxina alfa produzida a partir de *Clostridium perfringens* tipo A em coluna de discos perfurados rotativos (PRDC) usando sistema de duas fases aquosas PEG – fosfato. _____ 97

Figura 4.3.1.4 Influência da taxa de fluxo da fase dispersa (V_D) no fator de purificação (P_f) para a extração contínua da toxina alfa produzida a partir de *Clostridium perfringens* tipo A em coluna de discos perfurados rotativos (PRDC) usando sistema de duas fases aquosas PEG – fosfato. _____ 98

Figura 4.3.2.1 Influência da velocidade rotacional dos discos (rpm) no “hold up” (E_D) para a extração contínua da toxina alfa produzida a partir de *Clostridium perfringens* tipo A em coluna de discos perfurados rotativos (PRDC) usando sistema de duas fases aquosas PEG – fosfato. _____ 99

Figura 4.3.2.2 Influência da velocidade rotacional dos discos (rpm) no coeficiente de transferência de massa (K_{Da}) para a extração contínua da toxina alfa produzida a partir de *Clostridium perfringens* tipo A em coluna de discos perfurados rotativos (PRDC) usando sistema de duas fases aquosas PEG – fosfato. _____ 100

Figura 4.3.2.3 Influência da velocidade rotacional dos discos (rpm) na eficiência de separação (E_D) para a extração contínua da toxina alfa produzida a partir de *Clostridium perfringens* tipo A em coluna de discos perfurados rotativos (PRDC) usando sistema de duas fases aquosas PEG – fosfato. _____ 101

Figura 4.3.2.4 Influência da velocidade rotacional dos discos (rpm) no fator de purificação (P_f) para a extração contínua da toxina alfa produzida a partir de *Clostridium perfringens* tipo A em coluna de discos perfurados rotativos (PRDC) usando sistema de duas fases aquosas PEG – fosfato. _____ 102

Lista de Tabelas

Tabela 1.1.1. Classificação do *Clostridium perfringens* de acordo com a produção das principais toxinas (Cavalcanti et al., 2004) _____ 25

Tabela 1.2.5.1. Métodos de purificação utilizados para toxina alfa a partir de *Clostridium perfringens*. _____ 32

Tabela 2.2.6.1 – Níveis das 4 variáveis utilizados no primeiro planejamento experimental fracionário 2^{4-1} PEG/Fosfato/ toxina alfa. O número -1 representa o nível mínimo, o zero é o ponto central e o +1 representa o nível máximo. _____ 55

Tabela 2.2.6.2 – Níveis das 4 variáveis utilizados no segundo planejamento experimental fracionário 2^{4-1} PEG/Fosfato/ toxina alfa. O número -1 representa o nível mínimo, o zero é o ponto central e o +1 representa o nível máximo. _____ 55

Tabela 2.3.1.1 – Resultados obtidos no primeiro planejamento (2^{4-1}) da extração da toxina alfa em PEG/fosfato. _____ 59

Tabela 2.3.1.2 – Contrastes estimados para o primeiro planejamento experimental nas respostas coeficiente de partição (K), fator de purificação (P_f) e rendimentos (Y). 59

Tabela 2.3.2.1 – Resultados obtidos no segundo planejamento fracionário 2^{4-1} da extração da toxina alfa em PEG/fosfato. _____ 65

Tabela 2.3.2.2 – Contraste estimados para o segundo planejamento experimental nas respostas coeficiente de partição (K), fator de purificação (P_f) e rendimentos (Y). 65

Tabela 3.2.6.1 – Níveis das variáveis do planejamento experimental completo (2^2) usado para partição da toxina alfa em sistemas de duas fases aquosas PEG-fosfato. 75

Tabela 3.3.1 – Resultados do planejamento experimental completo (2^2) da extração da toxina alfa em sistema de duas fases aquosas PEG-fosfato. _____ 77

Tabela 3.3.2 – Contrastes estimados para coeficiente de partição (K), rendimento em atividade (Y) e fator de purificação (P_f), usando 2 fatores em 3 níveis. _____ 77

Tabela 4.2.5.1 Condições operacionais testadas para a extração contínua da toxina alfa produzida por *Clostridium perfringens* Tipo A em coluna de discos perfurados rotativos (PRDC) com 15% (m/m) PEG / 25% (m/m) fosfato (pH 8.0) SDFA. _____ 91

Lista de Abreviaturas

C_{Ci} = concentração inicial de proteína na fase contínua (mg/mL)

C_{Df} = concentração final de proteína na fase dispersa (mg/mL)

C_{Di} = concentração inicial de proteína na fase dispersa (mg/mL)

C_e = concentração de proteína na fase extratora (mg/mL)

C_{ef} = concentração final de proteína na fase extratora (mg/mL)

C_r = concentração de proteína na fase refinada (mg/mL)

C_{rf} = concentração final de proteína na fase refinada (mg/L)

C_C = concentração de proteína na fase contínua (mg/mL)

E_D = "hold up" da fase dispersa (adimensional)

E_S = Eficiência de separação (%)

K = Coeficiente de partição (adimensional)

K_{Da} = Coeficiente de transferência de massa (min^{-1})

V = Volume total do sistema de duas fases aquosas (mL)

V_T = Volume da fase topo (mL)

V_D = Velocidade da fase dispersa (mL/min)

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi à purificação da toxina alfa produzida por *Clostridium perfringens* tipo A em sistema de duas fases aquosas (SDFA) PEG/fosfato nos modos contínuo e descontínuo. Dois planejamentos fracionários seqüenciais foram aplicados para estudar a partição da toxina alfa em SDFA, em função de 4 variáveis: massa molar e concentração do PEG, concentração do fosfato e pH. Os melhores resultados para o fator de purificação, rendimento em atividade e coeficiente de partição foram obtidos com PEG 8000 g/mol (15%, w/w), fosfato 20% (w/w) e pH 8.0. Este sistema permitiu um fator de purificação de 4,6 com rendimento em atividade de 230% e coeficiente de partição de 113,9 na fase PEG. Após isto, novos experimentos foram realizados para aperfeiçoar a purificação da toxina alfa com o emprego de um planejamento experimental completo 2². Nesta pesquisa a concentração do PEG 8000 g/mol e sais de fosfato pH 8,0 foram variados. O coeficiente de partição, fator de purificação e rendimento em atividade foram fortemente influenciados por estas variáveis. Aumentando ambos os fatores estudados, foi observado um aumento nas respostas, com exceção para o fator de purificação. O melhor fator de purificação (5,7) foi obtido com 17,5% e 15% das concentrações de PEG e fosfato, respectivamente. A coluna de discos perfurados rotativos (PRDC) foi usada para extrair toxina alfa a partir do sobrenadante com (PEG) (MM = 8,000 g/mol) e solução de sais de fosfato de sódio e de potássio (pH 8.0). Os resultados obtidos demonstraram que a velocidade de fluxo da fase dispersa (V_D) de 3 mL/min foi a melhor condição para as respostas *hold up* ($E_D = 0,8$), eficiência de separação ($E_S = 100\%$) e fator de purificação ($P_f = 2,37$), pois os melhores resultados foram obtidos nesta taxa de fluxo usando uma velocidade de rotação dos discos baixa (35 rpm), enquanto o melhor coeficiente de transferência de massa ($K_{Da} = 2,8 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$) foi encontrado na maior velocidade de rotação usada (140 rpm).

ABSTRACT

The aim this work was purification alpha-toxin (phospholipase C) produced by *Clostridium perfringens* type A by aqueous two-phase systems (ATPS) PEG/phosphate in discontinue and continue mode. Two sequential half-fraction designs were applied to studying the α -toxin partition in ATPS, as a function of four factors: PEG molar mass and concentration, phosphate concentration and pH. The highest purification factor, yield and partition coefficient results were obtained with PEG 8000 (15%, w/w), phosphate at 20% (w/w) and pH 8.0. This system allows an α -toxin purification of 4.6 fold with final activity yield of 230 % and partition coefficient of 113.9 in the PEG rich phase. After this, new experiments were realized for the optimization of α -toxin purification with employed of full experimental design. In this research the concentration of PEG 8000 g/mol and phosphate salts pH 8.0 were varied. The partition coefficient (K), purification factor (P_f) and activity yield (Y%) were strongly influenced for these variables. Increasing both factors was observed an increase of these responses, except for P_f . The higher purification factor (5.7) was obtained with 17.5% and 15% of the PEG and phosphate concentration, respectively. A continuous perforated rotating disc contactor (PRDC) was used for extraction of α -toxin from the supernatant of *Clostridium perfringens* type A cultivations with polyethylene glycol (PEG) (MW = 8,000 g/mol) and dipotassium and sodium phosphate salt solution (pH 8.0). The results obtained demonstrated that $V_D = 3$ mL/min was by far the optimum dispersed phase flowrate for all these response variables. Besides, maximum values of E_D (0.8), E_S (100 %) and P_f (2.37) were obtained at this flowrate using the lowest rotational speed (35 rpm), while optimum K_{Da} ($2.8 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$) was achieved at the highest agitation level (140 rpm).

INTRODUÇÃO

A purificação de produtos biotecnológicos produzidos por células microbianas ou células animais constitui etapa complexa do processo, dadas às variadas características dos meios e da biomolécula de interesse, como ácidos orgânicos, antibióticos, polissacarídeos, hormônios, aminoácidos, peptídeos e proteínas (Pessoa Jr; Kilikian, 2005).

As etapas de purificação são tão ou mais desafiantes que o estudo e o desenvolvimento da etapa de cultivo, pois não há processo de purificação de aplicação geral (Pessoa Jr; Kilikian, 2005).

É cada vez mais aparente que o sucesso comercial de um novo produto biotecnológico depende fortemente da recuperação primária nos passos de purificação. Além disso, a implantação nas indústrias em geral de novos processos biotecnológicos, depende da redução do tempo necessário para o aumento da escala e a transferência da tecnologia para a indústria farmacêutica (Rito-Palomares, 2004; Benevides; Rito-Palomares, 2004).

Uma promissora técnica de extração e purificação, que se enquadra nestes critérios, e já vem sendo utilizada industrialmente, envolve a partição de biomoléculas entre duas ou mais fases imiscíveis nos sistemas aquosos (Rito-Palomares, 2004). A grande versatilidade dos sistemas de duas fases aquosas na manipulação de parâmetros que podem direcionar a separação das biomoléculas e a possibilidade da utilização nos

modos descontínuo e contínuo tem atraído vários pesquisadores para o uso desta metodologia (Mayerhoff; Roberto; Franco, 2004; Igarashi; Kieckbusch; Franco, 2004).

A extração líquido-líquido realizada de modo contínuo através do uso de colunas ou contactores tem sido sugerida por vários autores (Westerterp; Landsman, 1962; Tambourgi; Pereira, 1993; Srinivas; Narayan; Raghavarao, 2002; Igarashi; Kieckbusch; Franco, 2004), visto que a utilização de colunas em processos industriais é necessária para evitar o uso de centrífugas na separação das fases (Srinivas; Narayan; Raghavarao, 2002).

A coluna com discos perfurados rotativos para extração de proteínas em sistema de duas fases aquosas apresenta vantagens, tais como sua fácil construção e o baixo custo operacional, sendo por isso sugerida como uma alternativa para realização de extração em modo contínuo (Tambourgi; Pereira, 1993; Coimbra; Mojola; Meirelles, 1998; Porto et al. 2000; Sarubbo et al. 2003; Porto et al. 2004; Sarubbo et al. 2004).

O *Clostridium perfringens* é uma bactéria anaeróbia, grande produtora de toxinas, dentre elas a toxina alfa (fosfolipase C), responsável por graves patologias humanas e animais. Esta toxina está associada à gangrena gasosa em humanos e animais, doenças inflamatórias, como a doença de "Chron" em humanos, doenças não gangrenosa como as enterites em animais domésticos (Titball; Naylor; Basak, 1999; Flores-Díaz et al. 2004).

A toxina alfa está envolvida em vários processos patológicos, por isso a produção de vacinas torna-se necessária para minimizar os custos com o tratamento destas doenças. Tem sido relatada, a utilização de uma vacina preparada com fermentado

bruto filtrado obtido a partir do cultivo de *Clostridium perfringens* tipo A, que é o maior produtor desta toxina. Entretanto foram observados problemas com a presença de metabólitos contaminantes as quais diminuem o poder imunogênico desta vacina (Titball; Naylor; Basak, 1999).

Em virtude da presença destes metabólitos contaminantes produzidos pela bactéria, a proposta deste trabalho é estudar a purificação da toxina de modo descontínuo e contínuo, usando sistema de duas fases aquosas utilizando PEG-Fosfato, para que possamos obter uma toxina mais pura e contribuindo para o melhoramento da qualidade imunogênica da vacina.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Purificar a toxina alfa obtida a partir do cultivo de *Clostridium perfringens* tipo A por extração em sistemas de duas fases aquosas utilizando PEG-Fosfato de modo descontínuo e contínuo utilizando coluna de discos perfurados rotativos.

Objetivos específicos

- Determinar as melhores condições no sistema de duas fases aquosas para extração da toxina alfa de modo descontínuo, através da avaliação dos seguintes fatores: pH; massa molar do PEG; concentrações do PEG e dos sais de fosfato, utilizando planejamento experimental estatístico.
- Avaliar o desempenho de uma coluna com discos perfurados rotativos na extração da toxina alfa utilizando sistema de duas fases aquosas através de um planejamento experimental estatístico.
- Determinar o coeficiente de partição, fator de purificação e recuperação da toxina alfa extraída de modo descontínuo e contínuo.
- Determinar o “hold up” e o coeficiente de transferência de massa.

Capítulo I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. 1 – *Clostridium perfringens*

Clostridium perfringens é uma bactéria Gram-positiva (Figura 1.1.1), anaeróbia, amplamente distribuída no meio ambiente, normalmente está presente em grande quantidade no solo, em matéria orgânica em decomposição e em conteúdo intestinal de animais e de humanos (Petit; Gibert; Popoff, 1999).

O *C. perfringens* é considerado o maior produtor de toxinas bacterianas conhecidas, apresentando um total de 14 toxinas. As quatro mais importantes são: alfa, beta, épsilon e iota, responsáveis pela classificação dos tipos de *C. perfringens*; 9 são consideradas toxinas menores ou antígenos solúveis, que podem ou não ter importância na patogenicidade, são elas: delta (δ), teta (θ), kapa (κ) (colagenase), lambda (λ) (protease), mu(μ) (hialuronidase), nu(η) (deoxiribonuclease), gama(γ), eta(ξ), neuraminidase; e ainda produz a enterotoxina (CPE), que é responsável por doenças alimentares. Este microrganismo é classificado em 5 tipos denominados A, B, C, D, E, de acordo com a produção das 4 mais importantes do ponto de vista patológico, toxinas alfa, beta, épsilon e iota (McDonel, 1986; Hatheway; Whaley; Dowell, 1990), como descrito na Tabela 01.

O *C. perfringens* tipo A é comumente encontrado em amostras de solo e conteúdos intestinais de humanos e outros animais, mesmo na ausência de doença. Sua habilidade de produzir endosporos altamente resistentes permite sua sobrevivência no

meio ambiente por muito tempo. Os tipos B, C, D, E não sobrevivem no solo, pois são parasitas obrigatórios, sendo encontrados no trato intestinal dos animais domésticos e ocasionalmente em humanos associados com doença (Hatheway; Whaley; Dowell, 1990).

Todos os tipos de *Clostridium perfringens* possuem o gene que codifica a toxina alfa, entretanto o maior produtor é o tipo A, estirpe mais associada com seres humanos (Petit; Gibert; Popoff, 1999).

TABELA 1.1.1. Classificação do *Clostridium perfringens* de acordo com a produção das principais toxinas (Cavalcanti et al. 2004).

Tipos	Principais toxinas				Toxinas secundárias			
	Alfa(α)	Beta(β)	Epsílon(ϵ)	Iota(ι)	CPE	λ	θ	δ
A	++	-	-	-	+	-	+	-
B	+	+	+	-	+	+	-	+
C	+	+	-	-	+	-	-	+
D	+	-	+	-	+	+	-	-
E	+	-	-	+	+	+	-	-

Produção negativa da toxina (-), produção positiva da toxina (+), grande produção da toxina (++).

Figura 1.1.1 – Lâmina de coloração de Gram mostrando a forma do *Clostridium perfringens*.

As clostridioses são grupos de doenças causadas pelas espécies de *Clostridium* que mais matam bovinos no Brasil. Anualmente as perdas chegam a mais de 400 mil animais, com prejuízos diretos em torno de 1,1 bilhões de reais. Impossíveis de serem erradicadas exigem, sobretudo, o seu reconhecimento e a adoção de medidas preventivas, incluindo a vacinação específica. Para se ter uma idéia do reconhecimento do problema por parte dos produtores é só verificar a comercialização de vacinas, que totalizam mais de 150 milhões de doses por ano. Vale ressaltar que a vacinação contra as diferentes clostridioses é voluntária e não faz parte de nenhum programa oficial de controle, uma vez que se trata de doenças que não interferem na pauta de exportações (Amorim, 2000).

O controle e a profilaxia da infecção devem basear-se em medidas adequadas de manejo e principalmente na vacinação de todo o rebanho com imunógenos eficientes, já que os animais estão em permanente contato com os agentes e com os fatores que poderão desencadear as enfermidades (Lobato et al. 2000).

1.2 – Toxina alfa (fosfolipase C)

1.2.1 – Histórico

A toxina alfa foi a primeira toxina bacteriana a ser identificada como enzima por Nalger (1939) e Seiffert (1939), mas seu mecanismo de ação só foi definido 2 anos após por MacFarlane e Knight (1941), como uma fosfolipase C (E. C. 3. 1. 4. 3). É reconhecida como a mais tóxica entre as fosfolipase C bacterianas conhecidas (Titball Hatheway; Whaley; Dowell, 1999).

Durante a segunda guerra mundial, o *Clostridium perfringens* tipo A, maior produtor de toxina alfa, ganhou notoriedade por ser a principal causa da gangrena gasosa observada nos soldados feridos no campo de batalha (MacDowell, 1986). Em tempos de paz, esta doença é raramente observada, por isso o estudo da toxina alfa está relacionado ao conhecimento da participação desta toxina em uma variedade de doenças não gangrenosas (Hatherway; Whaley; Dowell, 1990), além de sua capacidade de lesar membranas celulares em diferentes graus (Macdonel, 1986; Flores-Díaz; Alape-Girón, 2003; Ochi et al. 2003; Ochi et al. 2004; Flores-Díaz et al. 2004).

1.2.2 – Estrutura e propriedades físico-químicas

A toxina alfa possui massa molar de 43 kDa e ponto isoelétrico 5,4 (Jolivet – Reynaud et al. 1988). Ela é uma metalo-enzima zinco dependente, composta de 370 resíduos de aminoácidos e sua estrutura tridimensional (apresentada na Figura 1.2.2.1), mostra dois domínios unidos por uma região flexível curta. Seu domínio N-terminal (resíduo 1 – 246) consiste de nove voltas em alfa-hélice e contém um sítio ativo em forma de fenda. Seu domínio C-terminal (resíduo 246-370) consiste de oito folhas beta antiparalelas, ligadas a moléculas de cálcio, que estão localizadas na superfície de interação da toxina e interagem com as cabeças polares dos fosfolipídios possuindo papel importante na interação substrato-enzima (Guillouard et al. 1997). Esta enzima apresenta dois principais substratos: esfigomielina e fosfatidilcolina.

Os estudos de cristalografia revelaram que na toxina alfa existem duas conformações: uma forma ativa aberta e outra forma inativa fechada. Na forma ativa três íons Zinco estão ligados e o sítio ativo está acessível. Na forma inativa existem apenas dois íons Zinco ligados e o sítio ativo está indisponível (Eaton et al. 2002; Flores-Diaz et al. 2004).

Figura 1.2.2.1 – Estrutura da toxina alfa mostrando seus domínios N e C terminais, região flexível ligando os dois domínios e locais de fixação dos íons Zn e Ca.

1.2.3 – Mecanismo de ação

Seu mecanismo de ação foi descrito por MacFarlane e Knight (1941) como uma fosfolipase C (E. C. 3. 1. 4. 3) que catalisa a hidrólise da ligação fosfodiéster na posição 3 da molécula de lecitina, produzindo o fosforilcolina e 1,2 diaciglicerol (DAG) (MacDonel, 1986).

Diversos eventos “in vivo” associados com a toxina alfa são dependentes da liberação do 1,2 diacilglicerol (DAG) produzido na membrana, que interage com a proteína quinase C levando à estimulação e liberação de fosfolipases endógenas e ativação da cascada do ácido araquidônico. Desta forma induzem a síntese e liberação de mediadores inflamatórios como os leucotrienos, tromboxanos, fator agregador de plaquetas e prostaciclina (Titbal, 1993; Ochi et al. 1996; Bunting et al. 1997). Isto resulta na contração do vaso sanguíneo, aumento da permeabilidade vascular,

agregação plaquetária e disfunção miocárdica. Todos estes mecanismos contribuem para as manifestações clínicas sistêmicas e locais, caracterizadas por choque profundo e morte (Petit; Gibert; Popoff, 1999; Tittball; Naylor; Basak, 1999; Jepson et al. 2001).

1.2.4 – Doenças relacionadas com a toxina alfa

Alguns autores têm sugerido a participação desta toxina em doenças animais e humanas (Baba et al. 1992; Cygan; Buczek, 1993; Johannsen et al. 1993; Murrell et al. 1993).

Uma das doenças que tem sido associada à toxina alfa é a enterite necrótica em galinhas (Baba et al. 1992; Long; Truscott, 1976), em bezerros (Cygan; Buczek, 1993) e em suínos (Johannsen et al. 1993).

Em humanos a toxina está sendo implicada como responsável pela síndrome mortal infantil do Sudão (Murrell et al. 1993; Siarakas; Damas; Murrell, 1997) e doenças inflamatórias como a doença de *Crohn's* (Gustafson; Sjobahl; Tagesson, 1990). A gangrena gasosa é principal doença causada pela toxina alfa, que se caracteriza por febre, edema maciço no local, severa mionecrose e acúmulo de gás no sitio da infecção (Flores-Díaz; Alape Girón, 2004).

1.2.5 – Purificação da toxina alfa

A bactéria *Clostridium perfringens* produz diferentes tipos de proteínas com atividade biológica, entre elas está a toxina alfa. Devido à grande complexidade de componentes, a purificação de uma proteína específica no meio de cultura se torna um

trabalho laborioso. Vários métodos para purificação da toxina alfa têm sido propostos. Eles incluem principalmente procedimentos clássicos ou convencionais tais como: precipitação com sais ou solventes orgânicos, eletroforese, cromatografia em gel de filtração, adsorção ou troca iônica (Cavalcanti et al. 2004). Entretanto, a maioria desses métodos é demorado e inviável do ponto de vista industrial, por isso se faz necessária a busca por novas estratégias de purificação da toxina alfa, tornando-a de interesse como toxóide para produção de vacinas mais barata.

Tabela 1.2.5.1. Métodos de purificação utilizados para toxina alfa a partir de *Clostridium perfringens*.

Método	Procedimento	Fator de purificação	Vantagens	Desvantagens
1	Ultrafiltração com alta pressão, eletroforese e imunoeletroforese	-	Boa pureza	Não pode ser usada em escala industrial.
2	Cromatografia em DEAE-sephadex A-25, sephadex G75 e focalização isoeletrica.	200	Boa pureza	Longo tempo, principalmente em escala industrial.
3	Cromatografia de afinidade, sephadex G100 e focalização isoeletrica.	200	Boa pureza	Longo tempo, principalmente em escala industrial.
4	Ultrafiltração, precipitação com acetato de cálcio, cromatografia CM-sephadex, DEAE-sephadex, sephadex G100.	15,5		Não pode ser usado em escala industrial.
5	Precipitação com sulfato de amônio e acetona, cromatografia em gel de filtração.	12,7	Fácil e relativamente rápido	Baixo fator de purificação.
6	Ultrafiltração com Amicon XM-50, cromatografia em gel de filtração.	200	De fácil execução, menos trabalhoso e menor tempo.	Alto custo
7	Ultrafiltração com filtro Millipore PSED OHV 10 e Amicon XM-100, cromatografia em gel de filtração.	305	De fácil execução, menos trabalhoso e menor tempo.	Alto custo
8	Ultrafiltração com Amicon XM-100, cromatografia em gel de filtração.	24	De fácil execução, menos trabalhoso e menor tempo.	Baixo fator de purificação

1. 3 – Sistemas de duas fases aquosas (SDFA)

1.3.1 – Considerações Gerais

A extração líquido-líquido utilizando sistema de duas fases aquosas foi primeiramente descrita na literatura pelo microbiologista alemão Beijerinck (1896), o qual descobriu que gelatina (ou amido), ágar e água misturada a certas concentrações formavam um sistema de duas fases, sendo a fase superior rica em gelatina e a inferior, rica em agar (Diamond; Hsu, 1992).

Nos anos 1950, Per-Ake Albertsson descobriu que o polietileno glicol (PEG), fosfato de potássio e água, e assim como o PEG, Dextrana e água também formavam sistemas de duas fases. Os sistemas PEG/Dextrana/Água e PEG/Sal/Água têm sido, desde então, os mais freqüentemente investigados e utilizados para purificação de um grande número de biomoléculas (Diamond; Hsu, 1992). Nos últimos anos, o estudo com novos sistemas que utilizam polímero – polímero, como PEG – poliacaju (Sarubo et al. 2003), e polímero – sal, como PEG – citrato, tem sido realizado (Marcos et al. 2002).

Foi Albertsson que reconheceu a possível utilização destes sistemas como método de separação aplicado a biomacromoléculas, partículas celulares e células sob condições que preservassem sua atividade biológica, estabelecendo um grande número de diagramas de fase de vários sistemas de duas fases aquosas, descrevendo também as suas propriedades físico-químicas básicas (Diamond; Hsu, 1992).

A separação em sistemas de duas fases aquosas apresenta vantagens sob os métodos convencionais de purificação que utilizam água – solvente orgânico. Formando um meio adequado para purificação de biomaterias. A tensão interfacial é

extremamente baixa, quando se compara com sistema solvente orgânico – água, criando uma grande área de contato interfacial promovendo uma eficiente transferência de massa (Hatti-Kaul, 2001).

Os sistemas de duas fases aquosas são fáceis de usar, pois envolvem apenas duas operações: equilíbrio e separação de fases. O equilíbrio é rápido, envolvendo a mistura dos componentes que fazem parte do sistema e também do material a ser extraído. Após dispersão das fases, o equilíbrio é obtido por sedimentação ou centrifugação e em seguida as fases são separadas (Hatti-Kaul, 2001).

A partição de proteínas em sistemas de duas fases aquosas depende principalmente das propriedades físico-químicas da proteína, tais como: ponto isoelétrico, hidrofobicidade superficial, massa molar e outras variáveis do sistema como: massa molar do polímero, pH, adição de diversos tipos de sais e suas concentrações. Controlando esses fatores, podemos tornar a partição mais seletiva e a recuperação da molécula alvo pode ser esperada (Tubio; Nerli; Picó, 2004).

O sistema de duas fases aquosas é usado para purificar proteínas porque oferece as seguintes vantagens: é um ambiente adequado para produtos biologicamente ativos, simplicidade na execução, facilidade no aumento da escala; possibilidade de trabalhar com sólidos particulados (ex: restos celulares), manipulação dos parâmetros que envolvem a partição das moléculas, operação rápida e seletiva, transferência de massa eficiente, utilização da temperatura ambiente e método econômico (Zhang et al. 2005).

Nos últimos anos, o interesse pela extração em sistema de duas fases aquosas tem aumentado devida sua aplicação na separação e purificação de proteínas e enzimas

tais como: ricina B (Zhang et al. 2005), xilose redutase (Mayerhoff et al. 2004), fosfolipase D (Teotia e Gupta, 2004); corantes: ficoeritrina B (Benavides; Rito-Palomares, 2004), luteína (Cisneros et al. 2004) e policetideos (Esmanhoto; Kilikian, 2004)

1.3.2 – Diagrama de fases

O diagrama de fases delimita a possível área de formação para um sistema de duas fases aquosas em particular. As informações que podem ser extraídas a partir de um diagrama incluem: a concentração dos componentes necessária para formar as fases em equilíbrio de um sistema, a concentração dos componentes das fases: inferior e superior (Kaul, 2000).

A curva binodal presente no diagrama de fase é uma linha que divide a região da concentração dos componentes que formam duas fases aquosas imiscíveis (acima da curva = região bifásica) e aquela em que só existe uma fase (abaixo da curva = região monofásica) (Figura 1.3.2.1).

Para iniciar o estudo baseado em sistemas bifásicos é importante a construção de curvas binodais nas condições a serem utilizadas nos experimentos, garantindo maior segurança nos experimentos (Kaul, 2000).

Figura 1.3.2.1 – Exemplo de diagrama de fases de um sistema PEG-sal.

No diagrama de fases, a composição dos sistemas é expressa em porcentagem de massa (%m/m), a razão entre a massa do polímero na fase superior e a massa do sal na fase inferior (Esmanhoto, 2002).

A curvatura e posição da curva binodal podem ser influenciadas pela massa molar, tipo e concentração do polímero, temperatura, adição de sais, pH, (Kaul, 2000; Oliveira et al. 2001; Rito-Palomares; Cueto, 2000). Além desses fatores, a curva binodal pode ser deslocada em relação à sua origem pela presença de proteínas solúveis e suspensões biológicas (restos celulares), fato este observado por Rito-Palomares e Cueto (2000).

1.3.3 – Fatores que influenciam a partição de biomoléculas

A aplicação biotecnológica do sistema de duas fases aquosas (SFDA) está influenciada pela habilidade de proporcionar o desenvolvimento de modelos e

correlações que permitam compreender como ocorre a interação entre as propriedades físico-químicas das proteínas e do polímero e do sal na partição nestes sistemas (Oliveira – Nappa et al. 2004).

As principais características das proteínas que interferem na partição são: hidrofobicidade, massa molar, cargas elétricas, conformação molecular e bioespecificidade. As condições de formação do sistema também influenciam na partição, são eles: tipo do polímero e do sal, pH massa molar do polímero, concentração do polímero e do sal (Lin et al. 2003, Farrugia et al. 2004).

1.3.3.1 – Massa molar do polímero

Em geral, o aumento da massa molar do polímero do sistema de duas fases aquosas em uma determinada composição de fases, diminui a partição de material biológico para a fase rica em polímero. Quanto maior for a massa molar do polímero, menor é o volume de solvente disponível, o que implica em uma diminuição de solubilidade das proteínas na fase rica em polímero e conseqüentemente uma diminuição do coeficiente de partição (Albertsson, 1986). Este fenômeno de volume excluído, observado com freqüência em sistemas PEG/sal, tem sido visto em sistema polímero/polímero no qual o PEG faz parte de uma das fases (Li et al. 2003; Tubio; Nerli; Picó, 2004).

Além desse efeito, a massa molar do PEG participa da interação hidrofóbica, em que o aumento da massa molar proporciona um aumento na capacidade de interação com proteínas hidrofóbicas. Aparentemente, isto é independente do volume excluído,

pois PEG com grande massa molar possui a capacidade de formar ligações intramoleculares (dentro da molécula do PEG), assim adquirindo uma conformação mais compacta (Tubio; Nerli; Picó, 2004; Farrugia; Nerli; Picó, 2003).

1.3.3.2 – Concentração do polímero

Próximo ao ponto crítico do sistema, moléculas como proteínas se particionam quase igualmente entre as fases. Se a concentração do polímero é aumentada, ou seja, a composição das fases do sistema distancia do ponto crítico, a partição da proteína terá preferência por uma das fases dependendo das características da biomolécula (Diamond; Hsu, 1992). A concentração do polímero tem sido relatada como um dos fatores que influenciam a partição de proteínas em sistemas de duas fases aquosas, principalmente em sistemas PEG/sal (Cascone; Andrews; Asenjo, 1991; Li et al. 2001). Por isto tem sido usada como variável de estudo (Esmanhoto; Kilikian, 2004; Li et al. 2001; Cisneiros et al. 2004; Benvides; Rito – Palomares, 2004).

1.3.3.3 – Concentração do sal (fosfato)

Os sais causam mudança na carga eletrostática do SDFA e influenciam na distribuição de aminoácidos e proteínas carregadas (Shang et al. 2004). Geralmente, os íons fosfato vão para a fase inferior (ex. fases dextrana ou sais), que apresenta maior carga negativa do que a fase superior (ex. fase PEG)(Han; Lee, 1997). A maioria das proteínas com ponto isoelétrico na região ácida é carregada negativamente na região de pH neutro, por isso se direcionam para a fase superior e o coeficiente de partição

aumenta ao redor do pH 7 (Han; Lee, 1997). Um aumento da concentração de fosfato direciona proteínas carregadas negativamente para a fase PEG, devido à força de repulsão causada pelos ânions. Este fenômeno foi observado por Han e Lee (1997), quando estudaram a partição de albumina bovina sérica em PEG-fosfato SDFA. Eles observaram também que a protease neutra produzida por *Bacillus subtilis* se direcionou para a fase sal nos sistemas com alta concentração de fosfato por causa da sua carga positiva a pH neutro.

1.3.3.4 – Influência do pH

De maneira geral, proteínas carregadas negativamente preferem à fase rica em PEG e as carregadas positivamente à fase rica em sal. Com o aumento do pH acima do ponto isoelétrico da proteína, a sua carga fica negativa e o coeficiente de partição aumenta (Engel et al. 2000). A mudança no pH pode resultar na exposição de resíduos hidrofóbicos da proteína no solvente e como consequência uma partição preferencial para a fase PEG (Fernandez – Lahore et al. 1995). Além disso, um aumento na concentração do íon mais carregado negativamente pode aumentar a força de repulsão entre a fase inferior rica em sal e a proteína (Shang et al. 2004). A redução do valor do pH desloca a curva de equilíbrio significativamente para a direita no diagrama de fase. Assim, as concentrações para a formação de duas fases líquidas, em um sistema polímero – sal, por exemplo, PEG – Sal, aumentam. Esse fato pode ser explicado, para o caso do fosfato, pelo aumento da razão $\text{H}_2\text{PO}_4 / \text{HPO}_4^{-2}$, com a redução do pH, a relação aumenta e o ânion monovalente é menos efetivo para exercer o efeito de salting

out sobre o PEG (fenômeno de expulsão decorrente do tamanho do PEG), será necessária uma concentração maior para a formação de duas fases. Quanto ao tipo de cátion, observa-se que a substituição de fosfato de sódio por fosfato de potássio desloca a curva de equilíbrio para direita, portanto a concentração dos componentes necessária à formação do SDFA aumenta (Pessoa Jr; Kilikian, 2005).

1.3.3.5 – Adição de sais

O efeito do tipo e da concentração do sal na partição de proteínas em sistemas de duas fases aquosas é bem conhecido (Forciniti, 2000). É mais atuante em sistema polímero/polímero, pois a adição de sais, mesmo que em concentrações milimolares, influencia fortemente a partição de materiais eletricamente carregados. Embora os sais se distribuam quase que igualmente entre as fases, existem pequenas, mas significantes diferenças nos coeficientes de partição em diferentes sais, o que significa que diferentes íons possuem diferentes afinidades pelas fases, criando uma diferença de potencial elétrico entre as fases, que por sua vez direciona a partição de materiais biológicos carregados (Sarubbo, 2000). Gunduz (2000) relatou a importância das interações específicas entre o sal e proteínas e da diferença de potencial formada pelo sal na partição de proteínas, além disso, diferentes sais afetam a estrutura da água e as interações hidrofóbicas entre proteína e PEG.

Em sistemas PEG/sal, a adição de outros sais interfere no coeficiente de partição, pois existe uma partição desigual entre eles, formando uma diferença de potencial elétrico. Além disso, cátions como o Rb^+ , Cs^+ e Na^+ se direcionam para a fase

PEG, carregando proteínas hidrofóbicas para a fase PEG, como observado por Farrugia et al. (2004). Eles ressaltaram a importância da concentração de sais no direcionamento de proteínas como albumina bovina sérica, ovoalbumina, lisozima, tripsina para a fase PEG. E observaram que um aumento na concentração dos sais promove diminuição do efeito de volume excluído, devido à perda de água ligada ao polímero. Vale salientar que estes fenômenos foram visto em baixas concentrações de sais, pois existe o efeito de saturação.

1.3.4 – Modelos teóricos

Diversos modelos teóricos têm sido propostos para explicar a termodinâmica da partição das proteínas em SDFA. Entretanto, isto não é uma tarefa fácil, pois deveríamos projetar experimentos que evitassem variáveis confundidas ou modelos teóricos que incluíssem todas as interações relevantes ao processo de partição (Lin et al., 2003).

Diamond e Hsu (1992) apresentaram um modelo linear simples semi-logarítmico que correlaciona a partição de biomoléculas com respeito a diferentes concentrações de PEG entre as fases. Este modelo provou ser adequado para partição de proteínas com baixa massa molar e dipeptídeos.

Após estudos relacionando os efeitos das características encontradas nas proteínas e sua partição, tem sido sugerido que o principal determinante da partição em PEG-sal é a hidrofobicidade (Andrews; Nielsen; Asenjo, 1996).

Estudos recentes correlacionam massa molar do PEG, concentração do PEG e do sal na partição da proteína. Eles encontraram que o efeito do volume excluído é mais importante do que o efeito da hidrofobicidade, mas ambos estão interagindo (Farrugia; Nerli; Pico, 2003; Farrugia et al. 2004).

A teoria do volume excluído é uma teoria de arranjo molecular e interação do polímero – proteína, que está baseada na equação de Florin-Huggins, que é usada para descrever soluções de polímeros não-ideais (Johansson et al. 1998). Entretanto, o papel da água que faz parte das duas fases nestes sistemas não tem sido considerado como participante da partição de proteínas. Farrugia; Nerli e Picó (2004) explicam a importância da água na interação PEG-proteína.

Outro modelo recentemente descrito por Pessoa Filho e Mohamed (2004), propõe uma equação baseada na equação de Florin-Huggins com uma modificação para acomodar a hidratação das moléculas dos polímeros. Desta forma tenta incluir o papel da água na partição de proteínas em SDFA.

Existe uma variedade de teorias e modelos, mas ainda não se chegou a um consenso sobre qual é o melhor modelo para prever a partição de determinada proteína. Apesar disto, o avanço neste campo da pesquisa em sistema de suas fases aquosas é notório, com várias publicações recentes que nos falam de equações mais aprimoradas do que as antigamente conhecidas (Pessoa Filho; Mohamed, 2004; Haghtalab; Mokhtarani, 2004; Xu et al. 2004; Haghtalab; Mokhtarani, 2005). O que se tem certeza é o que alguns fatores, como hidratação do PEG e hidrofobicidade, interferem na partição, só falta concluir como e para quais tipos de proteínas isso é válido.

1.3.5 – Aplicação em grande escala

Existe interesse considerável dos fabricantes de produtos biológicos em encontrar processos de integração entre as operações de fermentação (*upstream*) e de recuperação (*downstream*) para facilitar o desenvolvimento de bioprocessos eficientes. Estes bioprocessos necessitam apresentar alto rendimento do produto em estado adequado para operações de validação, acabamento, formulação e distribuição. Neste contexto, a aplicação do sistema de duas fases aquosas em processo de integração representa uma alternativa atraente para recuperação de produtos em 3 grandes áreas: bioconversão extrativa, fermentação extrativa e purificação primária em caldos fermentados (Rito – Palomares, 2004).

A purificação primária de proteínas a partir de caldos fermentados em grande escala utilizando sistema de duas fases aquosas requer um processo em contracorrente contínuo. Este modo de operação pode reduzir custos fixos e variáveis, diminuir o tempo, manutenção de alto nível de recuperação de proteína e permitir automatização do processo e reciclagem dos compostos químicos usados (Sarubbo et al. 2003).

1.3.6 – Equipamentos para extração utilizando sistemas de duas fases aquosas

Os equipamentos usados para extração líquido-líquido podem ser aplicados em processos extrativos com o sistema de duas fases aquosas (Giraldo-Zuninga et al. 2005).

Existem vários tipos de colunas descritas na literatura que estão sendo utilizadas com o sistema de duas fases aquosas, tais como: spray (Srinivas; Narayan; Rahavarao,

2002), Graesser (Giraldo-Zuninga et al. 2005a e 2005b), coluna empacotada (Igarashi et al. 2004), York-scheibel (Jabarabad et al. 1992), Colunas de discos perfurados rotativos (PRDC) (Tambourgi; Pereira, 1993; Porto et al. 2000; Sarubbo et al. 2003; Cunha et al. 2003; Porto et al. 2004; Sarubbo et al. 2004). Em todos eles é de fundamental importância o estudo da transferência de massa, fenômeno definido como o transporte de um constituinte de uma região de maior concentração para outra de menor concentração, até que o sistema entre em equilíbrio. O estudo da transferência de massa visa avaliar o quanto o sistema se aproxima do equilíbrio. Com isso podem-se definir um limite ideal de operação para o extrator (Sarubbo, 2000).

Nos equipamentos de extração líquido-líquido, em sistema contracorrente, a transferência de massa ocorre numa dispersão de gotas que fluem pela ação da gravidade através da fase líquida contínua, sendo a coluna de discos rotativos um exemplo destes equipamentos (Sarubbo, 2000).

Em colunas de discos perfurados rotativos, o coeficiente global de transferência de massa pode ser determinado pela equação 1:

$$K_{Da} = \left(\frac{V_{Df}}{V} \right) \ln \left[\frac{(C_{Di} - KC_C)}{(C_{Df} - KC_C)} \right] \quad (1)$$

Esta equação foi descrita por Pawar e colaboradores (1997).

Onde, o V_{Df} é a taxa de fluxo da fase dispersa (mL/min), V é o volume total do sistema (mL), C_{Di} e C_{Df} são as concentrações de proteína iniciais e finais da fase dispersa (mg/mL), K é o coeficiente de partição, C_C é a concentração de proteína na fase contínua (mg/mL) e K_{Da} é o coeficiente de transferência de massa da fase dispersa (min^{-1}).

Num processo de extração, existem diversos fatores que influenciam o desempenho do extrator, principalmente em escala industrial. Durante o processo vários fenômenos acontecem no interior do extrator, alguns dos quais prejudicam a transferência de massa. Os mais conhecidos estão definidos abaixo:

- "Hold up": é a fração retida da fase dispersa, que é a razão do volume da fase dispersa pelo volume total do equipamento;
- Inundação: quando as condições de operação na coluna fazem com que seja impossível o escoamento em contracorrente, e uma fase se dispersa na outra. Nesta situação as correntes entram e saem da coluna numa mesma extremidade;
- "Backmixing" (mistura axial): é o retorno axial da fase dispersa. A fase dispersa escoar em sentido oposto ao esperado. Ele faz com que o gradiente de concentração, que é a força motriz da transferência de massa na coluna, diminua, prejudicando a taxa de transferência de massa e a eficiência de separação;
- "Backflow": é o retorno axial da fase contínua. Ocorre quando a fase contínua é carregada na direção oposta à esperada.

1.3.7 – Coluna de discos perfurados rotativos (PRDC)

Com a finalidade de melhorar a transferência de massa, aumentando a área interfacial entre as fases e diminuindo o tamanho das gotas tem-se recorrido a colunas mecanicamente agitadas. Entre esses tipos de coluna estão as colunas de discos

rotativos (RDC), que foram primeiramente sugeridos por Reman em 1951. A coluna de disco rotativo é um equipamento utilizado para extração contínua em contracorrente.

Em 1971, Pope e Shah apresentaram a coluna de discos perfurados rotativos (PRDC) que era similar à coluna de discos rotativos proposta anteriormente por Reman, com a diferença nas perfurações nos discos. Esta modificação promoveu um aumento nas taxas de transferência de massa e na eficiência da coluna como foi relatado pelos autores. Desde então a PRDC tem sido usada na extração líquido-líquido.

Tambourgi e Pereira (1993) utilizaram o sistema ácido acético-butanol-água e relataram os resultados obtidos com uma coluna PRDC. Carneiro-Da-Cunha et al. (1994) utilizaram uma coluna PRDC para extração de cutinase recombinante com sistemas de micelas reversas. Os resultados proporcionaram um rendimento de extração 78% em proteína. Porto et al. (1997) utilizaram uma coluna PRDC para extração do citocromo b5 recombinante com sistema PEG-fosfato, obtiveram um rendimento de 75% em proteína. Coimbra et al. (1998) estudaram a fração retida da fase dispersa ("hold up") em uma coluna PRDC com sistema PEG-fosfato, eles observaram que o hold up aumentava com a elevação da velocidade dos discos e da taxa de fluxo das fases. Porto et al. (2000) avaliaram a transferência de massa e fração retida da fase dispersa ("hold up") para albumina de soro bovino em uma coluna PRDC com sistema PEG-fosfato, observaram a influência da velocidade da fase PEG no aumento do hold up. Sarubbo et al. (2003) utilizaram um novo sistema de duas fases aquosas PEG-policaजू em uma coluna PRDC para extração de albumina de soro bovino, observaram a interação do coeficiente de transferência de massa com a velocidade da fase dispersa e

dos discos perfurados. Porto et al. (2004) avaliaram a transferência de massa e eficiência de separação para a enzima ascorbato oxidase em PRDC com sistema PEG-fosfato, e encontraram um fator de purificação de 34 e recuperação em atividade de 236%. Sarubbo et al. (2004) estudaram a eficiência de separação da coluna PRDC utilizando sistema de duas fases aquosas PEG-policaजू para extração de albumina de soro bovino, obtiveram uma eficiência de separação de 96% sob as condições do estudo.

1.3.8 – Aplicação de planejamentos experimentais em Sistemas de duas fases aquosas (SDFA)

Como já foi mencionado anteriormente, a separação de proteínas em SDFA depende da natureza do polímero e da sua massa molar, concentração do polímero e do sal, composição iônica e força, e pH do sistema, juntos com o tamanho, carga e hidrofobicidade da molécula. Os fatores e mecanismos que causam a distribuição desigual de proteínas entre as fases são pouco conhecidos, mas regras empíricas têm sido desenvolvidas.

Em função disso, a utilização de planejamentos experimentais é uma ferramenta adequada para se conhecer os principais fatores relacionados com cada tipo de extração e tipo de proteína que se quer separar.

Costa; Pessoa Jr e Roberto (2000) avaliaram as influências de 5 parâmetros (pH, MMPEG(massa molar do PEG) e concentração de PEG, concentração de fosfato e de

NaCl) na partição do complexo xilanolítico em SDFA, usando um planejamento experimental 2^5 . A análise estatística dos resultados mostrou que as variáveis MMPEG, concentração de PEG e concentração de NaCl exerceram um significativo efeito sobre o valor do coeficiente de partição. Li et al. (2001) otimizaram a partição da bacteriocina utilizando PEG/Na₂SO₄ através de um planejamento experimental completo 2^2 , em que as variáveis de estudo foram as concentrações de PEG 4000 e concentrações do sulfato de sódio. Marcos et al. (2002) otimizaram a purificação da penicilina acilase utilizando o sistema PEG/Citrato de sódio através de um planejamento experimental fatorial 2^3 em que as variáveis trabalhadas foram as concentrações de PEG3350, citrato de sódio e NaCl. Mayerhoff; Roberto e Franco (2004) utilizaram um planejamento experimental 2^4 para avaliar a influência das variáveis MMPEG, concentração do PEG, concentração de fosfato e concentração de NaCl na extração de xilose redutase utilizando sistemas de duas fases aquosas (SDFA), e encontraram um modelo matemático representativo para fator de purificação e rendimento.

A elaboração de um planejamento experimental foi de fundamental importância, pois reduziu o número de experimentos necessários, indicando os principais fatores que interferem significativamente no SDFA. Com isso obteve-se economia de tempo e oportunidade para novos estudos.

Capítulo II

Extração da toxina alfa produzida pelo *Clostridium perfringens* tipo A em sistemas de duas fases aquosas

Maria Taciana Holanda Cavalcanti^{a,b}, Tatiana Souza Porto^{a,b}, Benicio de Barros Neto^c, José Luiz Lima-Filho^b, Ana Lúcia Figueiredo Porto^{b,d}, Adalberto Pessoa-Jr^{a*}

^a Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica /FCF, Universidade de São Paulo; ^bLaboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), UFPE; ^c Departamento de Química Fundamental, UFPE; ^d Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, UFRPE.

Endereço do autor para correspondência:

Adalberto Pessoa Júnior

Av. Prof. Lineu Prestes, 580 – Bloco16

CEP: 05508-950, São Paulo, SP, Brasil.

Tel: (11) 3091-3710

Fax: (11) 3094-3694

e-mail: pessoajr@usp.br

Artigo submetido para publicação no periódico *Journal Chromatography B*.

Este capítulo apresenta o estudo da partição da toxina alfa em sistema de duas fases aquosas formado pelo polietileno glicol (PEG) e sais de fosfato em modo descontínuo. A partição foi estudada através do planejamento experimental fracionário 2^{4-1} , com o objetivo de selecionar as principais variáveis que influenciam neste processo.

2.1 Introdução

A toxina alfa produzida por *Clostridium perfringens* é uma importante fosfolipase C (E. C. 3. 1. 4. 3) com participação efetiva na patogênese de diversas doenças, tais como a doença de *Chron's* em humanos e enterites em animais domésticos (Songer, 1997; Titball, 1999, Flores-Díaz et al.2004). Além disso, esta toxina é especialmente associada com a gangrena gasosa (Titball, 1999), entretanto a imunização com o toxoide confere proteção (Songer, 1997).

As vacinas produzidas com toxoide podem ser preparadas a partir de cultura de *Clostridium perfringens* tipo A filtrada, conferindo proteção contra gangrena gasosa experimental, entretanto tem acontecido um problema comum na preparação desta vacina com relação à imunogenicidade (Titball, 1999). A purificação da toxina alfa é necessária para o preparo de uma vacina imunogênica. Diversos métodos têm sido propostos para sua purificação, todos usando técnicas tradicionais como as cromatografias e precipitação com sulfato de amônio (Cavalcanti et al. 2004).

O sistema de duas fases aquosas (SDFA) tem sido usado extensivamente na pesquisa farmacêutica para extração, separação e purificação de biomoléculas (Simon; Gautam, 2004; Cisneros et al. 2004; Mayerhoff; Roberto; Franco, 2004; Tubio; Nerli; Pico, 2004). Diversas vantagens são relatadas, incluindo baixo custo, boa reprodutibilidade, fácil aumento de escala e reciclagem das fases (Papamichael; Boerner; Husted, 1992).

A partição de proteínas em SDFA depende principalmente das propriedades físico-químicas delas, tais como: ponto isoelétrico, hidrofobicidade de superfície, massa

molar e outras variáveis relacionadas à formação do sistema, tais como: massa molar do polímero, pH, tipos de sais componentes do sistema, concentração do polímero e do sal formador do sistema. Através do controle desses fatores uma partição mais seletiva e recuperação da proteína alvo podem ser esperadas (Tubio; Nerli; Picó, 2004).

O planejamento estatístico dos experimentos é um método eficiente para estudar a influencia de certo número de variáveis relacionadas com o processo de purificação, para determinar os efeitos significantes nas respostas de interesse, como o coeficiente de partição, fator de purificação e rendimento. Com o planejamento os efeitos significativos podem ser identificados a partir de um número mínimo de experimentos (Barros Neto; Scarminio; Bruns, 2002).

Neste trabalho o planejamento fatorial fracionário em dois níveis foi usado para estudar o comportamento de partição da toxina alfa em sistemas de duas fases aquosas PEG/fosfato. Três respostas foram analisadas (coeficiente de partição, fator de purificação e rendimento) em função dos níveis escolhidos para pH, massa molar do PEG, concentração do PEG e do fosfato.

2.2 Materiais e Métodos

2.2.1 Materiais

A toxina alfa bruta produzida por *Clostridium perfringens* tipo A (Tipo I – P7633), o polietileno glicol (PEG) massas molares: 400, 3350, 6000, 8000 e 10000 g/mol, fosfato dibásico de potássio (K_2HPO_4), fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4), Azul de Coomassie G-250, albumina bovina sérica (BSA), *p*-nitrofenil-fosforilcolina (*p*NPPC)

foram obtidos a partir da Sigma Co. (St. Louis, Mo, USA). Os outros reagentes químicos todos de grau analítico.

2.2.2 Preparação da toxina alfa

A toxina alfa bruta produzida por *Clostridium perfringens* tipo A foi diluída em tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,2 a uma concentração final de 9,9 U/mL de atividade e 150 µg/mL de concentração de proteína.

2.2.3 Preparação dos sistemas de duas fases aquosas

A solução concentrada de sais de fosfato (40% m/m) foi preparada em diferentes pHs (6,0; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5) pela mistura de quantidades apropriadas das soluções de fosfato dibásico de potássio (K_2HPO_4) e fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ C$). Quantidades requeridas das soluções de sais de fosfato foram misturadas à solução de PEG (50% m/m) e a solução da toxina representou 20% (m/m) do total da massa do sistema, todos foram adicionados a tubos graduados de 15 mL com o auxílio de pipetas. Água foi adicionada por último para uma quantidade final de 10g. Após a agitação em vórtice por 1 minuto, as duas fases foram separadas por decantação (60 minutos). Depois, os volumes das fases foram medidas e separadas. A concentração de proteína e a atividade da toxina foram realizadas em ambas as fases.

2.2.4 Atividade fosfolipásica C

A atividade enzimática foi determinada em ambas as fases. O ensaio foi baseado no método descrito por Kurioka e Matsuda (1976). A solução do substrato foi preparada pela mistura de 60%(m/v) de sorbitol, 1mM de cloreto de zinco (ZnCl_2) e 50 mM de *p*-nitrofenil-fosforilcolina ($p\text{NPPC}$) em tampão 25 mM Tris-HCl pH 7,2. Um total de 225 μL desta solução foi transferida para um tubo de ensaio e incubado por 15 minutos a 37°C. Decorrido este tempo, as amostras das fases (75 μL) foram adicionadas ao mesmo tubo e incubados novamente por 1 hora sob agitação contínua. A taxa de hidrólise do NPPC pela fosfolipase C foi monitorada através do *p*-nitrofenol a 415 nm. O coeficiente de extinção molar do *p*-nitrofenol em solução de sorbitol a 60% tamponada com Tris-HCl pH 7,2 foi $1,51 \times 10^4$ mmol/min.

2.2.5 Determinação da concentração de proteína

A concentração de proteína total foi determinada de acordo com o método de Bradford (1976) usando a albumina bovina serica como padrão.

2.2.6 Planejamento experimental e análise estatística

A influência das variáveis: massa molar do PEG (MMPEG), concentração de PEG (CPEG), concentração de fosfato (CPHOSPH) e o pH foi avaliada de acordo com dois sucessivos planejamentos fracionários com 4 repetições no ponto central (Barros Neto; Scarminio; Bruns, 2002) (Tabela 2.2.6.1 e 2.2.6.2). O programa "*Statistica*" (versão 6.0) (Statsoft Inc.) foi usado para montar o planejamento e analisar os dados obtidos.

Tabela 2.2.6.1 – Níveis das 4 variáveis utilizados no primeiro planejamento experimental fracionário 2^{4-1} PEG/Fosfato/ toxina alfa. O número -1 representa o nível mínimo, o zero é o ponto central e o +1 representa o nível máximo.

Número	Fatores	- 1	0	+ 1
01	Concentração do PEG	20%	22%	24%
02	Concentração de Fosfato	15%	20%	25%
03	pH	6,0	7,0	8,0
04	Massa molar do PEG	400	3350	8000

Tabela 2.2.6.2 – Níveis das 4 variáveis utilizados no segundo planejamento experimental fracionário 2^{4-1} PEG/Fosfato/ toxina alfa. O número -1 representa o nível mínimo, o zero é o ponto central e o +1 representa o nível máximo.

Número	Fatores	- 1	0	+ 1
01	Concentração do PEG	10%	15%	20%
02	Concentração de Fosfato	15%	20%	25%
03	pH	7,5	8,0	8,5
04	Massa molar do PEG	6000	8000	10000

2.2.7 Determinação do coeficiente de partição, fator de purificação e rendimento em atividade

O coeficiente de partição foi calculado pela razão entre a atividade volumétrica na fase superior e na fase inferior.

$$K = \frac{A_s}{A_i} \quad (2)$$

Onde: A_s e A_i são as atividades da toxina (mmol/min) nas fases superior e inferior, respectivamente.

O fator de purificação foi calculado pela razão da atividade específica na amostras da fase e a atividade específica no extrato bruto.

$$P_f = \frac{A_s / C_s}{A_i / C_i} \quad (3)$$

Onde o A_s e A_i são as atividades enzimáticas em U/mL na fase superior e no extrato bruto (antes da partição), respectivamente; C_s e C_i são as concentrações de proteína total em mg/mL da fase superior e extrato bruto, respectivamente.

O rendimento em atividade da toxina alfa foi determinado pela razão entre a atividade volumétrica das fases multiplicada pelos seus volumes e atividade volumétrica multiplicada pelo seu volume no extrato bruto.

$$Y = \left(\frac{A_s \times V_s}{A_i \times V_i} \right) \times 100 \quad (4)$$

Onde o A_s e A_i são as atividades enzimáticas em U/mL na fase superior e no extrato bruto (antes da partição), respectivamente; V_s e V_i são os volumes da fase superior e do extrato bruto em mL, respectivamente.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Primeiro planejamento experimental

Os resultados obtidos para o primeiro planejamento fracionário estão mostrados na Tabela 2.3.1.1. A partir da resolução de fazer uma triagem das quatro variáveis, a análise dos resultados dos contrastes obtidos demonstrou que os efeitos principais estão confundidos com as interações de terceira ordem, enquanto que as interações de segunda ordem estão confundidas com as outras. Os valores dos contrastes calculados para este planejamento são apresentados na Tabela 2.3.1.2. A interpretação destes valores requer muita atenção, por que esses cálculos não incluem os resultados do experimento 1, que não formou fase.

Unicamente os contrastes para coeficiente de partição (K) foram estatisticamente significantes, ao nível de 95 % de confiança. Para as demais respostas, os contrastes mostraram que os resultados são indistinguíveis a partir do erro experimental calculado. Assumindo que as interações de terceira ordem foram desconsideradas, os resultados para o coeficiente de partição podem ser interpretados como descrito a seguir. Todas as quatro variáveis têm efeito significativo e positivo como efeito principal nos valores de K , indicando que elevando os valores a partir dos níveis mais baixos para os mais altos, teremos um aumento médio nos valores de K . Esta influência parece ser mais importante para a concentração de fosfato e pH, do que para a concentração de PEG. Além disso, os contrastes das interações de segunda ordem são todas altamente significantes e com sinais algébricos negativos. Isto indica que o efeito das variáveis no coeficiente de partição tende a ser menor se as outras variáveis tiverem seus efeitos

elevados ao mesmo tempo. Esta situação é complexa e pode ser mais bem visualizada através do gráfico em cubo apresentado na Figura 2.3.1.2, onde as respostas observadas estão dispostas contra os níveis de combinação das quatro variáveis estudadas. Os dois maiores valores (114,0 e 51,9) estão localizados na face superior do cubo, que corresponde a 25% de concentração de fosfato, porém foram obtidos com combinações em níveis opostos para massa molar do PEG (MMPEG) e pH, (400 g/mol, 8) e (8000 g/mol, 6), respectivamente, entretanto, ambos foram obtidos com 15 % de concentração de PEG (CPEG).

Figura 2.3.1.1 – Gráfico em cubo para os valores obtidos do coeficiente de partição no primeiro planejamento apresentado na Tabela 2.2.1.1. Os valores em parênteses são as concentrações do PEG.

Tabela 2.3.1.1 – Resultados obtidos no primeiro planejamento (2^{4-1}) da extração da toxina alfa em PEG/fosfato.

Ensaio	MMPEG	CPEG%	pH	fosfato%	K	Y%	P _f
1	400	15	6	15	-	-	-
2	8000	15	8	15	24,9	62,5	1,4
3	400	25	8	15	28,0	56,7	0,63
4	8000	25	6	15	3,8	29,9	2,07
5	400	15	8	25	114	80,3	1,34
6	8000	15	6	25	51,9	79,4	1,55
7	400	25	6	25	2,5	1,78	0,04
8	8000	25	8	25	22,2	68,9	1,6
9	3350	20	7	20	2,3	80,3	1,97
10	3350	20	7	20	3,56	72,9	1,79
11	3350	20	7	20	4,68	36,0	0,94

Tabela 2.3.1.2 – Valores dos efeitos estimados para o primeiro planejamento experimental nas respostas coeficiente de partição (K), fator de purificação (P_f) e rendimentos (Y).

Variáveis	Contrastes estimados		
	K	P _f	Y
(1)MMPEG	36,26±1,49	0,15±0,68	- 4,77±29,65
(2)CPEG	13,13±1,58	- 0,98±0,72	- 46,51±31,34
(3)CPHOSPH	80,13±1,58	- 0,89±0,72	- 9,94±31,34
(4) pH	79,40±1,58	- 0,67±0,72	9,08±31,34
1x2	-38,49±1,58	1,34±0,72	24,94±31,34
1x3	-57,49±1,58	0,73±0,72	37,85±31,34
1x4	-83,72±1,58	0,36±0,72	1,95±31,34

OBS: valores em negrito correspondem à significância estatística ao nível de 5%.

Os sais causam mudança na carga eletrostática do SDFA e influenciam na distribuição de aminoácidos (Shang et al. 2004) e proteínas carregadas. Geralmente, os íons fosfato vão para a fase inferior (ex. Fases dextrana ou sais), que tem alta densidade, esta fase apresenta uma carga negativa maior do que a fase superior (ex. fase PEG), que é menos densa (Han; Lee, 1997). A maioria das proteínas com ponto isoeletrico na região ácida, e conseqüentemente carga superficial negativa em regiões de pH neutro, como a toxina alfa, se direcionam para a fase superior positiva e o coeficiente de partição aumenta ao redor do pH 7 (Han; Lee, 1997). Um aumento da CPHOSP direciona as proteínas carregadas negativamente para a fase PEG, devido à força de repulsão causada pelos anions. Este fenômeno foi observado por Han e Lee (1997), quando estudaram a partição de albumina bovina serica em PEG-fosfato SDFA, como modelo. Eles observaram também que a protease neutral produzida por *Bacillus subtilis*, se direcionou para a fase sal nos sistemas com alta concentração de fosfato por causa da sua carga positiva a pH neutro.

Diversos autores como, Fernandez Lahore et al. (1995), quando estudaram a partição de uma protease ácida produzida por *Mucor bacilliformis* em PEG-fosfato e Farrugia; Nerli e Picó (2003) quando estudaram a interação da albumina bovina serica com o PEG para predizer a partição de proteínas em sistemas de duas fases aquosas, ambos concordam com a dependência entre o coeficiente de partição (K) e a MMPEG (1), eles observaram que a grande massa molar aumentava o efeito de volume excluído e diminuía o K. É provável que o aumento na massa molar do polímero diminua a

quantidade de solvente disponível na fase rica em PEG para solubilizar a proteína e os sais como descrito por Li e Peeples (2004) quando estudaram a purificação da enzima amilolítica (MJA1) usando PEG-fosfato. Além disso, em solução aquosa o PEG atua como uma grande molécula móvel com um grande volume excluído. Embora este efeito de exclusão aumente com a massa molar, polímeros de grande massa molar possuem a capacidade de formar ligações intramoleculares, assim adquirem uma conformação mais compacta (Tubio; Nerli; Pico, 2004).

Os resultados para o coeficiente de partição não podem ser desconsiderados, porém o fator de purificação foi considerado a resposta mais importante para este estudo por que a toxina precisa está pura para produzir uma vacina mais imunogênica. Apesar dos contrastes calculados para o fator de purificação (P_f) não terem sido estatisticamente significante, uma interpretação do padrão apresentados pelos resultados pode ser feita, com a ajuda de um gráfico em cubo como mostrado na Figura 2.3.1.2. Considerando primeiro o efeito da MMPEG, está claro que os valores de P_f , na face direita do cubo que correspondem a MMPEG = 8000 g/mol, são todos maiores do que os valores correspondentes as face esquerda (MMPEG = 400 g/mol), indicando que a elevação da MMPEG é melhor para aumentar a purificação. Para as outras variáveis o padrão é menos visível, e existe a indicação de considerável interação dos efeitos. Os quatro maiores valores de P_f , que são aqueles localizados na face direita unicamente tem em comum a massa molar do PEG maior. Para as outras variáveis, eles correspondem a níveis diferentes de combinação: (25%, 15%, 6), (15%, 15%, 8), (15%, 25%, 6) e (25%, 25%, 8), para CPEG, CPhosp e pH, respectivamente. O maior fator de

purificação (1,35) foi encontrado na face esquerda (MMPEG = 400) e com (CPEG, CPhosp e pH) = (15%, 25%, 8).

Nenhum contraste foi estatisticamente significativo para o rendimento em atividade a um nível de 95 % de confiança. Entretanto, os valores indicam que a diminuição da MMPEG (1), CPEG (2), CPhosp (3) e aumento do pH (4) podem resultar em maiores valores de rendimento.

Após todas estas considerações, nós decidimos investigar uma região experimental próxima do primeiro planejamento, porem aumentando os valores da MMPEG, e modificando ligeiramente os níveis das outras variáveis para propor o segundo planejamento 2^{4-1} , e os novos níveis estão especificados na Tabela 2.3.1.2.

Figura 2.3.1.2 – Gráfico em cubo para os valores obtidos do fator de purificação no primeiro planejamento apresentado na Tabela 2.2.1.1. Os valores em parênteses são as concentrações do PEG.

2.3.2 Segundo planejamento experimental

Os resultados obtidos e os efeitos estimados no segundo planejamento estão mostrados nas Tabelas 2.3.2.1 e 2.3.2.2, respectivamente. Este planejamento pode ser interpretado de forma usual, pois nenhuma resposta foi perdida como no primeiro planejamento.

Para o coeficiente de partição (K), todos os contrastes são altamente significativos, exceto aquele que corresponde ao efeito principal da MMPEG e a soma das interações 13 e 24. Assumindo que as interações de terceira e quarta ordem são dispensáveis, esses resultados mostram que em média, o valor de K aumenta quando a concentração do PEG (CPEG) é elevada, porém diminui quando o mesmo é feito com o pH e concentração de fosfato (Cphosp). Entretanto, esses fatores agem de forma altamente interdependente, como indicado pelos valores dos contrastes 12 + 34 e 14 + 23, pelo menos um dos valores mais significativo de todos. Assim essas interações são negativas, o efeito dos efeitos dados tende a ser mais negativo (ou menos positivos) quando o nível dos outros fatores é elevado ao mesmo tempo. Um comportamento similar foi observado por Costa; Pessoa Jr e Roberto (1998) quando estudaram a extração de xilanase em SDFA PEG-fosfato. Esses autores relataram que o efeito do pH foi estatisticamente significativo enquanto o efeito da MMPEG foi insignificante. Devido a interação complexa desses efeitos podemos interpretá-los com a ajuda de um gráfico em cubo, porém nós vamos proceder a análise da resposta considerada mais importante, o fator de purificação. Neste segundo planejamento, unicamente o efeito principal da CPhosph foi estatisticamente significativo. Entretanto, seus valores foram

negativo, elevando a concentração do fosfato de 15% para 25% diminuímos os valores do fator de purificação, em média. A demonstração desses resultados está na figura 2.3.2.1, onde os valores do fator de purificação na face superior do cubo, que corresponde a 25% da concentração do fosfato, são sistematicamente menores do que os valores correspondentes na face inferior do cubo (15% de Concentração de fosfato). Como no primeiro planejamento, valores do fator de purificação da mesma ordem podem ser obtidos a diferentes condições, como mostrado pela combinação dos níveis da face inferior.

Figura 2.3.2.1 – Gráfico em cubo para os valores obtidos do fator de purificação no segundo planejamento apresentado na Tabela 2.3.2.1. Os valores em parênteses são as concentrações do PEG.

Tabela 2.3.2.1 – Resultados obtidos no segundo planejamento fracionário 2^{4-1} da extração da toxina alfa em PEG/fosfato

Ensaio	MMPEG	CPEG%	pH	fosfato%	K	Y%	P _f
1	6000	10	7,5	15	28,0	173,6	4,35
2	6000	10	8,5	25	114,0	146,8	2,7
3	6000	20	8,5	15	200,8	250,0	4,7
4	6000	20	7,5	25	102,7	128,0	2,0
5	10000	10	8,5	15	16,3	156,53	4,5
6	10000	10	7,5	25	178,5	258,4	3,2
7	10000	20	7,5	15	236,3	199,6	3,9
8	10000	20	8,5	25	18,4	59,1	1,0
9	8000	15	8,0	20	119,2	215,7	4,5
10	8000	15	8,0	20	104,1	195,4	3,6
11	8000	15	8,0	20	117,4	212,5	5,5
12	8000	15	8,0	20	115,0	297,0	4,7

Tabela 2.3.2.2 – Valores dos efeitos estimados para o segundo planejamento experimental nas respostas coeficiente de partição (K), fator de purificação (P_f) e rendimentos (Y).

Variáveis	Contraste estimado		
	K	P _f	Y
(1)MMPEG	1,00±4,79	-0,29±0,55	-6,19±32,14
(2)CPEG	55,35±4,79	-0,79±0,55	-24,66±32,14
(3)CPHOSPH	-16,95±4,79	-2,14±0,55	-46,86±32,14
(4) pH	-49,00±4,79	-0,14±0,55	-36,79±32,14
12 + 34	-25,40±4,79	-0,61±0,55	-53,46±32,14
13 + 24	-10,90±4,79	0,04±0,55	27,54±32,14
14 + 23	-141,05±4,79	-0,66±0,55	-84,39±32,14

OBS: valores em negrito correspondem à significância estatística ao nível de 5%.

Para o rendimento em atividade, o alto valor do erro estimado fez todos os efeitos não serem significativos estatisticamente. Todos os efeitos principais foram negativos, entretanto podemos esperar rendimentos maiores quando todos os fatores estiverem em seus níveis mais baixos. Diversos rendimentos encontrados foram altos, maiores que 100%.

Valores similares são frequentemente relatados para extração de enzimas usando sistemas líquido-líquido (Duarte et al. 1999; Falco; Durrant; Franco, 2000; Cortez et al. 2001). Apesar de ser sugerido que o PEG é essencialmente um polímero inerte que não interage com proteínas devido a suas propriedades de hidratação e impedimento estérico. Diversos autores têm encontrado interações entre PEG e proteínas, como por exemplos a dissociação da enzima tetramérica fosfofrutoquinase induzida pelo PEG e alterações no espectro de absorbância da ribonuclease devido a modificações nos resíduos de tirosina em presença de PEG citados por Tubio; Nerli e Picó (2004). Além disso, Farrugia; Nerli e Picó (2003) têm encontrado que o PEG induziu o deslocamento de uma sonda fluorescente ANS, a partir do sítio de ligação em albumina humana. Grimonprez e Johansson (1995) relataram altos valores de rendimentos em presença de PEG, que dependia do tipo de enzima, além disso, o aumento do comprimento da cadeia pode levar a um aumento da hidrofobicidade como sugerido por Tubio; Nerli e Picó (2004), desse modo aumentando a atividade de enzimas hidrofóbicas. Pancera et al. (2002) relatou que o PEG pode influenciar na atividade da enzima, devido a alterações na estrutura e no tipo de sítio ativo de uma enzima em particular em presença de PEG, pode determinar um aumento ou diminuição da atividade relativa.

Para se obter altos valores para fator de purificação e rendimento em atividade, um gráfico foi preparado com essas duas respostas para ajudar a decidir qual a melhor condição que proporcionasse isto (Figura 2.3.2.3). Os experimentos com fator de purificação maior que 4 e rendimentos em atividade maiores que 200 estão marcados na figura. Três dos quatros experimentos são replicatas do ponto central, enquanto que o quarto experimento, tem os seguintes níveis de combinação (MMPEG, CPEG, pH, CPhosph) = (6000, 20%, 8,5, 15%). A diferença nos valores das replicatas indica que essas respostas são afetadas pela relativa falta de reprodutibilidade.

Em resumo, nós podemos concluir a partir da figura 2.3.2.3 que a melhor condição para purificação da toxina alfa, de todas as investigações feitas neste estudo, são aquelas correspondentes ao ponto central do segundo planejamento experimental: MMPEG 8000, pH 8,0, CPEG 15% e CPhosph 20%.

Esses resultados estão de acordo com características físico-químicas da toxina (uma pequena enzima hidrofóbica com 42,5 kDa e pI de 5,4) e mecanismos como efeito do volume excluído e interações hidrofóbicas e eletrostáticas. Aparentemente esses mecanismos foram os principais fenômenos que governaram a partição da toxina alfa em PEG/fosfato SDFA.

Figura 2.3.2.3 Relação entre rendimento em atividade (Y%) e o fator de purificação (P_f) na partição da toxina alfa em sistema de duas fases aquosas PEG-fosfato.

2.4 Conclusão

O planejamento experimental fracionário provou ser adequado para o estudo da purificação da toxina alfa em sistemas de duas fases aquosas (SDFA) PEG/fosfato. Os resultados aqui relatados demonstram a aplicação potencial do SDFA para recuperação da toxina alfa produzida por *Clostridium perfringens* tipo A com a possibilidade de aumentar a escala para a produção industrial de vacinas.

Capítulo III

Purificação da toxina alfa a partir de *Clostridium perfringens* tipo A em sistemas de duas fases aquosas PEG-fosfato

Maria Taciana Holanda Cavalcanti^{a,b}, Tatiana Souza Porto^{a,b}, Benicio de Barros Neto^c, José Luiz Lima-Filho^b, Ana Lúcia Figueiredo Porto^{b,d}, Adalberto Pessoa-Jr^{a*}

^a Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica /FCF, Universidade de São Paulo; ^b Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), UFPE; ^c Departamento de Química Fundamental, UFPE; ^d Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, UFRPE.

Endereço do autor para correspondência:

Adalberto Pessoa Júnior

Av. Prof. Lineu Prestes, 580 – Bloco16

CEP: 05508-950, São Paulo, SP, Brasil.

Tel: (11) 3091-3710

Fax: (11) 3094-3694

e-mail: pessoajr@usp.br

Artigo a ser submetido para publicação no periódico *Process Biochemistry*.

Este capítulo apresenta o estudo da purificação da toxina alfa em sistema de duas fases aquosas formado pelo polietileno glicol (PEG) e sais de fosfato em modo descontínuo. A purificação foi estudada através do planejamento experimental completo 2^2 , com o objetivo de melhorar a purificação obtida com planejamentos fracionários. Foi proposto um estudo mais aprimorado sobre a influencia das concentrações de PEG e sais de fosfato.

3.1 Introdução

Tem sido proposto o envolvimento importante das fosfolipases C na patogênese de varias doenças, através da ativação da cascada do ácido araquidônico (Titball; Fearn; Williamson, 1993; Titball, 1999; Ochi et al. 2004). A toxina alfa é a mais tóxica das fosfolipases C, e tem sido alvo de grandes investigações desde a sua descrição por MacFarlane e Knight em 1941 (Titball; Fearn; Williamson, 1993).

A toxina possui um papel importante em diversas doenças de animais e seres humanos, como as enterites em galinhas e doença de "Chron's" em homens. Estudos têm mostrado que a toxina alfa é o maior fator de virulência em casos de gangrena gasosa (Titball, 1999), entretanto a imunização com o toxoide pode conferir proteção (Songer, 1997).

As vacinas produzidas com toxoide podem ser preparadas a partir de cultura de *Clostridium perfringens* tipo A filtrada, conferindo proteção contra gangrena gasosa experimental, entretanto tem acontecido um problema comum na preparação desta vacina com relação à imunogenicidade (Ito, 1968 apud Titball; Naylor; Basak, 1999).

A purificação da toxina alfa é necessária para o preparo de uma vacina imunogênica. Diversos métodos têm sido propostos para sua purificação, todos usando técnicas tradicionais como as cromatografias e precipitação com sulfato de amônio (Cavalcanti et al. 2004).

O sistema de duas fases aquosas (SDFA) tem sido usado para recuperação de produtos biológicos a partir de diferentes fontes, por que mostra diversas vantagens tais como: fornece um meio adequado para preservar a funcionalidade de biomoléculas, o

aumento de escala é uma operação fácil, o sistema pode processar amostras com partículas sólidas, existem muitos parâmetros a serem ajustados para aperfeiçoar a purificação da proteína, e assim é uma técnica versátil, a transferência de massa é rápida e o equilíbrio pode ser encontrado em segundos, é um sistema econômico, pois é formado com determinados sais e polietileno glicol (Rito-Palomares, 2004).

O emprego de uma ferramenta estatística para avaliar o desempenho das variáveis que influenciam na partição, purificação e rendimento nos sistemas de duas fases aquosas é útil, porque diminui o tempo e custo dos experimentos.

O planejamento estatístico dos experimentos é um método conveniente para estudar a influencia de um grande número de variáveis relacionadas com o processo de purificação, para determinar os efeitos significantes nas respostas de interesse, como o coeficiente de partição, fator de purificação e rendimento (Barros Neto; Scarminio; Bruns, 2002).

O objetivo desta pesquisa foi estudar a influencia das concentrações de PEG e fosfato na purificação da toxina alfa em SDFA usando um planejamento experimental completo 2^2 .

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Materiais

A toxina alfa bruta produzida por *Clostridium perfringens* tipo A (Tipo I – P7633), o polietileno glicol (PEG) massa molar 8000 g/mol, fosfato dibásico de potássio (K_2HPO_4), fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4), Azul de Coomassie G-250, albumina

bovina sérica (BSA), ρ -nitrofenil-fosforilcolina (ρ NPPC) foram obtidos a partir da Sigma Co. (St. Louis, Mo, USA). Os outros reagentes químicos todos de grau analítico.

3.2.2 Preparação da toxina alfa

A toxina alfa bruta produzida por *Clostridium perfringens* tipo A foi diluída em tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,2 a uma concentração final de 9,9 U/mL de atividade e 150 μ g/mL de concentração de proteína.

3.2.3 Preparação dos sistemas de duas fases aquosas

A solução concentrada de sais de fosfato (40% m/m) foi preparada no pH (8,0) pela mistura de quantidades apropriadas das soluções de fosfato dibásico de potássio (K_2HPO_4) e fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ C$). Quantidades requeridas das soluções de sais de fosfato foram misturadas à solução de PEG (50% m/m) e a solução da toxina representou 20% (m/m) do total da massa do sistema, todos foram adicionados a tubos graduados de 15 mL com o auxílio de pipetas. Água foi adicionada por último para uma quantidade final de 10g. Após a agitação em vórtice por 1 minuto, as duas fases foram separadas por decantação (60 minutos). Depois, os volumes das fases foram medidas e separadas. A concentração de proteína e a atividade da toxina foram realizadas em ambas as fases.

3.2.4 Atividade fosfolipásica C

A atividade enzimática foi determinada em ambas as fases. O ensaio foi baseado no método descrito por Kurioka e Matsuda (1976). A solução do substrato foi preparada pela mistura de 60%(m/v) de sorbitol, 1mM de cloreto de zinco (ZnCl_2) e 50 mM de ρ -nitrofenil-fosforilcolina (ρ NPPC) em tampão 25 mM Tris-HCl pH 7,2. Um total de 225 μL desta solução foi transferida para um tubo de ensaio e incubado por 15 minutos a 37° C. Decorrido este tempo, as amostras das fases (75 μL) foram adicionadas ao mesmo tubo e incubados novamente por 1 hora sob agitação contínua. A taxa de hidrólise do NPPC pela fosfolipase C foi monitorada através do ρ -nitrofenol a 415 nm. O coeficiente de extinção molar do ρ -nitrofenol em solução de sorbitol a 60% tamponada com Tris-HCl pH 7,2 foi $1,51 \times 10^4$ mmol/min.

3.2.5 Determinação da concentração de proteína

A concentração de proteína total foi determinada de acordo com o método de Bradford (1976) usando a albumina bovina serica como padrão.

3.2.6 Planejamento experimental e análise estatística

A influência das variáveis: concentração de PEG (CPEG) e de fosfato (CPhosp) foi avaliada de acordo com planejamento experimental completo com 4 repetições no ponto central (Tabela I). O programa "*Statistica*" (versão 6.0) foi usado para organizar o planejamento e analisar os dados obtidos.

Tabela 3.2.6.1 – Níveis das variáveis do planejamento experimental completo (2^2) usado para partição da toxina alfa em sistemas de duas fases aquosas PEG-fosfato.

Variáveis	Nível		
	(-1)	(0)	(+1)
Concentração de PEG % (m/m)	12,55	15	17,5
Concentração de fosfato % (m/m)	15	20	22,5

3.2.7 Determinação do coeficiente de partição, fator de purificação e rendimento em atividade

O coeficiente de partição foi calculado pela razão entre a atividade volumétrica na fase superior e na fase inferior.

$$K = \frac{A_s}{A_i} \quad (2)$$

Onde: A_s e A_i são as atividades da toxina nas fases superior e inferior, respectivamente.

O fator de purificação foi calculado pela razão da atividade específica na amostras da fase e a atividade específica no extrato bruto

$$P_f = \frac{\frac{A_s}{C_s}}{\frac{A_i}{C_i}} \quad (3)$$

Onde o A_s e A_i são as atividades enzimáticas em U/mL na fase superior e no extrato bruto (antes da partição), respectivamente; C_s e C_i são as concentrações de proteína total em mg/mL da fase superior e extrato bruto, respectivamente.

O rendimento em atividade da toxina alfa foi determinado pela razão entre a atividade volumétrica das fases multiplicada pelos seus volumes e atividade volumétrica multiplicada pelo seu volume no extrato bruto.

$$Y = \left(\frac{A_s \times V_s}{A_I \times V_I} \right) \times 100 \quad (4)$$

Onde o A_s e A_I são as atividades enzimáticas em U/mL na fase superior e no extrato bruto (antes da partição), respectivamente; V_s e V_I são os volumes da fase superior e do extrato bruto em mL, respectivamente.

3.3 Resultados e Discussão

O primeiro passo no processo de escolha das condições ótimas é identificar as variáveis de entrada que tem uma grande influência nas respostas e a faixa dentro da qual elas podem variar. Em experimentos de extração preliminares (dados não mostrados), a influência da massa molar do PEG, pH concentração do PEG e do fosfato no coeficiente de partição(K), fator de purificação (P_f) e rendimento em atividade (Y) da toxina alfa foram examinados. As melhores condições apresentadas por um estudo preliminar da partição da toxina alfa, foram massa molar do PEG 8000 g/mol e pH 8,0. O planejamento experimental sugeriu que as concentrações de PEG e fosfato deveriam ser testadas novamente, por que elas mostraram importância na extração. Por isso elas foram escolhidas para novo estudo e as concentrações iniciais foram 12,5% para PEG 8000 e 15% sais de fosfato pH 8,0.

Nas Tabelas 3.3.1 e 3.3.2 estão apresentados os resultados obtidos com o planejamento experimental completo 2^2 e os contrastes estimados das variáveis estudadas, respectivamente.

Tabela 3.3.1 – Resultados do planejamento experimental completo (2^2) da extração da toxina alfa em sistema de duas fases aquosas PEG-fosfato.

Ensaio	CPEG%	CPhosp%	K	Y%	P _f
1	12,5	15	11,6	101,2	3,0
2	12,5	22,5	21,1	142,7	5,2
3	17,5	15	101,0	158,3	5,7
4	17,5	22,5	224,3	163,4	5,3
5	15	20	65,4	161,9	4,5
6	15	20	43,7	162,3	4,5
7	15	20	55,8	137,9	4,2
8	15	20	76,7	168,2	3,9

Tabela 3.3.2 – Contrastes estimados para coeficiente de partição (K), rendimento em atividade (Y) e fator de purificação (P_f), usando 2 fatores em 3 níveis.

Variáveis	Contrastes estimados		
	K	Y	P _f
(1)CPEG	146,33 ±14,04	38,91±13,40	1,39 ±0,30
(2)CPhosp	66,42 ±14,04	23,32±13,40	0,87±0,30
1x2	56,91 ±14,04	-18,15±13,40	-1,33 ±0,30

OBS: valores em negrito são significativos ao nível de 5%.

Para o coeficiente de partição (K), todos os contrastes calculados foram significativos e positivos, esses resultados indicam que, em média, o valor de K aumenta com o aumento das concentrações de PEG e fosfato. Esses efeitos podem ser observados no gráfico quadrático apresentado na Figura 3.3.1., o maior valor previsto para coeficiente de partição foi no nível mais alto da concentração do PEG e do fosfato.

Figura 3.3.1 Representação geométrica das médias previstas das concentrações de PEG e fosfato no coeficiente de partição da toxina alfa em sistema de duas fases aquosas PEG-fosfato.

A molécula de PEG apresenta propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas, como ela é solúvel em água e muitos solventes orgânicos, é frequentemente descrita como uma molécula anfifílica (Farrugia et al. 1999). Quando em solução aquosas cada grupo oxi

etileno interage com 16 moléculas de água, formando uma estrutura de água ordenada a sua volta (Harry, 1992). Esta água ordenada é muito sensível à presença de soluto que modifica a estrutura da água (Farrugia et al. 2004). É conhecido que os sais modificam a estrutura da água (Zaslavsky, 1985) que interage com polímeros hidrofílicos e proteínas, desse modo modifica a interação entre eles (Farrugia et al. 2004). Um aumento na concentração dos sais leva a uma reorganização das moléculas de água ordenadas ao redor da molécula de polímero. Isto induz a diminuição do efeito do volume excluído da molécula de PEG devido à perda de água pela formação de uma camada ao redor do sal. Induzindo a formação de uma estrutura mais compacta com menor volume da molécula de PEG (Farrugia et al. 2004). Este fenômeno foi observado por Farrugia et al. (2004) quando aumentou a concentração de sal com a adição de cátions monovalentes no sistema PEG/fosfato SDFA para estudar a partição das enzimas: lisozima, tripsina, ovoalbumina e albumina bovina sérica. Além disso, a modificação da estrutura da água na zona hidrofóbica da proteína leva a modificação da superfície hidrofóbica exposta no solvente (Farrugia et al. 2004), que leva a uma maior interação com as moléculas de PEG.

Um aumento na concentração de PEG amplifica o fenômeno descrito acima, devido ao aumento da partição seletiva de pequenas e hidrofóbicas moléculas.

A análise estatística apresentada na Tabela 3.3.2, sugere que um aumento na CPEG (1) e diminuição da CPhosp (2) simultaneamente, podem levar a altos valores de P_f como mostra a Figura 2.

Figura 3.3.2 Representação geométrica das médias previstas das concentrações de PEG e fosfato no fator de purificação da toxina alfa em sistema de duas fases aquosas PEG-fosfato.

A análise da figura 3 sugere que o deslocamento da região experimental deve ser feito pelo aumento da concentração de PEG e diminuição da concentração de fosfato. Este deslocamento pode levar a melhorar os valores do fator de purificação na extração da toxina alfa em sistema de duas fases aquosas PEG-fosfato. Esta nova região experimental está provavelmente associada com o efeito de saturação observado com altas concentrações de sais. Este fenômeno foi observado por Farrugia et al. (2004) quando estudaram a partição das enzimas: lisozima, tripsina, ovoalbumina e albumina bovina serica no sistema PEG/fosfato SDFA.

Figura 3.3.3 Superfície de resposta efeitos das concentrações de PEG e fosfato no fator de purificação da toxina alfa em sistema de duas fases aquosas PEG-fosfato.

Com o aumento das concentrações de PEG e fosfato, podemos obter maiores valores de rendimento em atividade, como mostra a figura 3.3.4. Entretanto este efeito não foi estatisticamente significativo.

Neste estudo foram observados altos valores de rendimento. Rendimentos acima de 100% são frequentemente relatados para extração de enzimas usando sistemas liquido-liquido (Duarte et al. 1999; Falco; Durrant; Franco, 2000; Cortez et al. 2001). Apesar de ser sugerido que o PEG é essencialmente um polímero inerte que não interage com proteínas devido a suas propriedades de hidratação e impedimento estérico. Diversos autores têm encontrado interações entre PEG e proteínas, como por exemplos a dissociação da enzima tetramérica fosfofrutoquinase induzida pelo PEG e

alterações no espectro de absorvância da ribonuclease devido a modificações nos resíduos de tirosina em presença de PEG citados por Tubio; Nerli; Pico (2004). Além disso, Farrugia; Nerli; Pico (2003) tem encontrado que o PEG induziu o deslocamento de uma sonda fluorescente ANS, a partir do sitio de ligação em albumina humana. Grimonprez e Johansson (1995) relataram altos valores de rendimentos em presença de PEG, que dependia do tipo de enzima, além disso, o aumento do comprimento da cadeia pode levar a um aumento da hidrofobicidade como sugerido por Tubio; Nerli; Pico (2004), desse modo aumentando a atividade de enzimas hidrofóbicas. Pancera et al. (2002) relatou que o PEG pode influenciar na atividade da enzima, devido a alterações na estrutura e no tipo de sitio ativo de uma enzima em particular em presença de PEG, pode determinar um aumento ou diminuição da atividade relativa.

Figura 3.3.4 Representação geométrica das médias previstas das concentrações de PEG e fosfato no rendimento em atividade para a extração da toxina alfa em sistema de duas fases aquosas PEG-fosfato.

3.4 Conclusão

Os resultados mostrados neste trabalho permitem sugerir que o efeito de volume excluído do PEG e interações hidrofóbicas são fatores que governam a partição da toxina alfa em sistemas de duas fases aquosas PEG-fosfato.

Capítulo IV

Extração contínua da toxina alfa a partir de *Clostridium perfringens* tipo A em uma coluna de discos perfurados rotativos usando o sistema de duas fases aquosas PEG-fosfato

Maria Taciana Holanda Cavalcanti^{a,b}, Márcia Nieves Carneiro da Cunha^b, Igor Viana Brandi^c, Tatiana Souza Porto^{a,b}, Atilio Converti^e, , José Luiz Lima-Filho^b, Ana Lúcia Figueiredo Porto^{b,d}, Adalberto Pessoa-Jr^{a*}

^{a*}Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica /FCF, Universidade de São Paulo, Brasil; ^b Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), UFPE, Brasil; ^cInstituto de Biotecnologia, USP, Brasil; ^d Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, UFRPE, Brasil; Departamento de Química e Engenharia de processo, Universidade de Gênova, Itália.

Endereço do autor para correspondência:

Adalberto Pessoa Júnior

Av. Prof. Lineu Prestes, 580 – Bloco16

CEP: 05508-950, São Paulo, SP, Brasil.

Tel: (11) 3091-3710

Fax: (11) 3094-3694

e-mail: pessoajr@usp.br

Artigo submetido para publicação no periódico *Biochemical Engineering Journal*.

Este capítulo apresenta o estudo da partição da toxina alfa em sistema de duas fases aquosas formado pelo polietileno glicol (PEG) e sais de fosfato em modo contínuo, utilizando a coluna de discos perfurados rotativos (PRDC). Foram avaliados fatores como hold up, coeficiente de transferência de massa, fator de purificação e eficiência de separação.

4.1 Introdução

O sistema de duas fases aquosas (SDFA) tem sido usado extensivamente na pesquisa farmacêutica para separação e purificação de biomoléculas (Simon; Gautam, 2004; Benavides; Rito-Palomares, 2004; Esmanhoto; Kilikian, 2004; Cisneiros et al. 2004). As principais vantagens desses tipos de processos de extração são: biocompatibilidade, fácil aumento de escala, baixa tensão interfacial e baixo custo operacional (Kula, 1990; Li et al. 2003). Este sistema também tem grande potencial em processos de “*downstream*” contínuos (Porto et al. 1997) por que o SDFA é economicamente viável e pode potencialmente reduzir o impacto ambiental com resíduos (Simon; Gautam, 2004).

A extração de proteínas em modo descontínuo usando SDFA é realizada pela mistura da proteína com uma das fases do sistema e subsequente permitindo a dispersão e a separação. Entretanto, a dispersão produzida nos tubos é estável e a separação das fases é muito lenta quando executada sob a ação da gravidade, por isso a centrifugação é necessária. Esta operação é muito dispendiosa em escala industrial, neste caso uma coluna extratora pode ser empregada como equipamento alternativo para extração, não requerendo centrifugação, onde a separação das fases é rápida e eficiente (Srinivas; Narayan; Raghavarao, 2002; Japarabad et al. 1992).

Tipos diferentes de colunas têm sido descritos para uso com SDFA, tais como: coluna spray (Srinivas; Narayan; Raghavarao, 2002), em leito fixo (Igarashi; Kieckbusch; Franco, 2004), York-Scheibel (Japarabad et al. 1992), discos rotativos (Westerterp; Landsman, 1962) e discos perfurados rotativos (Porto et al. 2004; Sarubbo

et al. 2004). A seleção da coluna depende das propriedades da biomolécula (por exemplo: hidrofobicidade, tamanho molecular, eletroquímica, conformação molecular, etc.) (Li et al. 2003), e do tipo de SDFA (polímero-polímero ou polímero-sal) envolvido. A coluna de discos perfurados rotativos (PRDC) é bem adequada para sistemas com baixa tensão interfacial tais como os SDFA formados por PEG – fosfato (Cunha et al. 2003).

Alguns autores têm proposto o uso da PRDC como equipamento para a extração de proteínas (Tambourgi; Pereira, 1993) tais como: cutinase (Cunha et al. 2003), albumina bovina sérica (Porto et al. 2004; Sarubbo et al. 2004) e tripsina (Oliveira et al. 2002), por que este tipo de sistema de extração apresenta grande eficiência e melhor flexibilidade operacional do que os convencionais (colunas spray, York-Scheibel e empacotadas) (Srinivas; Narayan; Raghavarao, 2002; Japarabad et al. 1992; Igarashi; Kieckbusch; Franco, 2004).

O conhecimento do coeficiente de transferência de massa de proteína e o “hold up” da fase dispersa é necessário para desenho de colunas em escala industrial. Usualmente, esses parâmetros dependem da taxa de fluxo das duas fases, suas propriedades físicas, diâmetro da coluna e o desenho de borrifação (Porto et al. 2000).

O desempenho de uma unidade operacional de extração continuamente é dependente da quantidade de solvente presente no extrator. Se o solvente está em grandes quantidades, comparando a alimentação, o gradiente de concentração do soluto é favorável à transferência de massa. O “hold up” representa a quantidade de

solvente disponível no extrator para extrair o soluto da alimentação (Giraldo-Zuninga et al. 2005a).

A toxina alfa produzida por *Clostridium perfringens* é um importante agente da gangrena gasosa em homens e animais, que é usualmente resultados da contaminação de uma injúria traumática por esporos ou células vegetativas (Titball; Naylor; Basak, 1999). Além disso, tem sido sugerido que a toxina alfa pode ter papel em doenças não gangrenosas dos homens e animais (Titball; Naylor; Basak, 1999), por que esta toxina exibe atividades fosfolipásica e esfigomielinásica, pode causar hemólise, necrose e letalidade (Ochi et al. 2004). Diversas doenças têm sido associadas com esta toxina, como a enterite em galinhas, bezerros e porcos, síndrome da morte infantil do Sudão e doenças de Chron's (Titball; Naylor; Basak, 1999), embora a imunização com o toxoide tenha se mostrado eficiente (Songer, 1997).

Vacinas a base de toxoides, podem ser preparadas a partir do sobrenadante filtrado da cultura de *Clostridium pefringens* tipo A, porém a contaminação por outras proteínas é inevitável (Titball; Naylor; Basak, 1999). A purificação da toxina alfa em grande escala é de grande significância para preparar o toxoide, por que reduz a contaminação e aumenta a eficiência da vacina. Além disso, a obtenção de toxina alfa pura é muito importante para estudo dos seus mecanismos de ação.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho da coluna de discos perfurados rotativos para extração da toxina alfa usando sistema de duas fases aquosas PEG-fosfato.

3.2 Materiais e métodos

3.2.1 Materiais

O fermentado produzido por *Clostridium perfringens* tipo A contendo a toxina alfa foi gentilmente doado pela Vallée S. A. (Montes Claros, Brasil). O polietileno glicol (PEG) massa molar 8000 g/mol, fosfato dibásico de potássio (K_2HPO_4), fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4), Azul de Coomassie G-250, albumina bovina sérica (BSA), *p*-nitrofenil-fosforilcolina ($pNPPC$) foram obtidos a partir da Sigma Co. (St. Louis, Mo, USA). Os outros reagentes químicos todos de grau analítico.

4.2.2 Preparação da toxina alfa

O fermentado produzido por *Clostridium perfringens* tipo A contendo a toxina alfa foi liofilizado e dissolvido na solução de fosfato para extração.

4.2.3 Preparação do sistema de duas fases aquosas

O sistema de duas fases aquosas (700 g) foi preparado a partir de soluções estoque de 50 % (m/m) PEG 8000 g/mol e 40 % (m/m) sais de fosfato a pH 8,0. A solução estoque de fosfato consistiu da mistura de fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) e fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4). A composição do sistema usada foi determinada em estudos em modo descontínuo, sendo de 15 % (m/m) de PEG, 25% (m/m) de fosfato em pH 8,0. O sistema foi agitado por 4 horas a temperatura ambiente de 25°C, depois foi incubado em um funil de decantação por um período de 12 horas (overnight) a temperatura ambiente. Decorrido este tempo, as fases foram separadas e

serviram para alimentar a coluna através de bombas peristálticas. A viscosidade e densidade das fases foram medidas em HKV 3000 banho de viscosidade cinemática (Koehler Instrument Corporation, New York, USA) e DMA 6000 densitômetro (Anton Paar, Gratz, Austria), respectivamente.

4.2.4 Coluna de discos perfurados rotativos

A coluna de discos perfurados rotativos foi feita em Perspex com 32 mm de diâmetro interno e 170 mm de altura. Seis discos perfurados rotativos com 30 mm de diâmetro cada, com 20 buracos com 2 mm de diâmetro cada (área livre aproximadamente 20%) foram montados em um eixo central e separados igualmente. A coluna foi mantida a temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e a velocidade de agitação dos discos variaram entre 35 a 140 rpm.

4.2.5 Procedimentos experimentais

Inicialmente a coluna foi preenchida com 90 mL da fase contínua (fosfato) com a toxina alfa, numa concentração final de proteínas de 0,6 mg/mL. As fases: contínua e dispersa foram alimentadas por cima e por baixo da coluna, respectivamente através de bombas peristálticas. A coluna foi operada em modo contínuo a $25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Amostras das fases: refinada (saída do sal) e extratora (saída do PEG) foram retiradas a cada 10 minutos até 1 hora de operação, para a realização das medidas do coeficiente de transferência de massa, fator de purificação e eficiência de separação. A taxa de fluxo das fases: contínua (entrada do sal), dispersa (entrada do PEG), refinada (saída do sal)

e extratora (saída do PEG) foi mantida constante através de bombas peristálticas. As condições de operação testadas estão apresentadas na Tabela 4.2.5.1.

Tabela 4.2.5.1 Condições operacionais testadas para a extração contínua da toxina alfa produzida por *Clostridium perfringens* Tipo A em coluna de discos perfurados rotativos (PRDC) com 15% (m/m) PEG / 25% (m/m) fosfato (pH 8.0) SDFA.

Velocidade rotacional dos discos (rpm)	Taxa de fluxo da fase contínua (mL/min)	Taxa de fluxo da fase dispersa (mL/min)
35	3	1
90	2	2
140	3	3

4.2.6 Métodos analíticos

A atividade enzimática foi determinada em ambas as fases. O ensaio foi baseado no método descrito por Kurioka e Matsuda (1976). A solução do substrato foi preparada pela mistura de 60%(m/v) de sorbitol, 1mM de cloreto de zinco (ZnCl_2) e 50 mM de ρ -nitrofenil-fosforilcolina (ρ NPPC) em tampão 25 mM Tris-HCl pH 7,2. Um total de 225 μL desta solução foi transferida para um tubo de ensaio e incubado por 15 minutos a 37° C. Decorrido este tempo, as amostras das fases (75 μL) foram adicionadas ao mesmo tubo e incubados novamente por 1 hora sob agitação contínua. A taxa de hidrólise do NPPC pela fosfolipase C foi monitorada através do ρ -nitrofenol a 415 nm. O coeficiente de extinção molar do ρ -nitrofenol em solução de sorbitol a 60% tamponada com Tris-HCl pH 7,2 foi $1,51 \times 10^4$ mmol/min.

A quantidade de proteína total em ambas as fases foi determinada pelo método de Bradford, 1976.

4.2.7 Definição dos parâmetros do processo

Para a determinação do “hold up” da fase dispersa (E_D), o volume total do sistema de duas fases aquosas e volume da fase dispersa foram medidos após o equilíbrio de o sistema ter sido encontrado. Isto foi realizado pela parada simultânea das correntes de entrada e saída, e a agitação. Em seguida a quantidade presente na coluna foi colocada em uma proveta para medição dos volumes após 30 minutos de descanso. O calculo foi realizado de acordo com a equação:

$$E_D = \frac{D_v}{V} \quad (1)$$

Onde, D_v é o volume da fase dispersa (mL) e V é o volume total do sistema(mL) .

O coeficiente de partição (K) foi determinado a partir das amostras das fases do refinado e do extrator coletadas após o equilíbrio do sistema, de acordo com a equação:

$$K = \frac{C_e}{C_r} \quad (2)$$

Onde, C_e e C_r são as concentrações de toxina alfa nas fases extratora e refinada, respectivamente.

Para determinar o coeficiente de transferência de massa, a taxa de transferência da toxina alfa a partir da fase extratora vinda da fase contínua foi medida. Para isto, a concentração da toxina alfa foi monitorada na entrada e saída da coluna.

O coeficiente de transferência de massa foi expressa como função da concentração pela seguinte balanço material descrito por Pawar et al. (1997):

$$K_D a = \left(V_{Df} / V \right) \ln \left[(C_{Di} - KC_C) / (C_{Df} - KC_C) \right] \quad (3)$$

Onde, o V_{Df} é a taxa de fluxo da fase dispersa (mL/min), V é o volume total do sistema (mL), C_{Di} e C_{Df} são as concentrações de proteína iniciais e finais da fase dispersa (mg/mL), K é o coeficiente de partição, C_C é a concentração de proteína na fase contínua (mg/mL) e $K_D a$ é o coeficiente de transferência de massa da fase dispersa (min^{-1}).

O fator de purificação (P_f) da toxina alfa foi definido como a taxa entre a atividade específica da fosfolipase C após a extração em SDFA na PRDC e a atividade específica da fosfolipase C antes da extração.

A eficiência de separação (E_s) foi calculada pelo método de Kawase (1990) como a equação abaixo:

$$E_s = (C_{Ci} - C_{Cf}) / C_{Ci} \quad (4)$$

Onde, C_{Ci} e C_{Cf} são as concentrações de proteína nas fases contínua e refinada, respectivamente.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Efeito da taxa de fluxo da fase dispersa

Experimentos baseados na medida do “hold up” foram inicialmente realizados para investigar a hidrodinâmica da coluna de discos perfurados rotativos. Este parâmetro expressa a quantidade de solvente atualmente disponível para remover o produto desejado a partir da corrente de alimentação, correspondendo, nesta investigação em particular, a percentagem da fase extratora (entrada PEG) apta a extrair toxina alfa a partir da fase contínua (entrada sal) e foi usada como medida indireta da capacidade de transferência de massa do reator.

A Figura 4.3.1.1 mostra que o “hold up” aumentou com a taxa de fluxo da fase dispersa (V_D), isto devido à diminuição do tamanho da gota e aumento do numero de gotas (19). Este resultado está de acordo com observações previas feitas em PRDC usando PEG – fosfato SDFA para extração contínua de citocromo b_5 (Porto et al. 1997) e albumina bovina sérica (BSA) (Porto et al. 2004), bem como usando PEG – goma de cajueiro SDFA para extração contínua de BSA (Sarubbo et al. 2004). Efeitos similares no “hold up” foram observados em colunas tipo Spray usando PEG – dextrana (Sawant; Sikdar; Joshi, 19990) e PEG – sulfato de sódio (Pawar et al. 1997) SDFA para extração contínua de BSA e da amiloglucosidade e β -galactosidade, respectivamente.

Figura 4.3.1.1 Influência da taxa de fluxo da fase dispersa (V_D) no “hold up” (E_D) para a extração contínua da toxina alfa produzida a partir de *Clostridium perfringens* tipo A em coluna de discos perfurados rotativos (PRDC) usando sistema de duas fases aquosas PEG – fosfato.

O aumento do coeficiente de transferência de massa foi esperado a partir da utilização de V_D crescentes, como resultado da diminuição do tamanho da gota por causa da alta velocidade usada e conseqüentemente maior área de transferência de massa. Entretanto, como mostra a Figura 4.3.1.2, o K_{Da} diminuiu com o aumento da V_D , devido a variações na viscosidade e densidade do sistema de duas fases aquosas usado, como proposto por Porto et al. (2000). A grande diferença entre a viscosidade do PEG (massa molar = 8000 g/mol) (36,5 mPa s) e a solução de fosfato (3,06 mPa s), bem como a lenta taxa de fluxo dentro da coluna pode ter afetado este parâmetro.

Figura 4.3.1.2 Influência da taxa de fluxo da fase dispersa (V_D) no coeficiente de transferência de massa (K_{Da}) para a extração contínua da toxina alfa produzida a partir de *Clostridium perfringens* tipo A em coluna de discos perfurados rotativos (PRDC) usando sistema de duas fases aquosas PEG – fosfato.

A Figura 4.3.1.3 mostra que a eficiência de separação (E_s) variou pouco com o aumento da taxa de fluxo da fase dispersa na faixa investigada neste estudo. De acordo com Porto et al. (2004), este comportamento pode ser devido ao efeito contrário exercido por este parâmetro com a diminuição do tamanho da gota e o aumento do número de gotas, em consequência do aumento da taxa de fluxo da fase dispersa.

Figura 4.3.1.3 Influência da taxa de fluxo da fase dispersa (V_D) na eficiência de separação (E_s) para a extração contínua da toxina alfa produzida a partir de *Clostridium perfringens* tipo A em coluna de discos perfurados rotativos (PRDC) usando sistema de duas fases aquosas PEG – fosfato.

O efeito da V_D no fator de purificação da toxina alfa está apresentado na Figura 4.3.1.4. Pode ser observado que o aumento dos valores da velocidade da fase dispersa (V_D) melhorou o fator de purificação e um alto valor deste parâmetro (2,4) foi obtido a 3 mL/min. Por outro lado, Porto et al. (2004) estudando a extração contínua de ascorbato oxidase em PRDC usando PEG – fosfato SDFA, encontrou que a $V_D = 1$ mL/min foi a melhor taxa de fluxo para a purificação da enzima. Esta grande variação observada pode ser devido diferença da viscosidade do PEG usado em nosso estudo (36,5 mPa s) quando comparado ao do trabalho de Porto et al. (2004) (5,9 mPa s).

Figura 4.3.1.4 Influência da taxa de fluxo da fase dispersa (V_D) no fator de purificação (P_f) para a extração contínua da toxina alfa produzida a partir de *Clostridium perfringens* tipo A em coluna de discos perfurados rotativos (PRDC) usando sistema de duas fases aquosas PEG – fosfato.

4.3.2 Efeito da velocidade de agitação rotacional

Como mostra a Figura 4.3.2.1, o “hold up” foi influenciado pela velocidade de agitação dos discos, diminuindo para aproximadamente 0,5 a 90 rpm e aumentando um pouco quando a agitação é intensificada. Um alto valor de “hold up” (0,8) foi observado na menor velocidade de agitação dos discos (35 rpm), esta condição não afetou a capacidade da coluna na extração. O mesmo comportamento foi observado por Coimbra; Thommes e Kula (1994) quando estudaram o desempenho de uma coluna extratora Graesser para separação de proteínas do soro usando PEG – fosfato SDFA.

Figura 4.3.2.1 Influência da velocidade rotacional dos discos (rpm) no “hold up” (E_D) para a extração contínua da toxina alfa produzida a partir de *Clostridium perfringens* tipo A em coluna de discos perfurados rotativos (PRDC) usando sistema de duas fases aquosas PEG – fosfato.

Na Figura 4.3.2.2 mostra que o coeficiente de transferência de massa aumentou de forma progressiva com a velocidade rotacional do disco e alcançou o valor máximo ($K_{Da} = 2.71 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$) a 140 rpm. Este resultado sugere que um aumento na agitação pode ser necessário para ultrapassar a viscosidade da fase extratora e aumentar a transferência de massa, isto está de acordo com as observações de Porto et al. (1997), quando investigaram a extração contínua do citocromo b_5 em PRDC com PEG – fosfato SDFA.

Figura 4.3.2.2 Influência da velocidade rotacional dos discos (rpm) no coeficiente de transferência de massa (K_{Da}) para a extração contínua da toxina alfa produzida a partir de *Clostridium perfringens* tipo A em coluna de discos perfurados rotativos (PRDC) usando sistema de duas fases aquosas PEG – fosfato.

Por outro lado, a eficiência de separação (E_S) foi fracamente influenciada por este parâmetro (Figura 4.3.2.3), este resultado discorda das observações realizadas por Tambourgi e Pereira (1993), que encontraram um aumento progressivo da E_S . Os nossos resultados por ser explicado pela resistência ao fluxo imposta pela velocidade rotacional dos discos (Porto et al. 1997).

Figura 4.3.2.3 Influência da velocidade rotacional dos discos (rpm) na eficiência de separação (E_D) para a extração contínua da toxina alfa produzida a partir de *Clostridium perfringens* tipo A em coluna de discos perfurados rotativos (PRDC) usando sistema de duas fases aquosas PEG – fosfato.

Na Figura 4.3.2.4, podemos observar que o fator de purificação foi maior a 35 rpm (2,3), este resultado sugere que uma baixa velocidade rotacional dos discos é melhor para este parâmetro. Resultados similares foram encontrados para “hold up”, que representa a quantidade de fase extratora capaz de retirar toxina alfa da fase contínua. Além disso, a concentração de proteína a 35 rpm foi menor, como mostra o valor de K_D nesta condição, ou seja, ocorreu uma diminuição na transferência de massa, e provavelmente por isso o fator de purificação foi maior.

Figura 4.3.2.4 Influência da velocidade rotacional dos discos (rpm) no fator de purificação (P_f) para a extração contínua da toxina alfa produzida a partir de *Clostridium perfringens* tipo A em coluna de discos perfurados rotativos (PRDC) usando sistema de duas fases aquosas PEG – fosfato.

4.4 Conclusões

Os resultados destes demonstraram que a velocidade de fluxo da fase dispersa influenciou fortemente o desempenho da PRDC, e que ambos, o coeficiente de transferência de massa e o hold up aumentaram com este parâmetro. Estas respostas estudadas mostraram melhor resultado com a menor velocidade rotacional dos discos. A melhor condição operacional selecionada neste estudo para a extração da toxina alfa

em coluna de discos perfurados rotativos com sistema de duas fases aquosas PEG – fosfato, foi obtida com taxa de fluxo da fase dispersa de 3 mL/min e velocidade rotacional dos discos de 140 rpm. Esses resultados podem ser usados para o aumento da escala deste processo através de um estudo sucessivo.

Referências Bibliográficas

- Albertsson, P. A. **Partition of cell particles and macromolecules**. Wiley Interscience, New York, 1986, 346 p.
- Amorim, C. Clostridioses - Doenças Que Mais Matam Bovinos. **Jornal do Brasil**. Publicado em 23 de maio de 2000.
- Andrews, B. A.; Nielsen, S.; Asenjo, J. A. Partitioning and purification of monoclonal antibodies in aqueous two-phase systems, **Bioseparation**, v. 6, p. 303-313, 1996.
- Baba, E.; Fuller, A. L.; Gibert, J. M.; Thayer, S. G.; Mcdougald, L. R. Effects of *Eimeria brunetti* infection and dietary zinc on experimental induction of necrotic enteritis in broiler chickens. **Avian Disease**, v. 36, p. 59-62, 1992.
- Barros Neto, B.; Scarminio, I. C.; Bruns, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Editora da Universidade de Campinas - UNICAMP, Campinas, SP, 2ª ed., 401p. 2002.
- Benavides, J.; Rito-Palomares, M. Bioprocess intensification: a potential aqueous two-phase process for the primary recovery of B-phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*. **J. Chromatogr. B**, cidade, v. 807, p. 33-38, 2004.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v.72, p.248-254, 1976.
- Bunting, M.; Lorant, D. E.; Bryant, A. E.; Zimmerman, G. A. McIntyre, T. M.; Stevens, D. L.; Prescott, S. M. Alpha-toxin from *Clostridium perfringens* induces proinflammatory changes in endothelial cells. **J. Clin. Invest.** v. 100, p. 565-574, 1997.
- Carneiro da Cunha, M. G.; Aires-Barros, M. R.; Tambourgi, E. B.; Cabral, J. M. S.

Recovery of a recombinant cutinase with reversed micelles in a continuous perforated rotating disc contactor. **Biotechnol. Techniques.** v. 8(6), p. 413-418, 1994.

Cascone, O.; Andrews, B. A.; Asenjo, J. A. Partitioning and Purification of thaumatin in aqueous two-phase system. **Enzyme Microbiol. Technol.** v.13, p.629, 1991.

Cavalcanti, M. T. H.; Porto, T. S.; Porto, A. L. F.; Brandi, I. V.; Lima Filho, J. L.; Pessoa Jr, A. Large scale purification of *Clostridium perfringens* toxin: a review. **Brazilian J. Pharm. Sci.**, v. 40(2), p.151-164, 2004.

Cisneros, M.; Benavides, J.; Brenes, C. H.; Rito-Palomares, M. Recovery in aqueous two-phase systems of lutein produced by the green microalga *Chlorella protothecoides*. **J. Chromatogr. B**, v.807, p. 105-110, 2004.

Coimbra, J. R.; Thommes, J.; Kula, M-R. Continuous separation of whey proteins with aqueous two-phase systems in a Graesser contactor. **J. Chromatogr. A**, v.668, p.85-94, 1994.

Coimbra, J. R.; Mojola, F.; Meirelles, A. J. A. Dispersed phase hold up in a perforated rotating disc contactor (PRDC) using aqueous two phase systems. **J. Chem. Eng. Japan.**, v. 31(2), 277-280, 1998

Costa, S. A.; Pessoa Jr, A.; Roberto, I. C., **App. Biochem. Biotechnol.**, v.629, p.70-72, 1998.

Costa, S. A.; Pessoa Jr., A.; Roberto, I. C. Partitioning of xylanolytic complex from *Penicillium janthinellum* by an aqueous two-phase system. **J. Chromatogr. B**. v. 743, p. 339-348, 2000.

Cortez, E. V.; Felipe, M. G. A.; Roberto, I. C.; Pessoa Jr, A.; Vitolo, M. Extraction by

reversed micelles of the intracellular enzyme xylose reductase. **App. Biochem. Biotechnol.**, v.91/93, p.753-759, 2001.

Cunha, M.T.; Costa, M.J.L.; Calado, C.R.C.; Fonseca, L.P.; Aires-Barros, M.R.; Cabral, J.M.S. Integration of production and aqueous two-phase systems extraction of extracellular *Fusarium solani pisi* cutinase fusion proteins. **J. Biotechnol.**, v.100, p.55-64, 2003.

Cyang, Z.; Buczer, J. Nonenterotoxigenic anaerobe *C. perfringens* A as a cause of calf diarrhoea. **Medycyna Weterynaryjna**, v. 49, p. 469-471, 1993.

Diamond, A. D.; Hsu, J. T. Aqueous two phase systems for biomolecule separation. **Adv. Biochem. Eng.** v.47, p.89-135, 1992.

Duarte, M. C. T.; Portugal, E. P.; Ponezi, A. N.; Bim, M. A.; Tagliari, C. V.; Franco, T. T. Production and purification of alkaline xylanase. **Biores. Technol.**, v.68, p.49-53, 1999.

Eaton, J. T.; Naylor, C. E.; Howells, A. M.; Moss, D. S.; Titball, R. W.; Basak, A. K. Crystal structure of the *Clostridium perfringens* alpha-toxin with the active site closed by a flexible loop region. **J. Mol. Biology**, v. 319, p. 275-281, 2002.

Engel, S.; Barak, Z.; Chipman, D. M.; Merchuk, J. C. Purification of acetohydroxy acid synthase by separation in an aqueous two-phase system. **J. Chromatogr. B**, v.743, p.281-286, 2000.

Esmanhoto, E. **Purificação de rentamicina através de extração em sistemas de duas fases aquosas.** Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Universidade de São Paulo/USP, São Paulo, 80p., 2002.

Esmanhoto, E.; Kilikian, B. V. ATPS applied to extraction of small molecules –

polycetides – and simultaneous clarification of culture media with filamentous microorganisms. **J. Chromatogr. B**, v. 807, p.139-144, 2004.

Falco, A. L. P.; Durrant, L. R.; Franco, T. T. Purification of α -galactosidase from seeds of *Sesbania marginata*. **Brazilian J. Chem. Eng.**, v. 17, p.819-825, 2000.

Farrugia, B.; Nerli, B.; Picó, G. Study of the serum albumin-polyethyleneglycol interaction to predict the protein partitioning in aqueous two-phase systems. **J. Chromatogr. B**, v.798, p.25-33, 2003.

Farrugia, B.; Rigatuso, R.; Capezio, L.; Diez, V.; Picó, G. Influence of high concentration monovalent cations on the protein partitioning in polyethyleneglycol 1500-phosphate aqueous two-phase systems. **J. Chromatogr. B** v. 809, p. 301-306, 2004.

Fernández Lahore, H. M.; Miranda, M. V.; Fraile, E. R.; Biscoglio de Jiménez Bonino, M. J.; Cascone, O. Partition behavior and purification of a *Mucor bacilliformis* acid protease in aqueous two-phase systems. **Process Biochem.**, v. 30(7), p.615-621,1995.

Flores-Díaz, M.; Thelestam, M.; Clark, G. C.; Titball, R. W.; Alape-Girón, A. Effects of *Clostridium perfringens* phospholipase C in mammalian cells. **Anaerobe**, v. 10, p. 115-123, 2004.

Flores-Díaz, M.; Alape-Girón, A. Role of *Clostridium perfringens* phospholipase C in the pathogenesis of gas gangrene. **Toxicon**, v.4, p.979-986,2004.

Forciniti, D. Preparation of aqueous two-phase systems. *In*: Hatti-Kaul, R. (Ed) Aqueous two-phase systems: **Methods and Protocols**, v. 11, p. 23-33, 2000

Giraldo-Zuniga, A. D.; Coimbra, J. S. R.; Minim, L. A.; Rojas, E. E. G. Axial mixing in a Graesser liquid-liquid contactor using aqueous two-phase systems. **Chem. Eng. Process.** v.44 , p. 441-446, 2005a.

Giraldo-Zuniga, A. D.; Coimbra, J. S. R.; Minim, L. A.; Rojas, E. E. G. Dispersed phase hold-up a Graesser raining bucket contactor using aqueous two-phase systems. **J. Food Eng.**, v. , p. , 2005b.

Grimonprez, B.; Johansson, G. Liquid-liquid partitioning of some enzymes, especially phosphofructokinase, from *Saccharomyces cerevisiae* at sub-zero temperature. **J. Chromatogr. B**, v.680, p.55-63, 1995.

Guillouard, I.; Alzari, P. M.; Saliou, B.; Cole, S. T. The carboxy-terminal C2-like domain of the α -toxin from *Clostridium perfringens* mediates calcium-dependent membrane recognition. **Mol. Microbiol.** v. 26, p. 867-876, 1997.

Gustafson, C.; Sjudahl, R.; Tagesson, C. Phospholipase C activation and arachidonic acid release in intestinal epithelial cells from patients with Crohn's disease. **Scand. J. Gastroenterol.** v. 25, 1151-1160, 1990.

Gündüz, U. Partitioning of bovine serum albumin in an aqueous two-phase system: optimization of partition coefficient. **J. Chromatogr. B**, v. 743, p.259-262, 2000.

Haghtalab, A.; Mokhtarani, B. The new experimental data and a new thermodynamic model based on group contribution for correlation liquid-liquid equilibria in aqueous two-phase systems of PEG and (K_2HPO_4 or Na_2SO_4). **Fluid phase Equilibria.** v. 215, p. 151-161, 2004.

Haghtalab, A.; Mokhtarani, B. The UNIFAC-NRF activity coefficient model based on group contribution for partitioning of proteins in aqueous two-phase (polymer + salt) systems. **J. Chem. Thermodynamics**, v. 37, p. 289-295, 2005.

Han, J. H.; Lee, C. H. Effects of salts and poly (ethylene glycol) – palmitate on the partitioning of proteins and *Bacillus subtilis* neutral protease in aqueous two-phase systems. **Colloids and Surfaces**, v.9, p.109-116, 1997.

Harry, M. Poly(ethylene glycol) chemistry, Biotechnical and biomedical applications. New York: Plenum Press, 1992.

Hatheway, C. L.; Whaley, D. N.; Dowell, JR. V. R. Epidemiological aspects of *Clostridium perfringens* in foodborne illness. **Food Technol.**, v.34, p.77-90, 1990.

Hatti-Kaul, R. Aqueous two-phase systems review. **Molecular Biotechnol.** v.19, p. 269 - 277, 2001.

Kula, M-R. Trends and future prospects of aqueous two-phase extraction. **Bioseparation**, v.1, p. 181-189, 1990.

Igarashi, L.; Kieckbusch, T.G.; Franco, T.T. Mass transfer in aqueous two-phases systems packed column. **J. Chromatogr. B**, v. 807, p.75-80, 2004.

Japarabad, K. R.; Patil, T. A.; Sawant, S. B.; Joshi, J. B. Enzyme and protein mass transfer coefficient in aqueous two-phase systems – II. York-Scheibel extraction column. **Chem. Eng. Sci.**, v. 47, p. 69-73, 1992.

Jepson, M.; Bullifent, H. L.; Crane, D.; Flores-Diaz, M.; Alape-Giron, A.; Jayasekeera, P.; Lingard, B.; Moss, D.; Titball, R.W. Tyrosine 331 and phenylalanine 334 in *Clostridium*

perfringens α -toxin are essential for cytotoxic activity. **FEBS Letters**, v. 495, p. 172-177, 2001.

Johannsen, U.; Arnold, P.; Kohler, B.; Selbitz, H. J. Untersuchungen zur experimentellen *Clostridium perfringens* Typ A Enterotoxämie der Saugferkel. **Mh Vet-Med**, v. 48, 129-136, 1993.

Johansson, H. O.; Karlstrom, G.; Tjerneld, F.; Haynes, C. A. Driving forces for phase separation and partitioning in aqueous two-phase systems. **J. Chromatogr. B**, v. 711, p. 3-17, 1998.

Jolivet – Reynaund, C.; Moreau, H.; Alouf, J. E. Purification of alpha-toxin from *Clostridium perfringens*: phospholipase C. **Methods Enzymol.**, v.165, p.91-94, 1988.

Kaul, A. The phase diagram. In: Hatti-Kaul, R. (Ed) Aqueous two-phase systems: Methods and Protocols, v. 11, p. 11-21, 2000.

Kawase, Y. Dispersed-phase hold up and mass transfer in a rotating disc contactor with perforated skirts. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v.48, p.247-260, 1990.

Kurioka, S.; Matsuda, M. Phospholipase C assay using p-nitrophenylphosphorylcholine together with sorbitol and its application to studying the metal and detergent requirement of the enzyme. **Anal. Biochem.**, v.75, p.281-289, 1976.

Lobato, F. C. F.; Moro, E.; Umehara, O.; Assis, R. A.; Martins, N. E.; Gonçalves, L. C. B. Avaliação da resposta de antitoxinas beta e épsilon de *Clostridium perfringens* induzidas em bovinos e coelhos por seis vacinas comerciais no Brasil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v.52(4), 2000.

Long, J. R.; Truscott, R. B. Necrotic enteritis in broiler chickens. III Reproduction of the disease. **Can. J. Compl. Med.** v. 40, p. 53-59, 1976.

Li, C.; Bai, J.; Li, W.; Cai, Z.; Ouyang, F. Optimization of conditions for bacteriocin extraction in PEG/Salt aqueous two-phase systems using statistical experimental designs. **Biotechnol. Prog.** V. 17, p. 366-368, 2001.

Li, D.-Q.; Wu, Y.-T.; Mei, L.-H.; Zhu, Z.-Q.; Yao, S.-J. Modeling the protein partitioning in aqueous polymer two-phase systems: influence of polymer concentration and molecular weight. **Chem. Eng. Sci.**, v.58, p. 2963-2972, 2003.

Li, M.; Peeples, T. L. Purification of hyperthermophilic archaeal amylolytic enzyme (MJA1) using thermoseparating aqueous two – phase systems. **J. Chromatogr. B**, v.807, p.69-74, 2004.

Marcos, J. C.; Fonseca, L. P.; Ramalho, M. T.; Cabral, J. M. S. Application of surface response analysis to the optimization of penicillin acylase purification in aqueous two-phase systems. **Enzyme Microbial Technol.** v.31, p.1006-1014, 2002.

Mayerhoff, Z. D. V. L.; Roberto, I. C.; Franco, T. T. Purification of xylose reductase from *Candida mogii* in aqueous two-phase systems. **Biochem. Eng. J.**, v.18, p.217-223, 2004.

Mcdonel, J. L. *Clostridium perfringens* toxins (type A, B, C, D, E). **Pharmacol. Ther.**, v.10, p.617-655, 1986.

Murrel, W. G.; Stewart, B. J.; O'neil, C.; Siarkas, S.; Kariks, S. Enterotoxigenic bacteria in the sudden infant death syndrome. **J. Med. Microbiol.** v. 39, p. 114-127, 1993.

Ochi, S.; Hashimoto, K.; Nagahama, M.; Sakurai, J. Phospholipid metabolism induced by

Clostridium perfringens alpha-toxin elicits a hot-cold type of hemolysis in rabbit erythrocytes. **Infect. Immunity**. V. 64, p. 3930-3933, 1996.

Ochi, S.; Oda, M.; Nagahama, M.; Sakurai, J. *Clostridium perfringens* alpha-toxin induced hemolysis of horse erythrocytes is dependent on Ca^{2+} uptake. **Bioch. Bioph. Acta**, v. 1613, p. 79-86, 2003.

Ochi, S.; Oda, M.; Matsuda, H.; Ikari, S.; Sakurai, J. *Clostridium perfringens* α -toxin activates the sphingomyelin metabolism system in sheep erythrocytes. **J. Biol. Chem.**, v.279, p.12181-12189, 2004.

Oliveira, L. A.; Sarubbo, L.A.; Porto, A.L.F.; Lima-Filho, J.L.; Campos-Takaki, G.M.; Tambourgi, E.B. Physical and rheological characterization of polyethylene glycol-cashew-nut tree gum aqueous two-phase systems. **J. Chromatogr. B**, v. 766, p. 27-36, 2001.

Oliveira, L. A.; Sarubbo, L. A.; Porto, A. L. F.; Campos-Takaki, G. M.; Tambourgi, E. B. Partition of trypsin in aqueous two-phase systems of poly(ethylene glycol) and cashew-nut tree gum. **Process Biochem.** v.38(5), p.693-699 , 2002.

Olivera-Nappa, A.; Lagomarsino, G.; Andrews, B. A.; Asenjo, J. A. Effect of electrostatic energy on partitioning of proteins in aqueous two-phase systems. **J. Chromatogr. B** v.807, p. 81-86, 2004.

Pancera, S. M.; Silva, L. H. M.; Loh, W.; Itri, R.; Pessoa Jr, A.; Petri, D. F. S. The effect of poly(ethylene glycol) on the activity and structure of glucose-6-phosphate dehydrogenase in solution. **Colloids and Surfaces**, v.26, p.291-300, 2002.

Papamichael, N.; Boerner, B.; Husted, H. Continuous aqueous two-phase extraction of proteins: automated processing and recycling of process chemicals. **J. Chem. Technol.**

Biotechnol., v.54 (1), p.47-55, 1992.

Pawar, P.A.; Parasu Veera, U.; Sawant, S.B.; Joshi, J.B. Enzyme mass transfer coefficient in aqueous two-phase systems: modified spray extraction columns. **Can. J. Chem. Eng.**, v.75, p.751-758, 1997.

Pessoa-Jr, A.; Kilikian, B. V. Purificação de produtos biotecnológicos. Barueri – SP: Manole. 2005. 444 p.

Pessôa Filho, P. A.; Mohamed, R. S. Thermodynamic modeling of the partitioning of biomolecules in aqueous two-phase systems using a modified Flory-Huggins equation. **Process Biochem.** v. 39, p. 2075-2083, 2004.

Petit, L.; Gibert, M.; Popoff, M. R. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. **Trends Microbiol.**, v. 7 (3), p. 104-110, 1999.

Pope, B. J.; Shah, N. R. An improved contactor for liquid-liquid extraction. **International Solvent Extraction Conference.** v. 699-710, 1971.

Porto, A.L.F.; Lima-Filho, J.L.; Aires-Barros, M.R.; Cabral, J.M.S.; Tambourgi, E.B. Extraction of recombinant cytochrome b_5 from disrupted *Escherichia coli* cells with an aqueous two-phase system in a continuous perforated rotating disc contactor. **Biotechnol. Tech.**, v.11, p.641-643, 1997.

Porto, A.L.F.; Sarubbo, L.A.; Lima-Filho, J.L.; Aires Barros, M. R.; Cabral, J. M. S.; Tambourgi, E. B. Hydrodynamics and mass transfer in aqueous two-phase protein extraction using a continuous perforated rotating disc contactor. **Bioprocess Eng.**, v.22, p.215-218, 2000.

Porto, A.L.F.; Sarubbo, L.A.; Moreira, K.A.; Melo, H.J.F.; Lima-Filho, J.L.; Campos-Takaki, G.M.; Tambourgi, E.B. Recovery of ascorbic oxidoreductase from crude extract with an aqueous two-phase system in a perforated rotating disc contactor. **Brazilian Arch. Biology Technol.**, v.47, p. 821-826, 2004.

Reman, G. H. A new efficient extraction apparatus: the rotating disc contactor. **Proceedings Third World Petroleum Congress**. P. 121-131, 1951.

Rito-Palomares, M.; Cueto, I. Effect of biological suspensions on the position of binodal curve in aqueous two-phase systems. **J. Chromatogr. B**. v.743, p.5-12, 2000.

Rito-Palomares, M. Novel Bioengineering strategies for the development of process for the recovery of proteins. **Chem. Biochem. Eng. Q.**, v. 18(2), p. 167-175, 2004.

Sarubbo, L. A. **Caracterização de um novo sistema bifásico aquoso e aplicação em extração de proteínas com coluna de discos perfurados rotativos**. Tese (Doutorado em Engenharia Química)– Universidade de Campinas/UNICAMP, Campinas, 174 p., 2000.

Sarubbo, L.A.; Oliveira, L.A.; Porto, A.L.F.; Lima-Filho, J.L.; Campos-Takaki, G.M.; Tambourgi, E.B. Performance of a perforated rotating disc contactor in the continuous extraction of a protein using the PEG-cashew-nut tree gum aqueous two-phase system. **Biochem. Eng. J.**, v.16, p.221-227, 2003.

Sarubbo, L.A.; Oliveira, L.A.; Porto, A.L.F.; Campos-Takaki, G.M.; Tambourgi, E.B. Studies of efficiency in a perforated rotating disc contactor using a polymer-polymer aqueous two-phase systems. **Brazilian Arch. Biology Technol.**, v.47, p.685-691, 2004.

- Sawant, S.B.; Sikdar, S.K.; Joshi, J.B. Hydrodynamics and mass transfer in Two-phase aqueous extraction using spray columns. **Biotechnol. Bioeng.**, v.36, p.109-115, 1990.
- Siarakas, S.; Damas, E.; Murrell, W. G. The effects of enteric bacterial toxins on the catecholamine levels of the rabbit. **Pathology**, v. 29, p. 278-285, 1997.
- Simon, L.; Gautam, S. Modeling continuous aqueous two-phase systems for control purposes. **J. Chromatogr. A**. v.1043, p.135-147, 2004.
- Shang, Q. K.; Li, W.; Jia, Q.; Li, D. Q. Partitioning behavior of amino acids in aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol and phosphate buffer. **Fluid Phase Equilibria**, v. 219, p. 195-203, 2004.
- Songer, J.G. Bacterial phospholipases and their role in virulence. **Trends Microbiol.**, v.5, p.156-160, 1997.
- Srinivas, N.D.; Narayan, A.V.; Raghavarao, K.S.M.S. Mass transfer in a spray column during two-phase extraction of horseradish peroxidase. **Process Biochem.**, v.38, p. 387-391, 2002.
- Tambourgi, E. B.; Pereira, J. A. F. R. The efficiency of a rotating disc contactor. **Latin Am. Appl. Research.**, v.23, p.257-260, 1993.
- Teotia, S.; Gupta, M. N. Purification of phospholipase D by two-phase affinity extraction. **J. Chromatogr. A**. v, 1025, p. 297-301, 2004.
- Titball, R. W. Bacterial phospholipases C. **Microbiol. Rev.** v. 57, p. 347-366, 1993
- Titball, R.; Fearn, A. M.; Williamson, E. D. Biochemical and immunological properties of the C-terminal domain of the alpha-toxin of *Clostridium perfringens*. **FEMS Microbiol. Letts.** v. 110, p. 45-50, 1993.

Titball, R. W.; Naylor, C. E.; Basak, A. K. The *Clostridium perfringens* α -toxin. **Anaerobe**, v.5, p.51-64, 1999.

Titball, R. W. Membrane damaging, cytotoxic phospholipases. In *The comprehensive source book of bacterial protein toxins*, ed. J. E. Alouf and J. H. Freer .Academic Press, New York, 1999, pp. 310-329.

Titball, R. W.; Hunter, S. E. C.; Martin, K. L.; Morris, B. C.; Shuttleworth, A. D.; Rubidge, T.; Anderson, D. W.; Kelly, D. C. Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of the Alpha-Toxin (Phospholipase C) of *Clostridium perfringens*. **Infection and Immunity**, v.57, p.367-376, 1989.

Tubio, G.; Nerli, B.; Picó, G. Relationship between the protein surface hydrophobicity and its partitioning behaviour in aqueous two-phase systems of polyethyleneglycol-dextran. **J. Chromatogr. B**, v. 799, p. 293-301, 2004.

Xu, X.; Madeira, P. P.; Macedo, E. A. Representation of liquid-liquid equilibria for polymer-salt aqueous two-phase systems. **Chem. Eng. Sci.** v. 59, p. 1153-1159, 2004.

Zaslavsky, B. Y. **Aqueous two-phase partitioning – physical chemistry and bioanalytical applications**. New york: Mercel Dekker, 695p. 1995.

Zhang, C.; Medina-Bolivar, F.; Buswell, S.; Cramer, C. L. Purification and stabilization of ricin B from tobacco hairy root culture medium by aqueous two-phase extraction. **J. Biotechnol.** v. 117, p. 39-48, 2005.

Westerterp, K.R.; Landsman, P. Axial mixing in a rotating disk contactor – I Apparent longitudinal diffusion. **Chem. Eng. Sci.**, v. 17, p. 363-372, 1962.

Anexos I – Artigos publicados em periódicos durante a tese de doutorado

I – A) Large scale purification of *Clostridium perfringens* toxin: a review

OBSERVAÇÃO

NÃO FOI AUTORIZADA A INCLUSÃO DO(S)
ARTIGO(S) NESTE ARQUIVO